

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

**Charakterisierung zirkulierender Tumorzell-Subgruppen bei Nicht-kleinzelligem
Lungenkarzinom (NSCLC) und ihre klinisch-prognostische Relevanz**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Ulrich Jehn
aus Meppen
2015

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A.-C. Hoffmann
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. H. Teschler

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2015

Aus den Inhalten dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

Originalarbeiten in Zeitschriften:

1. *Individual profiling of circulating tumor cell composition in patients with non-small cell lung cancer receiving platinum based treatment*, Transl Lung Cancer Res 3(2): 100-106

Abstracts:

1. *Subgroups of circulating tumor cells in patients with Non-small-cell-lung-cancer and their clinical influence*, ISMRC 2013, Paris, 25.-27. September 2013
2. *Circulating tumor cell subgroups and outcome in patients with non-small-cell-lung-cancer receiving platinum-based treatment*, Deutscher Krebskongress 2014, Berlin, 24.-27. Februar 2014

INHALT

Inhalt.....	4
1 Einleitung	6
1.1 Das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom	6
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	6
1.1.2 Diagnostik.....	7
1.1.3 Stadieneinteilung und TNM-Klassifizierung beim NSCLC	8
1.1.4 Therapie des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms	10
1.1.5 Prognose.....	12
1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTC).....	13
1.2.1 Überblick	13
1.2.2 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)	15
1.2.3 Tumorstammzellen („cancer stem cells“, CSC) beim NSCLC	17
1.2.4 Isolierungs- und Detektionsmethoden für CTC	18
1.2.5 Ausgewählte molekulare Marker, die beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und zur Detektion von CTC Anwendung finden.....	21
1.2.6 Klinische Aspekte von CTC allgemein sowie im Speziellen beim NSCLC	23
2 Zielstellungen	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Material	26
3.2 Geräte.....	26
3.3 Chemikalien und Lösungen	27
3.4 Kommerzielle Kits	28
3.5 Immunomagnetische Beads	28
3.6 Antikörper	28
3.8 Primer	29
3.9 Methoden.....	30
3.9.1 Herkunft und Entnahme der Patientenblutproben zur Untersuchung auf zirkulierende Tumorzellen	30
3.9.2 Verwendete Zellreihen für Positivkontrollen	30
3.9.3 Isolation der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation	31
3.9.4 Sequentielle Anreicherung der Tumorzellen mittels Dynabeads® und King Fisher Magnetpartikelprozessor	32
3.9.5 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung von CTC-Subtypen nach Negativselektion	34
3.9.6 Procedere für die Immunfluoreszenzfärbung	34
3.9.7 RNA-Extraktion aus CTC und DNA-Verdau	35
3.9.8 Quantitative real-time Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR).....	35
3.9.9 Detektion und Quantifizierung von Marker-positiven CTC nach Negativ-Selektion	36
3.9.10 Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und „FICTION“-Technik an CTC.....	36
3.9.11 Evaluation des Therapieansprechens.....	38

3.9.12	Statistische Tests	38
3.9.13	Patientenkollektiv	40
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Charakterisierung von CTC-Subpopulationen	42
4.1.1	Epitheliale Zellen im Blut Gesunder	42
4.1.2	CTC-Detektion verschiedener Subgruppen mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	42
4.2	Quantifizierung einzelner Subgruppen mittels Multi-IF-Färbung und Korrelation mit klinischen Daten (Patienten alle vor Therapiebeginn)	48
4.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und FICTION-Technik an CTC	51
4.4	Molekulare Charakterisierung von CTC mittels Real-time qRT-PCR	55
4.4.1	Identifizierung prognostischer Marker aus CTC von NSCLC-Patienten	55
4.4.2	Statistische Auswertung der Real-time qRT-PCR-Ergebnisse mit klinischen Patientendaten	59
4.4.3	Kombination von Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen und real-time qRT-PCR.....	68
4.4.4	Vergleich neuer potenzieller Marker und der beim NSCLC etablierten Serummarker CYFRA 21-1 und CEA.....	70
4.4.5	Unterschiede in der Markerexpression hinsichtlich der Histologie	70
5	Diskussion.....	73
6	Zusammenfassung	80
7	Referenzen.....	81
8	Anhang.....	88
8.1	Abkürzungsverzeichnis	88
8.2	Abbildungsverzeichnis	90
8.3	Tabellenverzeichnis	92
8.4	Danksagung.....	93
8.5	Lebenslauf	94

1 Einleitung

1.1 Das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Lungenkarzinom steht seit 1985 an erster Stelle der am häufigsten diagnostizierten Tumorerkrankungen (Parkin, Bray et al. 2005). Ebenso stellt es global die häufigste krebsbedingte Todesursache mit einer relativen Mortalitätsrate von über 80% dar. Das Erkrankungsverhältnis zwischen Männern und Frauen beträgt in Deutschland etwa 2,5:1, wobei der Anteil von Frauen aufgrund sich ändernder Rauchgewohnheiten im Verhältnis stetig steigt (Griesinger, Eberhardt et al. 2015).

Ca. 80% der diagnostizierten Patienten leiden an einem der Subtypen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms („Non-Small Cell Lung Cancer“, NSCLC), dementsprechend etwa 20% an einem kleinzelligen Lungenkarzinom (Brodowicz, Ciuleanu et al. 2012). Bezüglich der drei häufigsten histologischen Typen des NSCLC entfallen auf das Adenokarzinom 40% der Erkrankungsfälle aller Lungenkarzinome, auf das Plattenepithelkarzinom 20-30% und auf das Großzellige Karzinom etwa 10% (Collins, Haines et al. 2007). Die Inzidenz des Adenokarzinoms ist dabei ansteigend, während sie bei den übrigen Subentitäten des Lungenkarzinoms rückläufig ist (Chang, Chen et al. 2015; Gerber, Paik et al. 2015).

Den bei weitem bedeutendsten Risikofaktor für die Entstehung des NSCLC stellt das inhalative Tabakrauchen dar, welches für über 85% der Todesfälle durch Lungenkrebs verantwortlich zeichnet (Warren and Cummings 2013). Im Zigarettenrauch enthaltene kanzerogene Stoffe sind unter anderem Cyanide, Ammoniak, Formaldehyd, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine (Hecht 1999).

Weitere Risikofaktoren für das Lungenkarzinom stellen das Passivrauchen, der Konsum bestimmter Nahrungsmittel wie z.B. geräucherten Fleisches,

Alkoholkonsum, die Exposition gegenüber bestimmten Stoffen wie kristallinen Silikaten oder Asbest am Arbeitsplatz sowie genetische Faktoren dar (Molina, Yang et al. 2008).

1.1.2 Diagnostik

Erster Schritt der Diagnostik des NSCLC ist in der Regel der bildgebende Nachweis einer intrathorakalen Raumforderung mittels Röntgen-Thoraxaufnahme in zwei Ebenen und anschließender genauerer Erfassung durch eine Computertomographie des Thorax bei klinischem Verdacht auf ein Lungenkarzinom (Griesinger, Eberhardt et al. 2015).

Nachdem dieses geschehen ist, ist eine Biopsie der Läsion für die histopathologische Untersuchung erforderlich, die bronchoskopisch, per endobronchialen Ultraschall gesteuert transthorakal oder durch Mediastinoskopie/Thorakoskopie erfolgen kann (Serke and Schonfeld 2007). Die Biopsie erlaubt nun zum einen die Unterscheidung der NSCLC-Subtypen, zum anderen etwa die Abgrenzung von weiteren intrathorakalen Neoplasien, beispielsweise dem Kleinzelligen Lungenkarzinom oder Lymphomen, die jeweils anderer Therapien bedürfen. Darüber hinaus können in den Tumorzellen des Biopsates Amplifikationen, Mutationen oder Translokationen bestimmt werden, die gegebenenfalls individuelle und zielgerichtete Therapieansätze eröffnen (de Mello, Madureira et al. 2013).

Sobald ein NSCLC histopathologisch gesichert ist, muss eine Ausbreitungsdiagnostik erfolgen, das sogenannte Staging. Dieses ist für die weitere Therapieplanung essenziell, so unter anderem für die Identifizierung solcher Patienten, bei denen eine Operabilität gegeben ist (Serke and Schonfeld 2007). Hierfür ist eine Sonographie des Abdomens indiziert sowie ein Ganzkörper-PET/CT bei angedachtem kurativem Therapiekonzept, eventuell ergänzt durch ein MRT des Schädels. Bei Verdacht auf einen malignen Pleuraerguss ist eine Punktion mit Untersuchung des Punktates von Nöten (Griesinger, Eberhardt et al. 2015).

1.1.3 Stadieneinteilung und TNM-Klassifizierung beim NSCLC

Die TNM-Klassifikation (TNM=tumor, node, metastases) zur Stadieneinteilung (siehe Tab. 1) maligner Tumoren wird von der UICC (Union internationale contre le cancer) seit 1950 herausgegeben und stetig überarbeitet. Die aktuellste Version (7te Überarbeitung) für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom stammt von 2012.

Primär Tumor (T)

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor ≤ 3 cm in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
- T1a Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
- T1b Tumor > 2 cm, aber ≤ 3 cm in größter Ausdehnung
- T2 Tumor > 3 cm, aber ≤ 7 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen:
- infiltriert viszerale Pleura
 - befällt Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina
 - assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
- T2a Tumor > 3 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung
- T2b Tumor > 5 cm, aber ≤ 7 cm in größter Ausdehnung
- T3 Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung oder mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen:
- Brustwand (einschließlich Sulcus superior-Tumoren), Zwerchfell, Nervus phrenicus, Pleura mediastinalis, Perikardium parietalis;
- oder Tumor im Hauptbronchus weniger als < 2 cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge oder separate(r) Tumorknoten im selben Lappen wie der Primärtumor
- T4 Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Nervus laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina, vom Primärtumor getrennte(r) Tumorknoten in einem anderen Lappen derselben Seite

Regionäre Lymphknoten (N)

- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hilus- oder intrapulmonalen Lymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors)
- N2 Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
- N3 Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraclaviculären Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen
- M1a Vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen; Tumor mit Pleurametastasen oder malignem Pleura- oder Perikarderguss
- M1b Fernmetastasen

Stadium	T	N	M
Ia	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Ib	T2a	N0	M0
IIa	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
IIb	T2b	N0	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIa	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIb	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
	T1	N3	M0
	T2	N3	M0
	T3	N3	M0
IV	T4	N3	M0
	T Jedes N Jedes M1a oder 1b		

Tab.1: Stadieneinteilung des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Wittekind 2010).

1.1.4 Therapie des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

Die Therapiestrategie zur Behandlung des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms richtet sich vor allem nach der Krankheitsausdehnung (Abbildung 1).

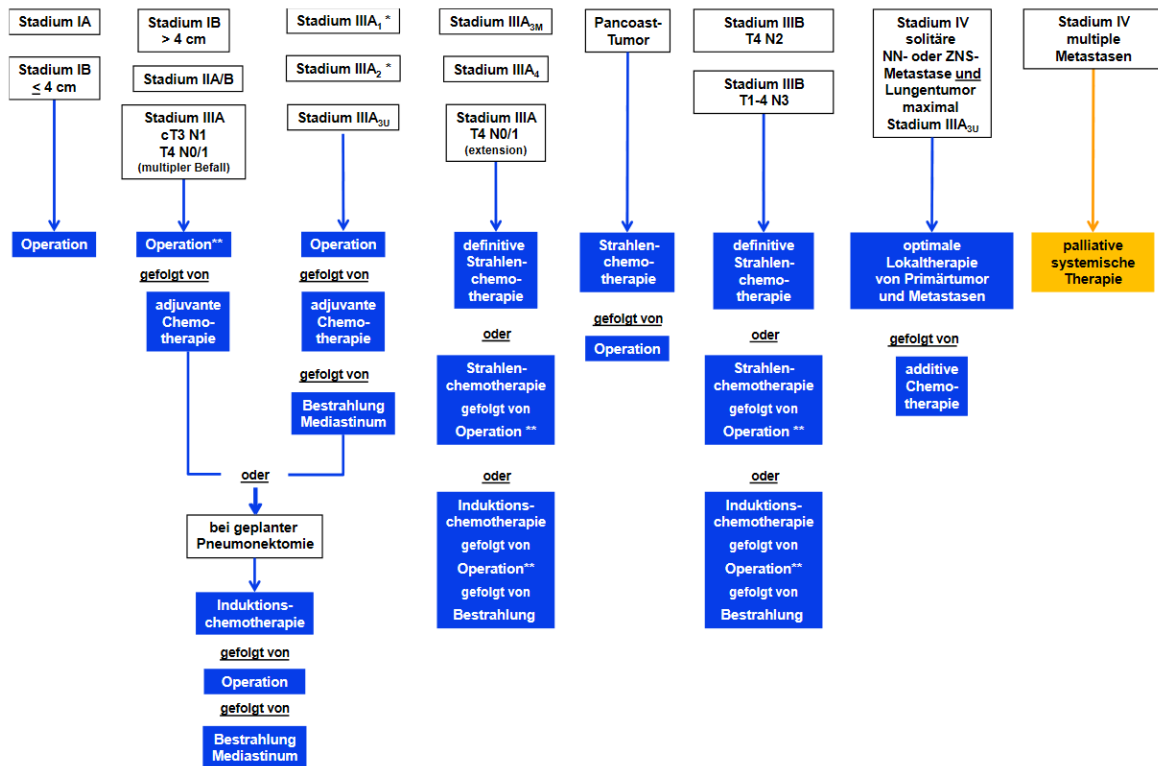


Abb.1: Übersicht der Therapiealgorithmen für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums (blaue Farbe- kurative Intention, gelbe Farbe- palliative Intention). (Griesinger, Eberhardt et al. 2015)

In den Stadien I und II stellt die chirurgische Resektion (Lobektomie mit Lymphadenektomie) den Grundpfeiler der Therapie dar, sofern die Patienten einen ausreichenden Allgemeinzustand aufweisen. Ab Stadium Ib erfolgen nach R0-Resektion adjuvant vier Kurse einer platinbasierten Chemotherapie (Camps, Felip et al. 2013). Am Westdeutschen Tumorzentrum Essen wird hierfür vorrangig die Kombination Cisplatin/Vinorelbine angewendet. Im Stadium Ib bei Tumorgröße >4 cm oder IIa und IIb kann auch eine neoadjuvante Chemotherapie erfolgen (Griesinger, Eberhardt et al. 2015).

Im Stadium III gestaltet sich die Therapie sehr komplex. Dieses beruht nicht zuletzt darauf, ob eine Resektabilität vorliegt oder nicht. Durch die Heterogenität der Erkrankung im Stadium III erfolgt eine weitere Subklassifizierung in sechs Gruppen, die sich vor allem hinsichtlich des Lymphknotenbefalls unterscheiden (Camps, Felip et al. 2013).

Je nach Substadium kann so sowohl eine Tumorresektion mit anschließender adjuvanter Chemotherapie und Bestrahlung in Frage kommen als auch ein neoadjuvantes Konzept mit initialer Chemo-/Strahlentherapie (sogenannte Induktionstherapie) und anschließender Operation bzw. initialer rein medikamentöser Therapie, die von einer Operation und sich anschließender Nachbestrahlung gefolgt wird. Darüber hinaus kann eine definitive Chemo-/Strahlentherapie mit kurativer Intention indiziert sein (Camps, Felip et al. 2013). Eberhardt und Kollegen verglichen aktuell in der ESPATÜ-Studie Überlebensdaten von Patienten, die entweder eine Resektion nach Chemo- und Chemoradiotherapie oder im Anschluss an die Induktionschemotherapie eine definitive Chemoradiotherapie erhielten. Dabei wurden in beiden Gruppen vergleichbare Überlebensraten erzielt (Eberhardt, Gauler et al. 2013).

Im Stadium IV ist die Therapieintention überwiegend palliativ. Ausnahme bildet die sogenannte oligometastatische Erkrankung, bei der beispielsweise solitäre cerebrale oder adrenale Metastasen vorliegen. In solchen Fällen kann, eine lokal kurativ behandelbare Situation vorausgesetzt, ein heilender Therapieansatz versucht werden (Griesinger, Eberhardt et al. 2015), (siehe auch Abb. 2).

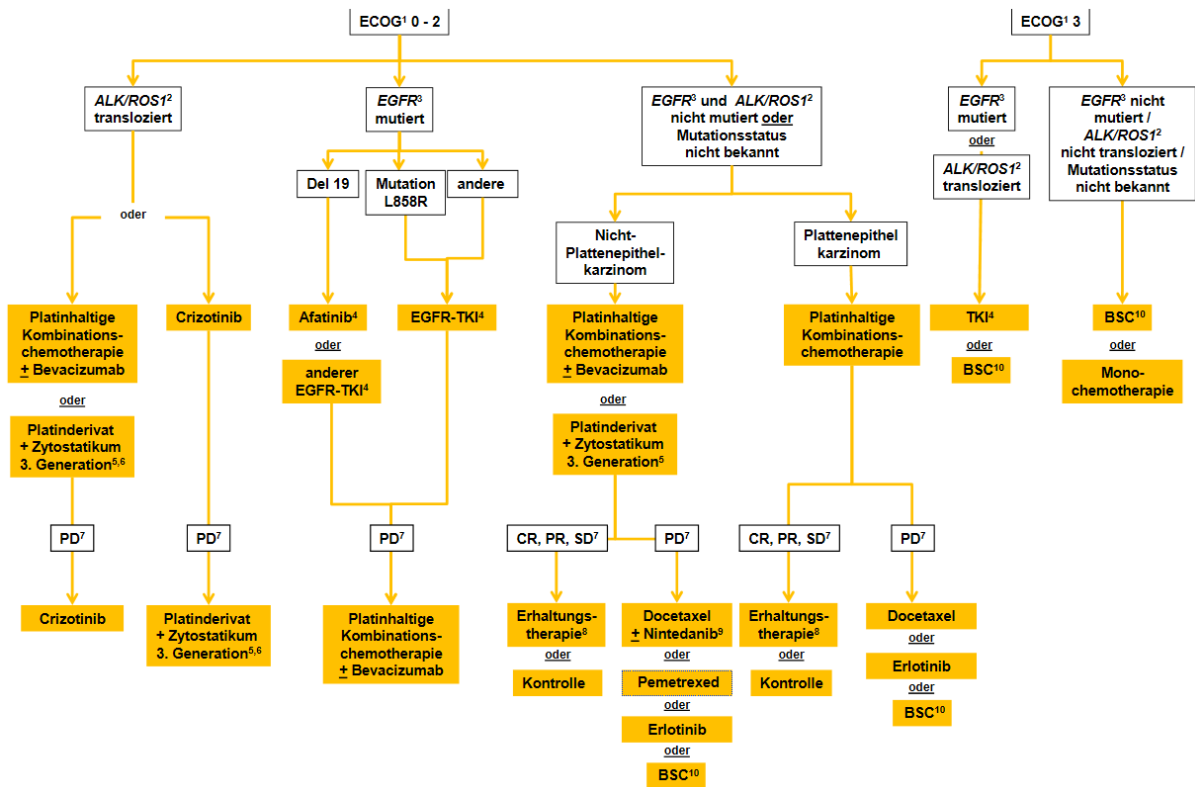


Abb.2: Leitlinie für die palliative, medikamentöse Erstlinientherapie des NSCLC in fortgeschrittenen Stadien, in Abhängigkeit des ECOG-Performance-Status und möglicher Mutationen und Translokationen, die zielgerichtete Therapieansätze erlauben.

(Griesinger, Eberhardt et al. 2015)

1.1.5 Prognose

Die Prognose des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, besonders im fortgeschrittenen Stadium, ist trotz zunehmender individueller Therapiemöglichkeiten weiterhin unbefriedigend. Im Stadium IA liegt das 5-Jahresüberleben bei 50%, im Stadium IIIA nur noch bei 19%, im Stadium IV beträgt das 5-Jahresüberleben lediglich 2% (Rami-Porta, Crowley et al. 2009). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich bereits etwa 70% der Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, welches keiner kurativen Therapie mehr zugänglich ist (Muinelo-Romay, Vieito et al. 2014).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

1.2.1 Überblick

Zirkulierende Tumorzellen wurden das erste Mal bereits 1869 von Thomas Ashworth beobachtet, der Zellen im Blut eines obduzierten Patienten beschrieb, welche denen des Primärtumors gleichen würden (Wicha and Hayes 2011). Dieser Beobachtung wurde aber für längere Zeit keine weitere Bedeutung beigemessen, bis 1967 Turnbull und Mitarbeiter erstmals das Streuen von CTC während einer Operation beobachteten und daraufhin die sogenannte „No-Touch-Isolation-Technique“ propagierten (Turnbull, Kyle et al. 1967). 1997 beschrieben dann erstmals Izbicki et al. EpCAM-positive Zellen in eigentlich für histologisch negativ befundenen Lymphknoten bei Patienten mit einem Ösophaguskarzinom, die prognostische Relevanz für den Patienten zeigten (Izbicki, Hosch et al. 1997).

CTC sind verantwortlich für die hämatogene Metastasierung eines Malignoms. Hierbei wächst der Tumor lokal und durchbricht die Basalmembran, sodass einzelne Zellen Kontakt zu anliegenden Blutgefäßen erhalten und sich vom Primärtumor lösen. Einige von ihnen überleben im Blutstrom, und nach einer angenommenen „Ruhephase“ der Tumorzellen beispielsweise im Knochenmark (Riethdorf and Pantel 2008) erfolgt eine Rückkehr aus der Zirkulation ins Gewebe, was schlussendlich zur Bildung von Mikro- und Makrometastasen führt. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass 2,5% der CTC in der Lage sind, Mikrometastasen auszubilden (O'Flaherty, Gray et al. 2012). Es konnte unter anderem für das Mammakarzinom nachgewiesen werden, dass bereits Tumoren geringer Ausbreitung und Größe Zellen in die Blutstrombahn abgeben (Husemann, Geigl et al. 2008).

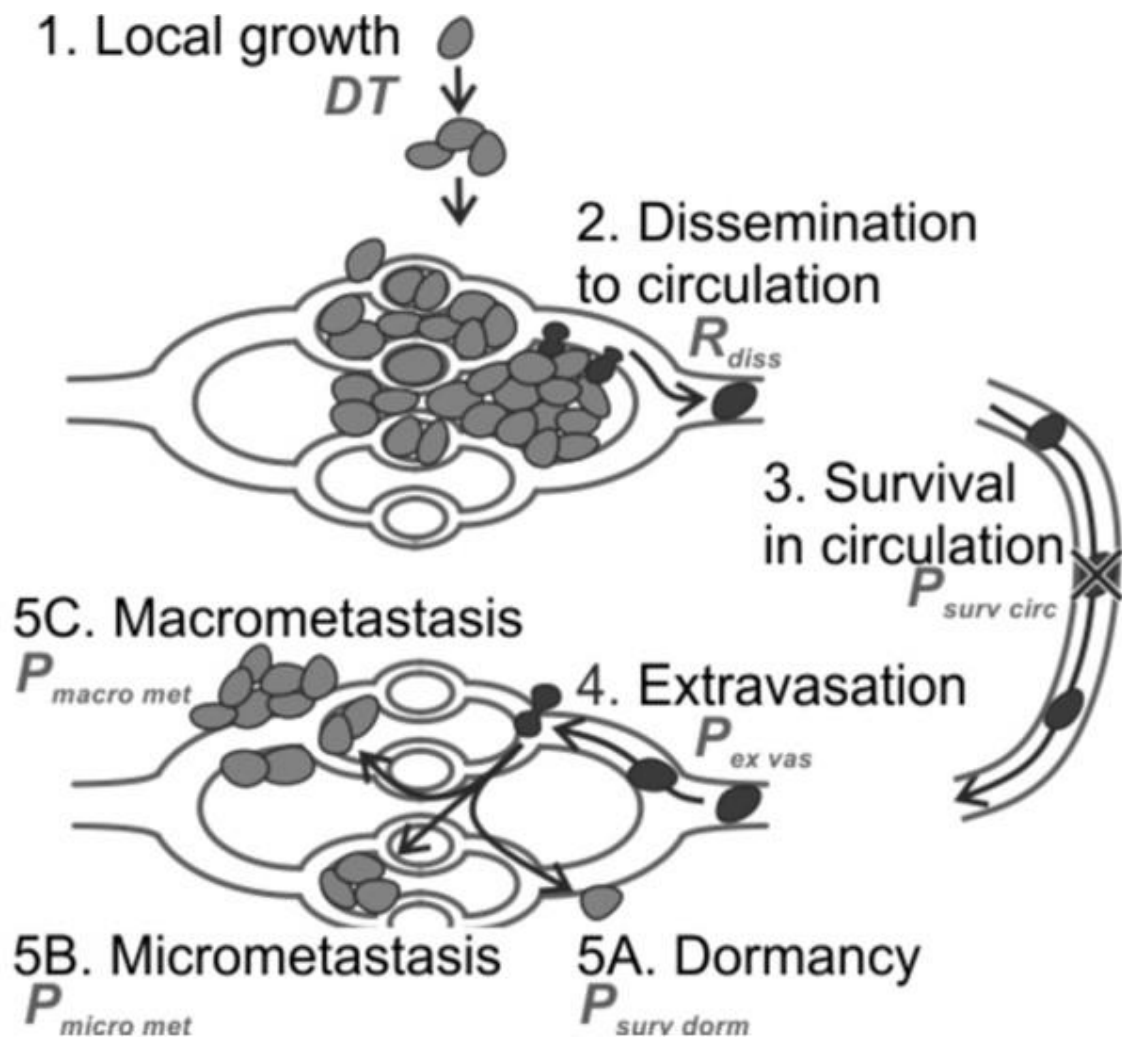


Abb.3: Schritte der Metastasierungskaskade. Zellen im Gewebe sind grau dargestellt, im Gefäßsystem schwarz.

(Coumans, Siesling et al. 2013)

CTC sind sowohl als Einzelzellen beschrieben, können aber auch in Zellclustern oder aggregiert mit anderen Blutzellen, hier vor allem Thrombozyten, vorkommen. (O'Flaherty, Gray et al. 2012).

Die Größe von CTC wird als sehr variabel und der Zellheterogenität in solidem Tumorgewebe gleichend beschrieben, ebenso die Kern-Plasma-Relation (Marrinucci, Bethel et al. 2007). Ein bestimmter beim Prostata- und kolorektalen Karzinom beobachteter CTC-Subtyp, der mit Stammzeleigenschaften und schlechter Prognose assoziiert ist, wird von Ligthart et al. als auffallend klein im

Vergleich zu anderen CTC skizziert. Des Weiteren spielt bei der Größe von CTC die Tumorentität offensichtlich eine Rolle (Ligthart, Coumans et al. 2013).

Auch die Viabilität von CTC ist nicht einheitlich. Neben scheinbar viablen CTC findet man überwiegend solche CTC in verschiedenen Stadien der Apoptose (Rossi, Basso et al. 2010).

Die Anzahl und Frequenz zirkulierender Tumorzellen bei Erkrankten verschiedener Karzinomentitäten ist schwierig anzugeben. So können unterschiedliche Detektionsmethoden verschiedene Ergebnisse liefern (Juan, Vidal et al. 2013). Darüber hinaus spielen das Erkrankungsstadium und die Krankheitsaktivität, die eventuell durch eine Therapie beeinflusst wird, eine entscheidende Rolle für die Anzahl von beispielsweise epithelialen CTC, woraus wiederum ein prognostischer Vorhersagewert resultieren kann (O'Flaherty, Gray et al. 2012).

Ein weiterer Faktor für quantitative Unterschiede der CTC ist die jeweilige Tumorentität. So konnten in einer Studie mittels CellSearch-System (siehe unter 1.2.4 Isolations- und Detektionsmethoden) beim kolorektalen Karzinom signifikant weniger CTC detektiert als beim Mamma- oder Prostatakarzinom (Ligthart, Coumans et al. 2013). Als Richtwert für die Häufigkeit findet sich 1 CTC auf 10^6 bis 10^7 Leukozyten (Young, Pailler et al. 2012).

1.2.2 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

Die EMT ist ein ursprünglich für die Embryonalentwicklung beschriebener, umkehrbarer Prozess, der Zellmigration und -invasion reguliert (Franco-Chuaire, Magda Carolina et al. 2013).

Viele Signale, die EMT in der Embryogenese einleiten und fördern, spielen auch in Tumoren eine Rolle. Einen entscheidenden Schritt in diesem Prozess stellt die Herunterregulation von E-Cadherin dar. Gleichzeitig werden aber auch verschiedene weitere Gene supprimiert, die eine epitheliale Differenzierung bedingen (Sanchez-Tillo, Liu et al. 2012).

Deutliche Hinweise darauf, dass EMT auch bei Gewebeinvasion und Metastasierung maligner Tumoren maßgeblich ist, liefern zahlreiche experimentelle Studien, in denen EMT in vitro induziert wurde oder in humanen Tumoren EMT-Merkmale nachgewiesen wurden. Ferner konnten Yu und Kollegen vor Kurzem zeigen, dass der Prozess der EMT während systemischer Therapie eine hohe Plastizität aufweist und jeweils bei Veränderungen im dominierenden Zelltyp mit entsprechender Resistenz oder Sensibilität des Tumors einhergeht (Yu, Bardia et al. 2013). Diese Tatsache erschwert den Nachweis der EMT-Charakteristika, denn es weist nur ein Teil der Zellen innerhalb eines Tumors mesenchymale Merkmale auf und der EMT-Prozess ist als Mesenchymal-Epitheliale Transformation umkehrbar (Creighton, Gibbons et al. 2013).

Eine große Rolle für die EMT-Initiierung und -promotion scheint das Mikromilieu zu spielen, welches die Tumorzellen und das Tumorstroma umgibt (Liberko, Kolostova et al. 2013). So akquirieren die Tumorzellen ein umgebendes Stroma aus verschiedenen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Zellen des Immunsystems und mesenchymalen Stammzellen. Diese schaffen ein entzündliches Mikromilieu, welches EMT-induzierende Signale generiert, auf die Karzinomzellen entsprechend reagieren (Chaffer and Weinberg 2011).

Entscheidende Akteure im EMT-Prozess stellen der Transforming Growth Factor beta (TGF- β), beta-Catenin (b-Catenin), Snail1 und Twist dar, die somit auch als EMT-Marker genutzt werden können (Lee, Dedhar et al. 2006). Plastin-3 ist ein weiterer, erst 2013 beschriebener EMT-Marker, der mit schlechter Prognose assoziiert ist, und von Blutzellen, die ebenfalls mesenchymalen Ursprungs sind, nicht exprimiert wird (Yokobori, Inuma et al. 2013). Ein Schaubild über Signalwege, die für EMT bedeutend sind, liefert Abbildung 3.

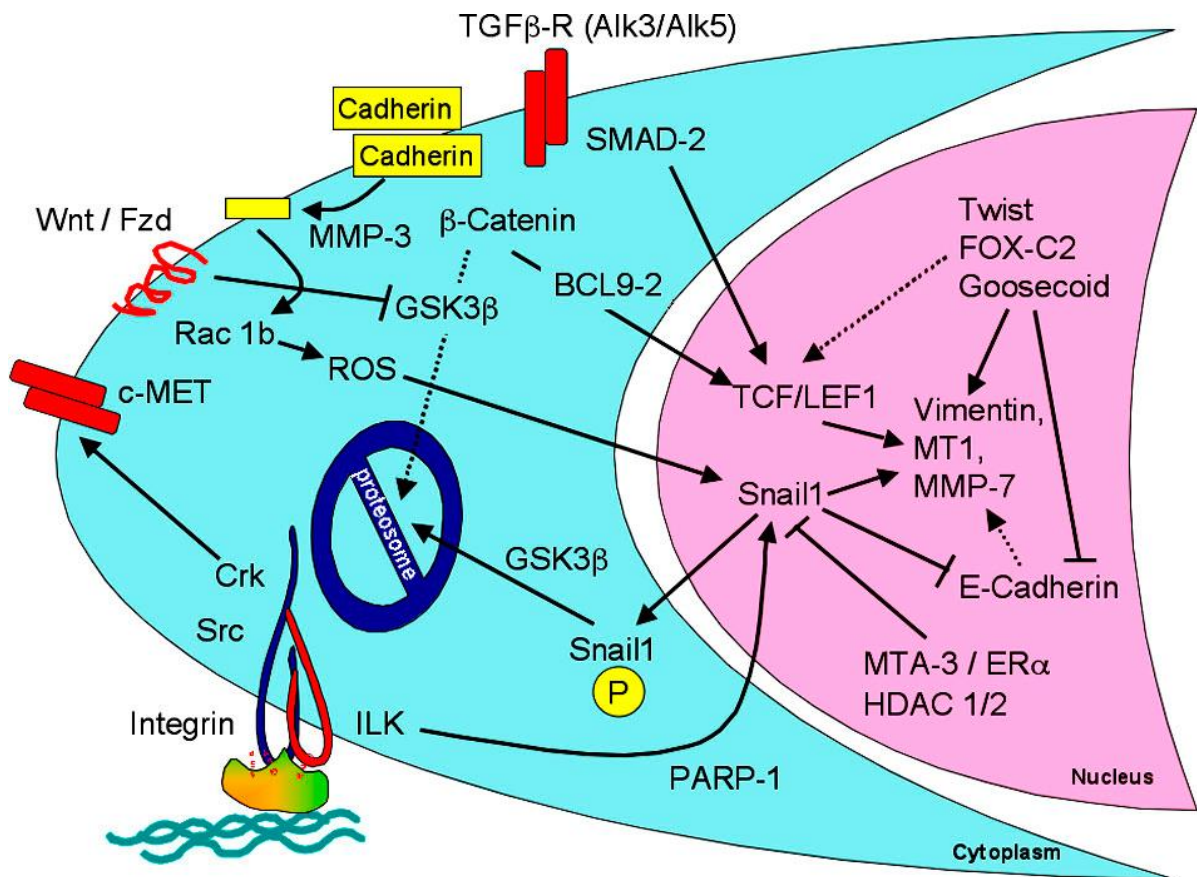


Abb.4: Bedeutende Signaltransduktionsmechanismen während der EMT. Eine Spaltung von E-Cadherin führt zu einer Aktivierung von Snail1. Die Inhibierung der Expression von E-Cadherin durch Twist und Snail1 bedingt die Expression von Vimentin und anderen mesenchymalen Proteinen, unter anderem durch die Aktivierung von β -catenin. Auch die c-MET-Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert EMT.

(Lee, Dedhar et al. 2006)

1.2.3 Tumorstammzellen („cancer stem cells“, CSC) beim NSCLC

CSC beim NSCLC werden mit der Initiierung von Tumorwachstum, einem hohen invasiven Potential sowie Resistenz gegenüber Chemotherapeutika assoziiert. Als charakteristisch gelten die Expression von CD133 und/oder CD44, erhöhte ALDH1-Expression sowie die Fähigkeit, einer DNA-Färbung mit Hoechst 33342 zu entgehen (Koren, Motaln et al. 2013). Überdies besitzen sie eine gesteigerte Resistenz gegenüber proapoptotischen Signalen (Chaffer and Weinberg 2011).

Stammzellartige CTC, die auch CD24 exprimieren, weisen gleichzeitig verstärkt mesenchymale Eigenschaften auf (Keysar and Jimeno 2010).

Auch Tumorzellen, die eine hohe ALDH1-Aktivität zeigen, besitzen Stammzeleigenschaften wie zum Beispiel charakteristische Proliferations- und Differenzierungseigenschaften und können CD133 exprimieren (Jiang, Qiu et al. 2009).

Die Entstehung von CSC ist bisher nur unzureichend verstanden. Mani et al. wiesen nach, dass EMT für die Generierung von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften verantwortlich sein kann. So wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Twist und Snail in immortalisierten Epithelzellen der Brust induziert, was zur Generierung von Zellen führte, die positiv für CD44 waren und charakteristische Stammzeleigenschaften aufwiesen (Mani, Guo et al. 2008).

Neben der EMT-induzierten Genese von CSC beschreiben Chaffer et Weinberg solche Tumorstammzellen, die schon zu Beginn der Karzinomentstehung präsent sind und den Tumor überhaupt in die Lage versetzen, ein Stroma zu aquirieren, welches EMT-Signale exprimiert und so zu weiteren CSC führt (Chaffer and Weinberg 2011).

1.2.4 Isolierungs- und Detektionsmethoden für CTC

Für die Isolierung, Detektion und Anreicherung von CTC gibt es mittlerweile zahlreiche Ansätze und Methoden, die sich verschiedener biologischer und physikalischer Eigenschaften von CTC bedienen (Alix-Panabieres and Pantel 2013). Aufgrund des begrenzten Verständnisses der Biologie von CTC und deren augenscheinlich großer Heterogenität ist es bisher jedoch nicht gelungen, einen Goldstandard zur Identifizierung und Anreicherung von CTC zu entwickeln (Yu, Stott et al. 2011).

Die gängigsten Methoden und Anwendungen sollen hier kurz vorgestellt werden:

Die physikalischen Eigenschaften Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit für die Anreicherung machen sich etwa die Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll, OncoQuick) oder das ISET (isolation by size of epithelial tumor cells) zu Nutze. Ein neuartiger versatiler Biochip selektiert sowohl nach Größe als auch nach

Deformierbarkeit der Zellen. Tumorzellen werden dabei als weniger deformierbar angesehen (Alix-Panabieres and Pantel 2013).

Immunzytologische Depletionsverfahren beruhen auf der antikörperbasierten Separation von Blutzellen, die charakteristische hämatopoetische Marker wie etwa CD45 oder CD19 aufweisen.

Die als einzige von der US Food and Drug Administration zugelassene Methode zur CTC-Detektion stellt das sogenannte CellSearch-System (Veridex) dar. Dieses basiert auf der immunzytologischen Detektion von CTC mittels EpCAM-Antikörpern, die an Eisennanopartikel gebunden sind und so eine immunomagnetische Detektion der gebundenen CTC erlauben (Riethdorf, Fritsche et al. 2007).

Eine weitere antikörperbasierte Methode ist der EPISPOT-Assay. Dieser detektiert nur viable CTC, die in der Lage sind, bestimmte Proteine zu exprimieren (Alix-Panabieres 2012).

Ebenfalls einen Ansatz zur CTC-Detektion stellen verschiedene mikrofluidische Systeme dar, in denen kleine Blutmengen bei laminarem Fluss durch Mikrokapillaren strömen. Diese können mit Antikörper-tragenden Mikropartikeln gegen verschiedene Oberflächenantigene von CTC versehen sein, unterschiedlich größenselektiv sein oder elektrische Felder aufweisen, die CTC aufgrund anderer elektrokinetischer Eigenschaften von hämatopoetischen Zellen trennen (Esmaeilsabzali, Beischlag et al. 2013). Die erste mikrofluidische Anwendung zur CTC-Isolation war der „CTC-Chip“ im Jahr 2007 (Nagrath, Sequist et al. 2007).

Eine neuartige Methode zur Detektion und Isolation ist ein mit Antikörpern gegen EpCAM beschichteter umfunktionierter Seldinger-Führungsdraht, der von der Firma Gilupi entwickelt worden ist. Dieser wird durch eine gewöhnliche Kanüle in eine Ellenbogenvene vorgeschoben und für 30 Minuten dort belassen, sodass im Blutstrom befindliche CTC an die Antikörper binden können (Saucedo-Zeni, Mewes et al. 2012).

Eine große Schwierigkeit ist nach wie vor die Detektion von CTC, die durch EMT epitheliale Eigenschaften komplett verloren haben. Detektions-Assays, die auf epithelialen Markern basieren, entgeht so die möglicherweise aggressivste und

damit prognosebestimmende CTC-Population (Alix-Panabieres and Pantel 2014). Kasimir-Bauer et al. etwa zeigten in einer Studie bei Brustkrebspatientinnen, dass 18% der Patientinnen, die positiv für CTC mit EMT-Marker-Expression waren, im *AdnaTest BreastCancer*, der auf der immunomagnetischen Anreicherung epithelialer Zellen basiert, CTC-negativ waren (Kasimir-Bauer, Hoffmann et al. 2012).

Eine Übersicht verschiedener Ansätze zur Isolierung von CTC liefert Abbildung 4.

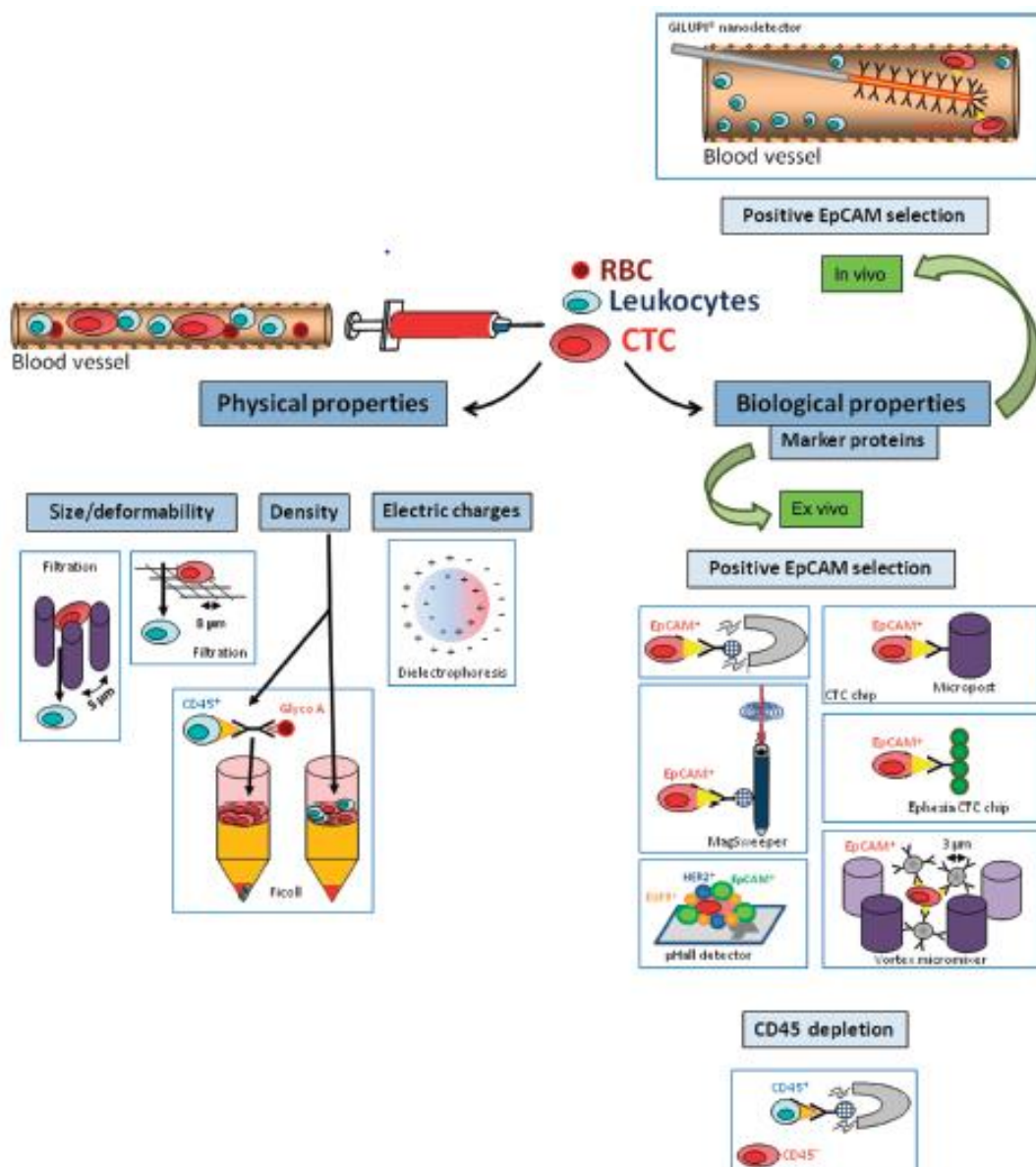


Abb.5: Übersicht verschiedener Methoden zur CTC-Detektion: Physikalische Eigenschaften, die zur CTC-Separation genutzt werden, sind Größe (Filtermembranen), Verformbarkeit (Mikrofluidische Chips), Dichte (Dichtegradientenzentrifugation) und elektrische Ladung

(Dielektrophorese). Biologische Eigenschaften meint hauptsächlich die Expression verschiedener Oberflächenmarker (Positiv- oder Negativselektion). Die einzige in-vivo-Anwendung ist derzeit der *Gilupi*-Nanodraht.

(Alix-Panabieres and Pantel 2013)

1.2.5 Ausgewählte molekulare Marker, die beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und zur Detektion von CTC Anwendung finden

Zytokeratine 1,4,8,14 (Pan-CK),18

Zytokeratine gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente, die zytoplasmatische Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen sind. Je nach Subtyp des epithelialen Gewebes können unterschiedliche Zytokeratine exprimiert werden. Dieses gilt auch für verschiedene Karzinome, sodass sich Zytokeratine als histopathologische Marker zur Bestimmung des Karzinomtyps verwenden lassen (Moll 1994). Insgesamt sind mehr als 20 verschiedene Zytokeratine beschrieben. (Barak, Goike et al. 2004). Die Expression von Zytokeratinen in verschiedenen NSCLC-Patienten ist sehr variabel, so wird etwa Keratin14 vermehrt von Plattenepithelkarzinomen, Keratin18 hingegen verstärkt von Adenokarzinomen gebildet (Chen, Cui et al. 2011).

EpCAM

EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) ist ein Glykoprotein, welches sich auf der Zellmembran epithelialer Zellen befindet. Es bewirkt sowohl Zell-Zell-Adhäsion als auch Zell-Matrix-Adhäsion. Während es von gesunden Epithelien nur schwach exprimiert wird, ist es in Karzinomen deutlich stärker nachzuweisen. Aus diesem Grund hat EpCAM eine sehr große Bedeutung für die Detektion epithelialer Tumorzellen (Schnell, Cirulli et al. 2013).

Twist

Die Twist-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung spielen. Während sie in den meisten Geweben gesunder Erwachsener nicht mehr nachzuweisen sind, werden sie bei vielen malignen Tumoren reaktiviert. So fördert Twist in malignen Tumorzellen ebenso wie bei embryonalen undifferenzierten Zellen die Migration dieser Zellen in andere

Gewebe und deren invasives Potential (Pallier, Cessot et al. 2012). Eine Aktivierung von Twist bewirkt eine gesteigerte Expression von N-Cadherin und gleichzeitig eine Unterdrückung des epithelialen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, was als Charakteristikum für EMT gilt (Khan, Chen et al. 2013). Für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom ist ein Zusammenhang zwischen der Expression von Twist und schlechter Prognose beschrieben (Hui, Zhang et al. 2013).

Snail1

Snail1 ist ein Zinkfingerprotein aus der Snail-Familie, die drei Proteine beinhaltet. Seine Expression kann durch Bindung an die DNA der Zelle die Expression von E-Cadherin und dem Zell-Zell-Adhäsionsmolekül CAR (Coxsackie adenovirus receptor) supprimieren. In gewöhnlichen epithelialen Zellen ist Snail1 nicht nachweisbar. Es korreliert mit Malignität und Differenzierungsgrad eines Karzinoms (Sanchez-Tillo, Liu et al. 2012).

Vimentin

Vimentin ist ein Strukturprotein, welches zu den Intermediärfilamenten gehört und in mesenchymalen Zellen allgegenwärtig ist. Es kann ebenfalls von Tumorzellen epithelialer Malignome gebildet werden, wenngleich seine genaue Funktion dort unklar ist. Vimentin ist daher ein weiterer bedeutender Marker für die EMT (Satelli and Li 2011).

N-Cadherin

N-Cadherin (engl. Akronym für Neural calciumdependent adhesion) ist ein Zelladhäsionsmolekül, das von mesenchymalen Zellen exprimiert wird. In malignen epithelialen Tumoren ist es im Rahmen von EMT entscheidend beteiligt an der Ausprägung von Malignitätsmerkmalen wie Invasivität oder Metastasierungspotential (Zhang, Liu et al. 2013).

CD133

CD133 (auch Prominin1) ist ein Zelloberflächenprotein, welches aus fünf transmembranären Segmenten besteht, und originär für hämatopoetische Stammzellen beschrieben wurde. Zwischenzeitlich wurde es auch auf anderen

Stammzelltypen nachgewiesen, unter anderem auf Tumorzellen, die stammzellartige Eigenschaften besitzen (Li 2013).

ALDH1

Aldehyddehydrogenasen katalysieren in Stammzellen die Bildung von Retinsäuren, welche eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion bei der Differenzierung von Zellen einnehmen (Keysar and Jimeno 2010). Während ALDH1 als Stammzellmarker in Mamma- und Prostatakarzinomen mit schlechter Prognose korreliert, ist eine erhöhte Expression in Ovarialkarzinomen als prognostisch günstig zu betrachten (Koren, Motain et al. 2013).

1.2.6 Klinische Aspekte von CTC allgemein sowie im Speziellen beim NSCLC

CTC könnten etwa zur Diagnosesicherung, als Alternative oder Ergänzung zu invasiven Biopsien oder als Therapie- bzw. Verlaufsmonitoring Anwendung finden (Liberko, Kolostova et al. 2013). Da es darüber hinaus deutliche Unterschiede im Rezeptorstatus zwischen Primärtumorgewebe und CTC geben kann, können CTC sogar ein eigenes therapeutisches Ziel darstellen, welches durch eine am Primarius orientierte Therapiestrategie nur unzureichend erfasst wird (Giordano and Cristofanilli 2012). Für CTC bei Brustkrebspatientinnen etwa konnte gezeigt werden, dass CTC dort grundsätzlich „triple-negativ“ erscheinen, auch wenn der Primarius Hormonrezeptoren (Östrogen und/oder Progesteron) oder Her2/neu exprimiert (Fehm, Hoffmann et al. 2009).

Bei diversen Karzinomentitäten ist inzwischen eine prognostische Aussagekraft für CTC nachgewiesen, u.a. bei metastasierten Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinomen (Juan, Vidal et al. 2013). Die meisten Studien zu CTC und deren klinischem Einfluss existieren dabei zum Mammakarzinom (Liberko, Kolostova et al. 2013).

Ein prognostischer Vorhersagewert für CTC beim NSCLC wurde unter anderem durch Krebs et. al. für Patienten im Stadium III und IV beschrieben. Dort war eine

Anzahl epithelialer CTC von kleiner als fünf in 7,5 ml Patientenblut, detektiert mittels CellSearch-System, signifikant prädiktiv für eine schlechtere Prognose (Krebs, Sloane et al. 2011). Es wird jedoch in einer Arbeit von Königsberg et al. deutlich, dass bei weitem nicht alle CTC EpCAM exprimieren. Das Verhältnis EpCAM-positiver zu EpCAM-negativen Zellen ist dabei immer von der jeweiligen Anreicherungsmethode abhängig und somit nicht abschließend zu bestimmen (Königsberg, Obermayr et al. 2011).

Hofman et al. konnten an NSCLC-Patienten mit resektablen Tumoren zeigen, dass eine präoperativ mittels ISET-System (siehe oben) detektierte höhere CTC-Zahl mit schlechterer Prognose für die Patienten behaftet ist (Hofman, Bonnetaud et al. 2011).

Für eine prognostische Vorhersage kann auch die PCR-basierte CTC-Detektion von *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) -Mutationen (DelEx19) in CTC bei *EGFR*-mutierten pulmonalen Adenokarzinomen dienen. Der Nachweis von CTC anhand einer *EGFR*-Mutation geht bei den betreffenden Patienten im Vergleich zu solchen ohne CTC-Nachweis mit einer signifikant verkürzten Zeit bis zum Therapieversagen einher. Bei Mutationen gelingt aufgrund der hohen Spezifität der genetischen Veränderungen dieser CTC-Nachweis auch ohne Anreicherung epithelialer Zellen (Breitenbuecher, Hoffarth et al. 2014).

2 Zielstellungen

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Fragestellung ist, ob es eine klinische Anwendung für die Charakterisierung der verschiedenen Subtypen zirkulierender Tumorzellen beim NSCLC geben könnte.

So ist Ziel dieser Arbeit, zirkulierende Tumorzellen beim NSCLC anhand verschiedener immunologischer und molekularer Marker zu identifizieren und zu charakterisieren. Neben epithelialen Tumorzellen stehen dabei mesenchymale und stammzellartige Tumorzellen im Fokus, die keine epithelialen Eigenschaften aufweisen bzw. diese teilweise verloren haben. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und real-time qRT-PCR wird die klinisch-prognostische Relevanz der Subtypen untersucht.

Ferner wird die Anwendung der CTC für weitere Methoden der Routinediagnostik überprüft. Dafür soll mittels einer speziellen Technik, der sogenannten „FICTION“-Technik, Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kombiniert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Plastikmaterial für die Aufarbeitung der Blutproben, die RNA-Extraktion und die PCR wurden von den Firmen Greiner Bioscience, Eppendorf, Thermo Fisher Scientific, BD Biosciences, Nerbe Plus und Roche verwendet, Objektträger aus Glas von den Firmen Marienfeld und Hologic.

3.2 Geräte

Gerät	Marke
Alpha Unit Block Assembly	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000 Model BIOREVO; Keyence
Inkubator	HeraCell 240i; Thermo Fisher Scientific
Magnetpartikelprozessor	KingFisher mL; Thermo Fisher Scientific
Mikroliterzentrifuge	Mikro 220R; Hettich Lab Technology
Mikrovolumen-Spektrophotometer	NanoDrop 1000; PEQLab
PCR Analysesystem	LightCycler 480; Roche Diagnostics
PCR Workstation	PEQLab
Pipetten	Eppendorf und Gilson
Pipettierhilfe	Pipettus; Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank	Gelaire BSB4; Flow Laboratories
Thermoschüttler	Grant-bio; Grant Instruments
Tischzentrifuge	Rotanta 46 RS; Hettich Lab Technology

Vortexer	Paramix II; Julabo
Wasserbad	Memmert
Zyto-Zentrifuge	Cellspin II; Tharmac

3.3 Chemikalien und Lösungen

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Anti-Fading Medium Prolong Gold	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories GmbH
Essig-Säure	Fluka
Ethanol	Sigma-Aldrich
F10 Nutrient Mixture (Ham)	Gibco
FBS Superior	Biochrom AG
FCR-Blocking Reagent	Miltenyi Biotec GmbH
Ficoll Paque Plus	GE-Healthcare
Fixo Gum-Montagekleber	Marabu
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Hepes Puffer	Sigma-Aldrich
Lysispuffer RLT	Qiagen
Methanol	Sigma-Aldrich
MITO plus Serum Extender	BD Bioscience
PBS	Invitrogen
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	BD Bioscience
Sodium Pyruvat	PAA Laboratories GmbH
SSC-Puffer	Gibco
TBS Tween	Thermo Fisher Scientific
Triton-X	Fluka

Tween 20 Fluka

3.4 Kommerzielle Kits

MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit (192)	Qiagen
QuantiFast SYBR Green RT PCR Kit	Qiagen
RQ1 RNase-Free DNase	Promega

3.5 Immunomagnetische Beads

Dynabeads® sind superparamagnetische, gleichgroße Polymerbeads, die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind.

Dynabeads® CD45	Invitrogen
Dynabeads® CD15	Invitrogen
Dynabeads® Epithelial Enrich (EpCAM)	Invitrogen

3.6 Antikörper

Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung:

Maus-anti-CD45	abcam ab8216
Kaninchen-anti-CD45	abcam ab10559
Meerschwein-anti-Pan-CK	antibodies-online ABIN126062
Kaninchen-anti-EpCAM	abcam ab32392
Maus-anti-EpCAM	CellSignaling #2929
Kaninchen-anti-Vimentin	Epitomics #2707-1
Kaninchen anti-N-Cadherin	Epitomics#2019-1
Kaninchen anti-CD133	biorbyt orb18124

Sekundäre Antikörper für IF:

alle von Jackson ImmunoResearch

Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor488-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

Ziege-anti-Maus Cy3-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

Ziege-Anti-Kaninchen Cy3-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

Ziege-anti-Meerschwein AlexaFluor647-konjugiertes AffiniPure F(ab')₂ Fragment

Ziege-anti-Maus FITC-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

3.7 Sonde für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FGFR1/Cen 8q

Abnova FG0049

3.8 Primer

QuantiTect Primer Assay; Qiagen:

Epithelial Cell Adhesion Molecule	<i>EpCAM</i>	QT00000371
Keratin18	<i>KRT18</i>	QT01846327
Twist1	<i>TWIST1</i>	QT00011956
Snail1	<i>SNAI1</i>	QT00010010
Prominin1 (CD133)	<i>PROM1</i>	QT00075586
Aldehyddehydrogenase 1	<i>ALDH1A1</i>	QT00013286

MWG Eurofins:

β-Aktin *BACT* forward: 5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'
reverse: 5'-
TCCTTAATGTACGCACGATTT-3'.

3.9 Methoden

3.9.1 Herkunft und Entnahme der Patientenblutproben zur Untersuchung auf zirkulierende Tumorzellen

Die für diese Arbeit genutzten Blutproben von NSCLC-Patienten wurden peripher-venös in 4x10 ml Citrat-Monovetten gewonnen, bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet. Die Sammlung der Proben erfolgte jeweils nach Aufklärung und Einwilligung in die Studie, welche durch die Dr. Werner Jackstädt-Stiftung gefördert wurde, durch den Patienten/die Patientin. Ein entsprechender Ethikantrag für die Studie lag vor (12-5047-BO). Die Diagnose NSCLC war jeweils bei Therapiebeginn durch ein pathologisches Institut gesichert worden. Es wurden Proben untersucht, die im Zeitraum von November 2011 bis Dezember 2012 fortlaufend gesammelt wurden.

Für die Negativ- und Positivkontrollen wurden je 20 ml Blut von freiwilligen Probanden ohne bekannte Malignome untersucht bzw. dieses mit HepG2-, A549-, MSC4-, GIST- oder Zellen der Linie K562-CD133:IEG versetzt (Spiking-Experimente).

Jede Patientenblutprobe (4x10 ml) wurde als Doppelansatz verarbeitet, je 20 ml für molekularbiologische Untersuchungen (real-time qRT-PCR) und je 20 ml für morphologische Untersuchungen (Immunfluoreszenzfärbungen).

3.9.2 Verwendete Zellreihen für Positivkontrollen

Als Positivkontrollen kamen sowohl für die Färbungen als auch die PCR-Experimente verschiedene Zellreihen zum Einsatz. Zur Kontrolle für epitheliale Marker (Zytokeratine bzw. EpCAM) wurden die humanen Karzinomzelllinien HepG2 (Hepatozelluläres Karzinom), HCT116 (Kolonkarzinom) sowie A549 (Adenokarzinom der Lunge) verwendet. Diese wurden von der American Type Tissue Collection (ATTC) bezogen und nach entsprechenden Vorgaben kultiviert. Mesenchymale GIST882 Zellen von Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sebastian Bauer (Innere Klinik/Tumorforschung) zur Verfügung gestellt. Die bereits gewaschenen Zellpellets

wurden in PBS aufgenommen, auf Objektträger getropft und an der Luft getrocknet bzw. für Genexpressionsanalysen mit RLT-Puffer lysiert. Die Arbeitsgruppe PD Dr. Giebel stellte MSC4-Zellen (mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark) zur Verfügung. Die beiden letztgenannten wurden als Kontrollen für die verwendeten EMT-Marker genutzt. Darüber hinaus stellte die AG Giebel die konstant CD133 exprimierende Zelllinie K562-CD133:IEG als Positivkontrolle für den Stammzellmarker CD133 zur Verfügung, welche durch lentiviralen Gentransfer der CD133/Prominin-1 Splice-Variante s1 (GenBank accession number AF507034) mittels einer cDNA-IRES-eGFP Expressionskassette hergestellt wurde (Gorgens, Ludwig et al. 2014).

Zur Etablierung der FICTION-Technik wurde als Kontrolle die Lungenkarzinomzelllinie NCI-1581 verwendet, die freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Martin Schuler zur Verfügung gestellt wurde.

3.9.3 Isolation der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die mononukleäre Zellfraktion des peripheren Blutes, unter der auch die CTC zu erwarten sind, wurde mittels Ficoll-Paque-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu werden neutrale, hoch-verzweigte Polysaccharide mit großer Molekülmasse verwendet, deren Dichte so beschaffen ist, dass Erythrozyten, Thrombozyten und tote Zellen diese Schicht passieren können, während die PBMC-Fraktion (peripheral blood mononuclear cells, hauptsächlich Monozyten sowie Lymphozyten) sich in der Interphase konzentriert (auch als buffy-coat bezeichnet, siehe Abb.5).

Jeweils 20 ml einer mittels Citrat antikoagulierten Vollblutprobe wurden in ein Leukosep-Röhrchen gegeben, welches zuvor mit 15 ml Ficoll-Paque gefüllt und 3 Minuten bei 300 x g (Gravitationskonstante) zentrifugiert worden ist, sodass sich das Separationsmedium unter der porösen Polyethyltrennscheibe sammelt. Zur Verdünnung wurden 10 ml PBS hinzugegeben und die Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei 1600 x g durchgeführt.

3.9.4 Sequentielle Anreicherung der Tumorzellen mittels Dynabeads® und King Fisher Magnetpartikelprozessor

Die gewaschenen PBMC-Pellets wurden in je 1 ml Waschpuffer (PBS; 0,1% BSA) suspendiert und in Position B eines King Fisher Tubes gegeben. In Position A wurden 25µl Anti-CD45 Dynabeads® und 975µl Waschpuffer pipettiert. Position C wurde mit 5 µl Epithelial Enrich-Dynabeads® (EpCAM) und 995 µl Waschpuffer, Position D mit 1 ml Waschpuffer befüllt und in Position E wurden 500µl Waschpuffer zum Resuspendieren der EpCAM-positiven Zellen vorgelegt. Mit Hilfe des King Fisher Magnetpartikelprozessors wurden die Anti-CD45-Beads in Position A zunächst gut durchmischt, vom Magneten aufgenommen und in Position B überführt. Dort wurden die PBMCs mit CD45-Dynabeads gut durchmischt und für 30 Minuten inkubiert, wobei hämatopoetische Zellen an die Beads gebunden und so mit dem Magneten separiert (zurück in Position A) wurden. Dieses bedingt eine (partielle) Depletion CD45-positiver Zellen und folglich eine Voranreicherung von CTC in Position B (Negativ-Selektion). Anschließend wurden die Anti-EpCAM-Beads in Position C gut durchmischt, vom Magneten aufgenommen und in Position B überführt. Während einer wiederum 30-minütigen Inkubation wurden die EpCAM-positiven Zellen an die Beads gebunden, vom Magneten aufgenommen, in Position D gewaschen und schließlich in Position E in Waschpuffer resuspendiert (Positiv-Selektion).

Für die real time qRT-PCR-Versuche wurden jeweils die EpCAM-positiven Fraktion (Position E), sowie die verbleibende CD45- und EpCAM-depletierte Zellsuspension („Restzellsuspension“) (Position B) zentrifugiert und in Lysispuffer (RLT /DTT) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde nur eine Negativ-Selektion durchgeführt, wobei 25 µl Anti-CD15-Beads anstelle der EpCAM-Beads in Position C pipettiert wurden. Die erhaltene Zellsuspension wurde per Cellspin auf Objektträger überführt.

Diese Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert und ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt (Nel, Baba et al. 2013).

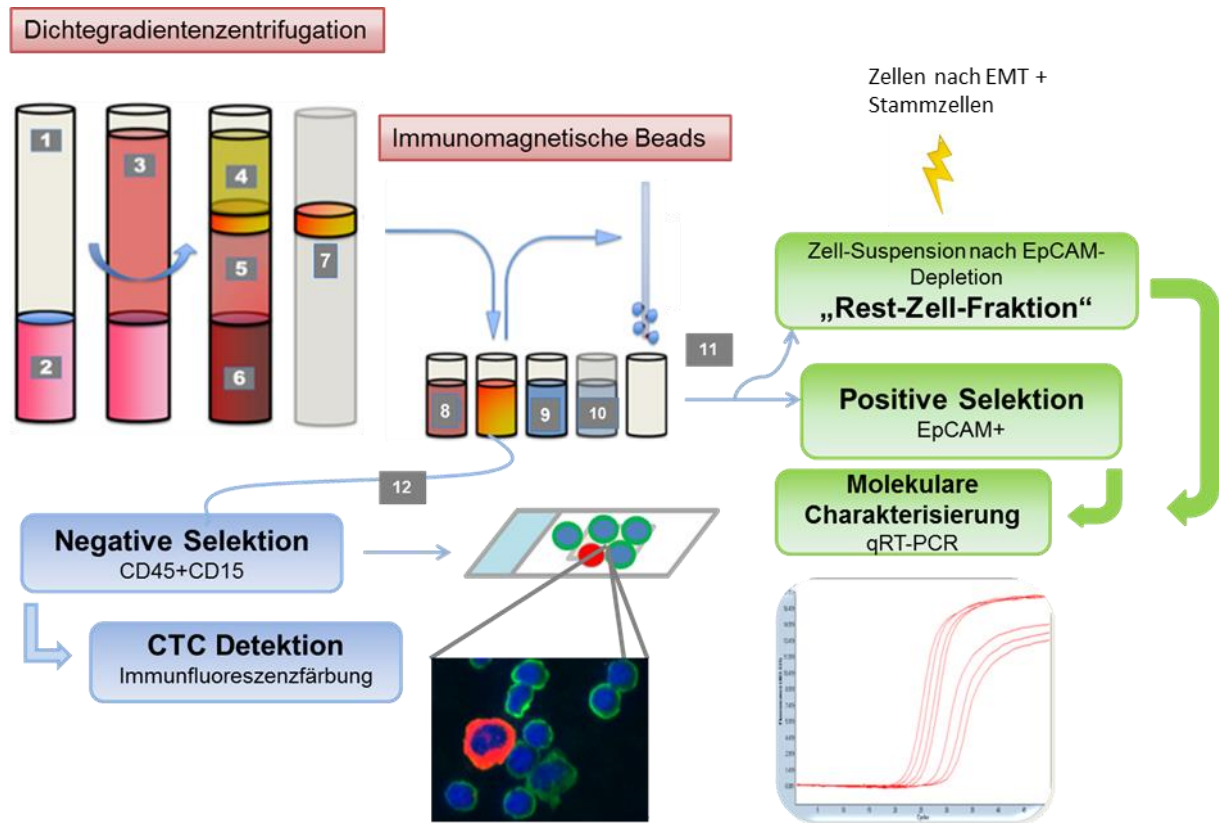


Abb.6: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Methode: 1. Leucosep-Röhrchen; 2. Separationsmedium; 3. Vollblut/PBS-Gemisch; 4. Plasma; 5. Separationsmedium nach Zentrifugation; 6. Erythrozyten; 7. Interphase mit PBMC incl. CTC (buffy coat); 8. Anti-CD45-Beads (Position A); 9. EpCAM-Beads (Position C) bzw. CD15 Beads bei Negativ-Selektion; 10. Waschpuffer (Position D); 11. EpCAM-Bead-gebundene CTC: zur RNA-Extraktion für real-time qRT-PCR, aber auch Cellspins für Immunfärbung möglich (Position E); 12. depletierte Bead-freie Zellsuspension: Cellspin für Immunfärbung (Position B). Abbildung abgeändert nach Nel, Baba et al. 2013.

3.9.5 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung von CTC-Subtypen nach Negativselektion

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

Perm/Wash (BD) nach Hersteller Anleitung verdünnen:

5 ml Perm/Wash

45 ml H₂O

Blockierungspuffer:

50 ml PBS

5 ml FBS (10%) bzw. alternativ 10% Milchpulver

150µl Triton X-100 (0,3%)

Antikörperverdünnungspuffer:

50 ml PBS

0,5 ml FBS (1%)

150µl Tween 20 (0,3%)

Waschpuffer:

50 ml PBS

50 µl Tween (0,1%)

DAPI-Lösung (1µg/ml):

50 ml PBS

50µl DAPI

3.9.6 Procedere für die Immunfluoreszenzfärbung

Zu Beginn wurden die Zellen auf den Objektträgern für fünf Minuten in Methanol fixiert. Das Methanol verursacht dabei gleichzeitig eine Permeabilisierung der Zellmembranen, sodass die verwendeten Antikörper hindurchgelangen können. Nun wurden die Objektträger eine halbe Stunde in Blockierungspuffer überführt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.

Anschließend erfolgte das Auftragen des Primärantikörpers, nachdem dieser 1:400 mit einem Verdünnungspuffer verdünnt worden ist. Pro Objektträger wurden 100 µl des verdünnten Antikörpers verwendet und diese 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte das Auftragen des Sekundärantikörpers in identischer Verdünnung und Menge und eine

Inkubation über 30 Minuten bei 37°C, dann ein weiterer Waschschritt und die anschließende DAPI-Kernfärbung, wobei die Objektträger („Slides“) für jeweils 5 Minuten in eine DAPI- Lösung überführt wurden. Nach einem weiteren Waschen erfolgte am Schluss das Eindecken mithilfe eines Eindeckmediums und Deckglases.

3.9.7 RNA-Extraktion aus CTC und DNA-Verdau

Jede Probe wurde eingangs mit 350 µl RLT-DTT-Gemisch zum Lysieren der Zellen versetzt. Die Proben wurden nach gründlichem Vortexen zentrifugiert, sodass der Überstand zur RNA-Extraktion mithilfe des KingFisher™ Magnetprozessors (Thermo scientific) verwendet werden konnte. Hierbei wurde das MagAttract RNA Cell Mini M48 (192) Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt.

Nach Beendigung der Extraktion wurde ein DNA-Verdau mithilfe des *RQ1 RNase free DNase Kit* (Promega) durchgeführt.

Als Kontrolle für eine erfolgte RNA-Extraktion wurde mittels *Nano-Drop* die RNA-Konzentration und -Reinheit in der Probe bestimmt.

3.9.8 Quantitative real-time Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Für die One-Step-qRT-PCR wurden *QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kits* und *QuantiTect primer assays* (beide Qiagen) der folgenden Gene verwendet: *Keratin18*, *EpCAM*, *Twist1*, *Snail1*, *CD133* und *ALDH1*. Als Referenzgen-Gen wurde β -Aktin (BACT; Eurofins MWG) verwendet: F: 5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'.R: 5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'. Zur Expressionsbestimmung der einzelnen Gene wurde jeweils eine Dreifachbestimmung auf 96-well Platten unter nachfolgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 10 Minuten bei 50°C und 5 Minuten bei 90°C für RT und Denaturierung. Anschließend 50 Zyklen 10 s bei 95°C und 30 s bei 60°C. Als interne Standards wurden Triplikate von Kontroll-RNAs (je 10 ng/µl) aus HepG2-, HCT116- und A549-Zellen sowie eine Negativkontrolle (Tris-HCl) mitgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Genexpressionen zu gewährleisten. Pro well wurden 7,5 µl SYBR Green Master Mix (enthält Taq-Polymerase, dNTPs, einen Referenzfarbstoff sowie geeignete Puffer), 0,15 µl Reverse Transkriptase, 1 µl des

entsprechenden Primers, 4,35 µl RNase-freies H₂O sowie 2 µl der jeweiligen RNA pipettiert. Für die Versuche wurde ein Roche LightCycler480 verwendet.

Aus den ermittelten CT-Werten der jeweiligen Marker wurde anschließend anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode eine Ratio zur Expression des verwendeten Housekeeping-Gens β -Aktin gebildet und diese zur besseren Übersichtlichkeit der Werte mit 100 multipliziert.

3.9.9 Detektion und Quantifizierung von Marker-positiven CTC nach Negativ-Selektion

Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes erfasst. Die Quantifizierung der Subpopulationen auf einem gefärbten Objektträger erfolgte in der 20fachen Vergrößerung. Da ein Objektträger in dieser Vergrößerungsstufe aus 1380 Gesichtsfeldern besteht, erschien es unmöglich, jedes Feld auszuwerten. So wurden 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Slide ausgewertet. Um eine Vergleichbarkeit der Zellzahlen auf den Objektträgern verschiedener Patienten zu erreichen, wurden die gezählten CTC einer Subgruppe auf 1000 Leukozyten des Patienten normalisiert. Für die Normalisierung der Leukozyten wurde das zum gleichen Zeitpunkt bestimmte (Differential-) Blutbild aus der Routinediagnostik verwendet.

3.9.10 Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und „FICTION“-Technik an CTC

Neben verschiedenen Oberflächenmarkern und Zellstrukturproteinen, die Hinweise auf unterschiedliche Eigenschaften der zirkulierenden Tumorzellen geben, gibt es auch genetische Alterationen in Tumorzellen, die prognostisch und therapeutisch von großer Bedeutung sein können (z.B. FGFR1, c-MET, EML4-ALK und weitere). So bietet es sich an, Genamplifikationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung darzustellen auf bereits vorher durch Fluoreszenzfärbung markierten CTC. Kombinieren lassen sich beide Verfahren mithilfe der sogenannten FICTION-Technik. Dieses Kürzel steht für "fluorescence immunophenotyping and interphase

cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms” (Martin-Subero, Chudoba et al. 2002). Diese Methode findet bereits seit einigen Jahren Anwendung, vor allem in der Lymphomforschung, aber beispielsweise auch zur Detektion zirkulierender Zytokeratin-positiver Zellen beim Kolonkarzinom mit gleichzeitiger ERBB2-Genstatus Evaluation (Campos, Luque et al. 2013).

Zur Durchführung der FICTION-Experimente diente als Grundlage eine 2008 von Campos et al. veröffentlichte Arbeit, welche auch ein Protokoll für die Fixierung der mittels IF-Färbung detektierten Tumorzellen enthält, sodass die IF-Färbung auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung überdauert (Campos, Prior et al. 2008).

Explizites Vorgehen:

Die Objektträger wurden anhand des oben beschriebenen Ablaufs IF-gefärbt. Zur Fixierung der Färbung für die nachfolgende FisH wurden die Objektträger dann für 10 Minuten in Carnoy'sche Lösung überführt, welche im Verhältnis 3:1 aus Methanol und Essigsäure hergestellt wurde. Anschließend wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült, darauffolgend in 1%igem Formaldehyd für 10 Minuten weiter fixiert und abermalig kurz mit destilliertem Wasser gespült. Nun erfolgte eine Dehydratation mittels aufsteigender Ethanol-Reihe (70%, 80% und 100%) für jeweils 3 Minuten und Lufttrocknung in einer dunklen Kammer (Campos, Prior et al. 2008).

Die Hybridisierung erfolgte dann anhand des vom Sondenhersteller Abnova vorgegebenen Protokolls mit dem Auftragen von 5 µl der Sonde FGFR1 /Cen 8q auf ein markiertes Areal von 1x1 cm und Eindeckelung. Die DNA-Stränge wurden daraufhin für 5 Minuten bei 75 °C denaturiert, sodass eine Hybridisierung der Sonde in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 48 Stunden erfolgen konnte. Abschließend wurde das Deckglas entfernt und der Objektträger mit SSC (Saline-Sodium-Citrate) -Puffer gespült.

3.9.11 Evaluation des Therapieansprechens

Die Erhebung der klinischen Patientendaten erfolgte aus den digitalisierten Patientenakten. Zur Bestimmung der Follow-up-Parameter „Response“ und „Progression-free-survival“ (PFS) fanden die „RECIST 1.1“-Kriterien Anwendung, die seit 2009 in selbiger Form zur Evaluation des Therapieansprechens solider Tumoren genutzt werden (Eisenhauer, Therasse et al. 2009). RECIST ist hierbei ein Akronym für „Response evaluation criteria in solid tumors“. Das Therapieansprechen wurde jeweils 6 Wochen nach Beginn der Therapie durch eine CT-Untersuchung des Thorax und des Abdomens sowie in einigen Fällen einer MRT-Untersuchung des Kopfes evaluiert.

3.9.12 Statistische Tests

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden verschiedene statistische Tests mit den Statistik-Softwares Medcalc, Version 12.3.0 (MedCALC Software, Mariakerke, Belgien) und JMP 10.0 (SAS, Cary, NC, USA) angewendet.

Zur Überprüfung der Korrelation der einzelnen erfassten Parameter wurde die Spearman-Rank-Korrelation angewendet.

Um für einen bestimmten Marker einen Grenzwert (Cut-off) zu definieren, der das Patientenkollektiv in Bezug auf progressionsfreies Überleben (PFS) und radiologisches Therapieansprechen (Response) in eine prognostisch günstige und ungünstige Gruppe teilt, wurden rekursive Entscheidungsbaum-Analysen durchgeführt.

Der Mann-Whitney-Test wurde genutzt, um zwei unabhängige Variablen auf etwaige signifikante Unterschiede zu überprüfen, z.B. das Tumorigradung und die Anwesenheit CD133-positiver Zellen.

Mit der Receiver-Operation-Characteristic (ROC)-Curve-Methode wurden die einzelnen Marker respektive Cut-Offs auf deren Sensitivität und Spezifität für die Prädiktion des Therapieansprechens überprüft.

Für die Ermittlung von Unterschieden in der Länge des progressionsfreien Überlebens (PFS) und Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen Patienten mit quantitativ unterschiedlicher Expression eines Markers wurde der Kaplan-Meier-Log-Rank-Test eingesetzt.

Die „One-way analysis of variance“ wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Markerepression zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen gibt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ festgesetzt.

3.9.13 Patientenkollektiv

Tabelle Patienten Demographie		
Demographie	Patienten (n=61)	
	Anzahl	%
Tumorstadium		
II b	2	3
III a	17	28
III b	11	18
IV	31	51
Histologie		
Adenokarzinom	38	62
Plattenepithelkarzinom	20	33
n/a	3	5
Grading		
G2	19	31
G3	20	33
Gx	22	36
Alter der Patienten	45-77 Jahre	
Median	61 Jahre	
Range	22 Jahre	
Therapie		
Cis/Pem	10	16
Cis/Pac	41	67
Carbo/Pac	5	9
Carbo/Pem	2	3
Erlotinib	3	5
Ansprechen (6 Wochen nach Therapiestart)		
PR	26	43
SD	21	34
PD	14	23
PFS*		
Median	6 Monate	
Range	0 - 18 Monate	

*bei 9 Patienten PFS zum Zeitpunkt der Auswertung andauernd

Abkürzungen: SD: stable disease; PR: partial response; PD: progressive disease
 Cis: Cisplatin; Carbo: Carboplatin; Pem: Pemetrexed; Pacli: Paclitaxel
 G1: gut differenziert; G2: mäßig differenziert ;
 G3: entdifferenziert; Gx: Differenzierungsgrad nicht zu ermitteln

Tab.2: Übersichtstabelle zum untersuchten Patientenkollektiv.

Insgesamt wurden für den experimentellen Teil der Arbeit die Proben von 61 Patienten untersucht (Tabelle 2). Darunter litten 38 Patienten unter einem Plattenepithelkarzinom, 20 unter einem Adenokarzinom. Bei drei Patienten war keine eindeutige Zuordnung zu einem histologischen Subtyp möglich.

Bei 41 der 61 Patienten erfolgte die Probenentnahme vor Beginn einer Therapie, bei den übrigen 21 während der ersten beiden Therapiezyklen.

Für die statistische Auswertung der Multi-IF-Färbungen mit klinischen Daten wurden ausschließlich Patienten mit Proben vor Therapiebeginn verwendet. Bei diesen Patienten (n=41) wurden die Marker Pan-CK, CD133 und N-Cadherin gefärbt. Wenn auf den zur Verfügung stehenden Glasträgern die Anfärbung des von den Leukozyten exprimierten CD45 nicht suffizient gelang, wurde die Probe verworfen. Aus diesem Grund ergab sich eine unterschiedliche Anzahl von Patienten für die jeweilige Auswertung.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von CTC-Subpopulationen

4.1.1 Epitheliale Zellen im Blut Gesunder

Bei insgesamt 18 mittels der oben beschriebenen Methode zur Anreicherung und Multi-IF-Färbung ausgewerteten Kontrollen von gesunden Spendern zeigte sich, dass Pan-CK-positive Zellen in geringer Anzahl auch im Blut gesunder Spender vorkommen können. Zwölf von 18 Kontrollen (12/18; 66%) wiesen Pan-CK-positive Zellen auf. Es ergab sich ein Mittelwert von 0,19 Zellen/1000 Leukozyten nach Anreicherung durch Depletion hämatopoetischer Zellen. Im Vergleich konnte für an einem NSCLC erkrankten Patienten ein Mittelwert von 1,7 Zellen/1000 Leukozyten nach Anreicherung ermittelt werden.

Die darüber hinaus für die Multi-IF-Färbungen verwendeten Marker konnten im Blut der gesunden Spender nicht nachgewiesen werden.

4.1.2 CTC-Detektion verschiedener Subgruppen mittels Immunfluoreszenzfärbung

Mit der Multi-Immunfluoreszenzfärbung konnten verschiedene Subgruppen identifiziert werden. Alle verwendeten Antikörper wurden im Vorfeld an Positivkontrollen auf ihre Sensitivität hin getestet.

Von insgesamt 41 Patientenproben vor dem jeweiligen Therapiestart konnte in 25 Fällen Pan-CK gefärbt werden. Davon zeigten 24 Patienten Pan-CK-positive Zellen. Bei weiteren 29 Fällen konnte unter Therapie Pan-CK angefärbt werden, hier waren 28 Patienten positiv. Zum Teil waren die Pan-CK-positiven Zellen negativ für CD45, jedoch konnten auch solche, die gleichzeitig CD45 positiv erschienen, detektiert werden. Das Verhältnis der Zelltypen Pan-CK+/CD45+ zu Pan-CK+/CD45- betrug 1:1. Dieses wurde ermittelt, indem 81 Pan-CK-positive Zellen nachträglich auf Bildern ausgewertet wurden. Von diesen zeigten sich 40 auch CD45-positiv. Darüber hinaus bestanden Unterschiede in der Intensität der Pan-CK-Färbung und der CD45-Färbung zwischen „schwach-positiven“ und „stark-positiven“ Zellen.

Bei zwölf gefärbten Patientenproben, in denen neben Pan-CK auch EpCAM gefärbt wurde, konnten bei drei Patienten Zellen gefunden werden, die für beide epitheliale Marker gleichzeitig positiv waren (3/12; 25%). Diese waren CD45-negativ. Weiterhin konnten Zellen bei fünf Patienten (5/12; 41%) dargestellt werden, die sich EpCAM-positiv und gleichzeitig Pan-CK-negativ darstellten (siehe auch Abb.11 und 12).

Bei den Zellen, die positiv für N-Cadherin gefärbt werden konnten, erwiesen sich einige sowohl als Pan-CK-positiv wie auch als CD45-positiv. Häufiger waren jedoch N-Cadherin-positiven Zellen, die negativ für Pan-CK und CD45 waren. Insgesamt zeigten 20 von 50 Patientenproben N-Cadherin-positiv Zellen (40%).

Weiterhin wurden Twist-positiv Zellen gefunden, die jeweils CD45 negativ waren, sowie Vimentin-positiv. Da auch Zellen des peripheren Blutes aufgrund ihrer mesenchymalen Herkunft Vimentin exprimieren, kamen nur solche, die gleichzeitig CD45-negativ waren, als potentielle CTC in Betracht.

CD133-positiv Zellen, welche bei 15 Patienten von 45 (33%) nachgewiesen werden konnten, waren stets negativ für CD45 und Pan-CK.

Zu quantitativen Angaben bezüglich der detektierten Zellen siehe Tabelle 3. Hier sind sowohl Patienten vor Therapiebeginn als auch unter laufender Therapie erfasst.

Marker	Anzahl Proben/davon positiv	Anzahl Zellen/1000 PBMNC nach Anreicherung				
		Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	SD
CK	54/52 (96%)	0	16,63	2,0	1,03	2,98
EpCAM	12/8 (67%)	0	0,67	0,16	0,07	0,22
N-Cadherin	50/20 (40%)	0	5,9	0,27	0,0	0,86
CD133	45/15 (33%)	0	6,3	0,27	0,0	0,97

Abkürzungen: CK: Pan-Zytokeratin; CD133: Stammzelloberflächenprotein, auch Prominin1; N-Cadherin: Neuronal Calcium adhering; EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

Tab.3: Übersichtstabelle zur Quantität der mittels Multi-IF-Färbung detektierten Zellen.

Nachfolgend Bilder von Kontrollexperimenten und den unterschiedlichen detektierten Subtypen (Abbildungen 7-17):

Kontrollexperimente:

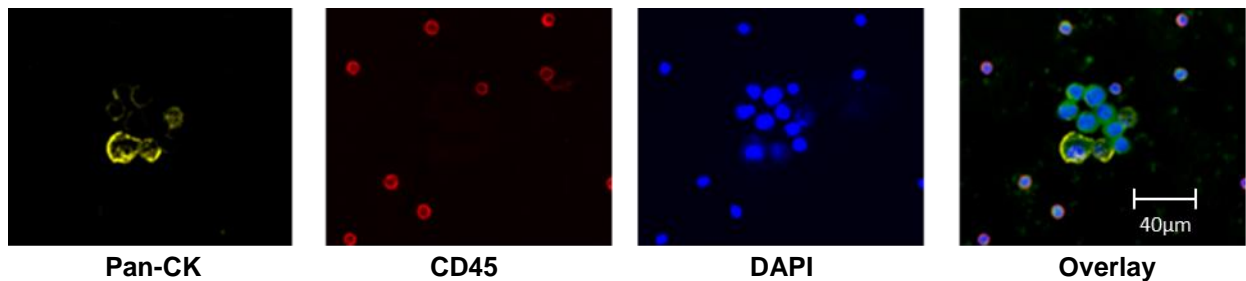


Abb.7: Kontrolle für Pan-CK (gelb) an HepG2-Zellen gemischt mit humanen Leukozyten. Die HepG2-Zellen erscheinen deutlich größer, exprimieren Pan-CK unterschiedlich stark und weisen größere Kerne in der DAPI-Färbung (blau) auf. Leukozyten zeigen sich CD45-positiv (rot).

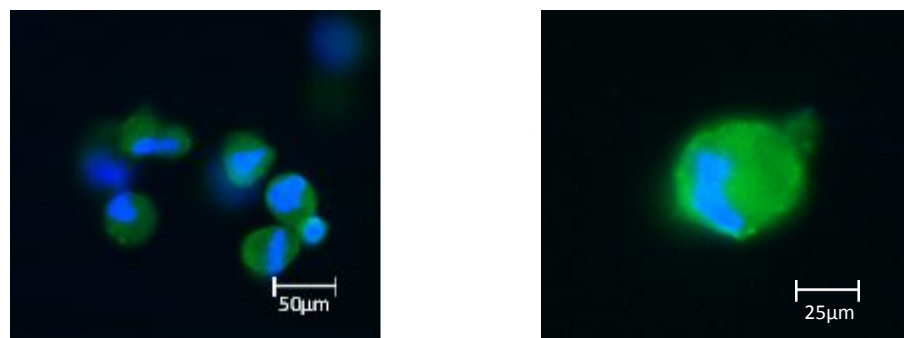


Abb.8: Positiv-Kontrollen für N-Cadherin an mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC4). Im Kanal für Alexa Fluor 488 zeigen diese Zellen ein deutliches Fluoreszenz-Signal (grün).

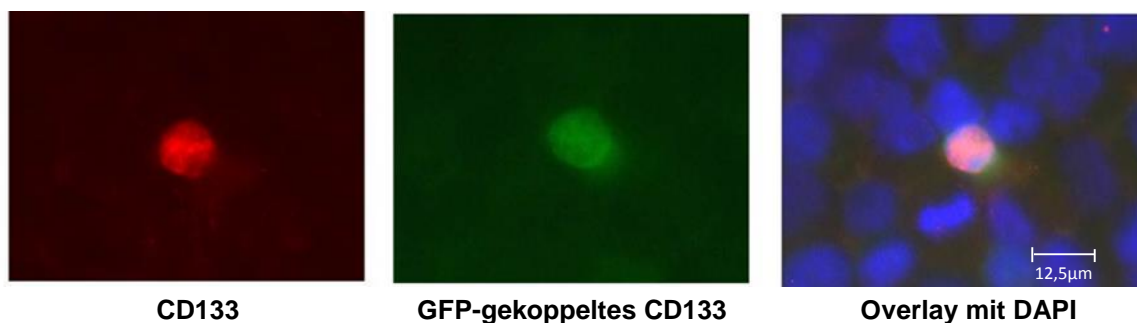


Abb.9: Positiv-Kontrolle für den CD133-Antikörper an einem Gemisch von K562-Zellen, die teilweise CD133-transfiziert sind. Dabei ist CD133 hier mittels eines Cy3-Sekundäntikörpers rot angefärbt, durch die Kopplung mit GFP färbt sich CD133 ebenfalls grün.

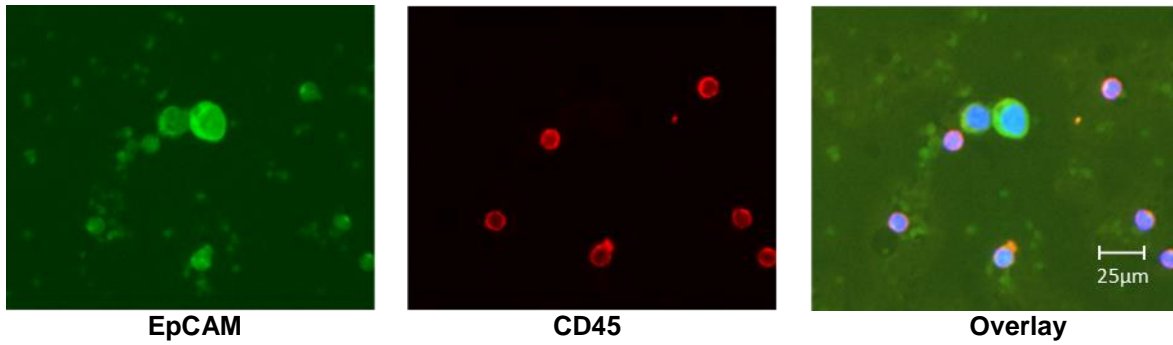


Abb.10: Kontrolle für EpCAM-positive Zellen an einem HepG2-PBMC-Gemisch. Während die größeren HepG2-Zellen sich im Alexa Fluor 488 Kanal positiv für EpCAM darstellen, bleiben sie im Cy3-Kanal (rot) negativ für CD45.

In Patientenblut detektierte CTC-Typen:

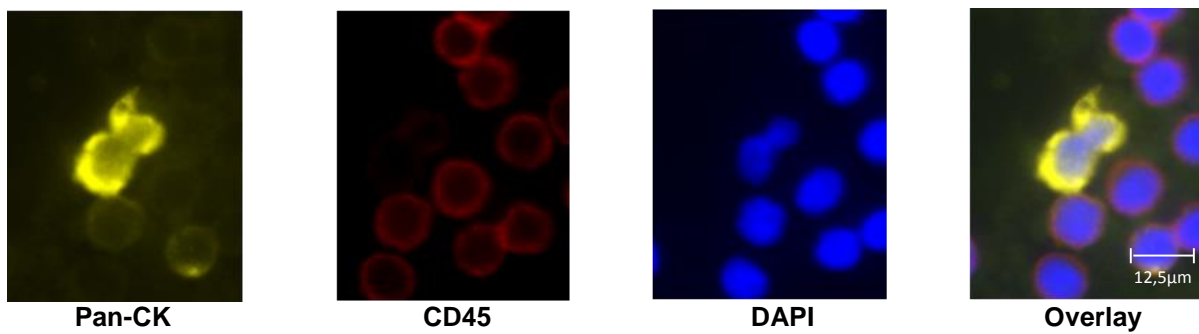


Abb.11: Pan-CK-positive Zellen (gelb) bei einem NSCLC-Patienten, die CD45 (rot)-negativ sind. Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt.

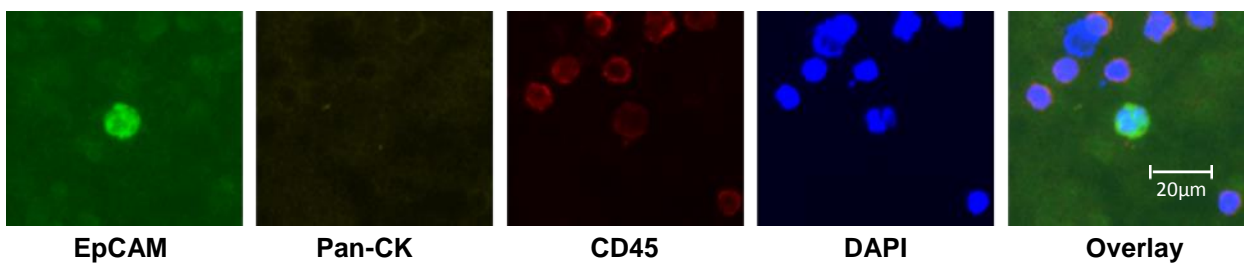


Abb.12: EpCAM+/CK-/CD45- Zelle mit DAPI-positivem Kern bei einem NSCLC-Patienten.

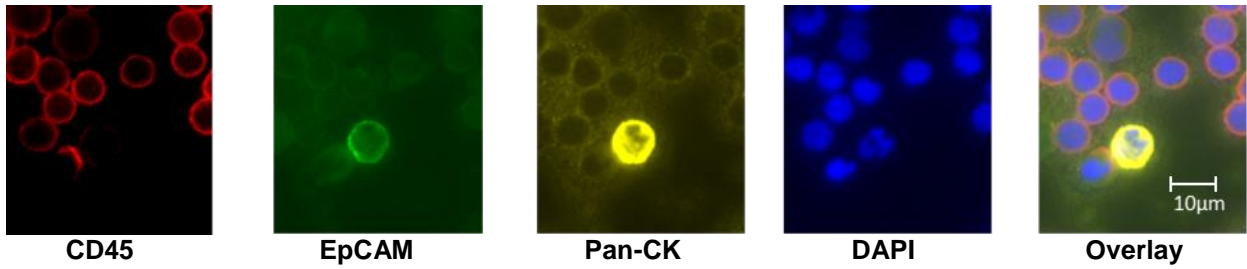


Abb.13: Pan-CK+/EpCAM+/CD45- Zelle mit DAPI-positivem Kern bei einem NSCLC-Patienten.

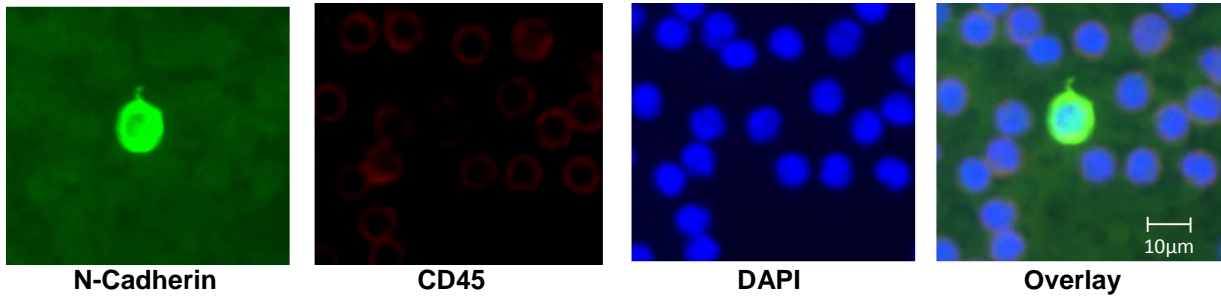


Abb.14: N-Cadherin-positive Zelle (grün) bei einem NSCLC-Patienten, die CD45 (rot)-negativ ist und einen DAPI-positiven Kern (blau) aufweist.

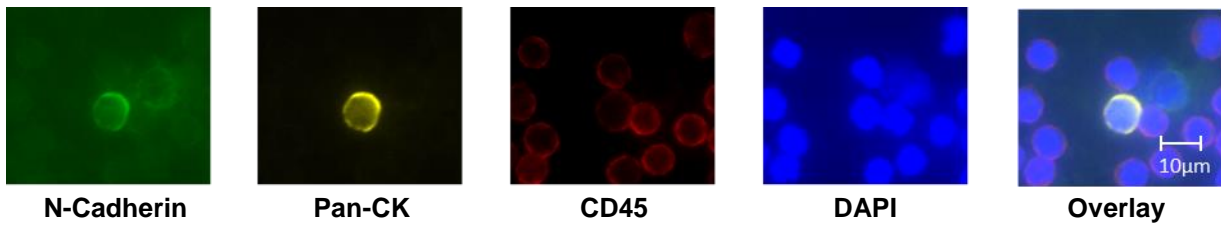


Abb.15: N-Cadherin- (grün) und Pan-CK- (gelb) positive Zelle mit DAPI+-Kern (blau) bei einem NSCLC-Patienten, die auch schwächer CD45 (rot)-positiv ist.

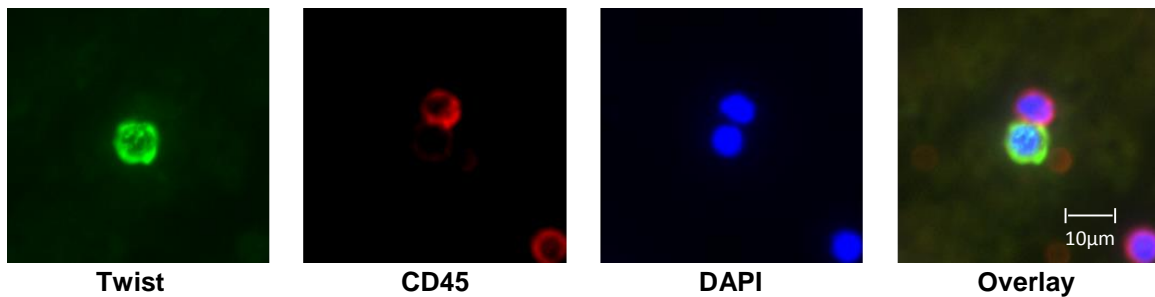


Abb.16: Twist-positive Zelle (grün) bei einem NSCLC-Patienten mit DAPI-positivem Kern (blau), CD45-negativ.

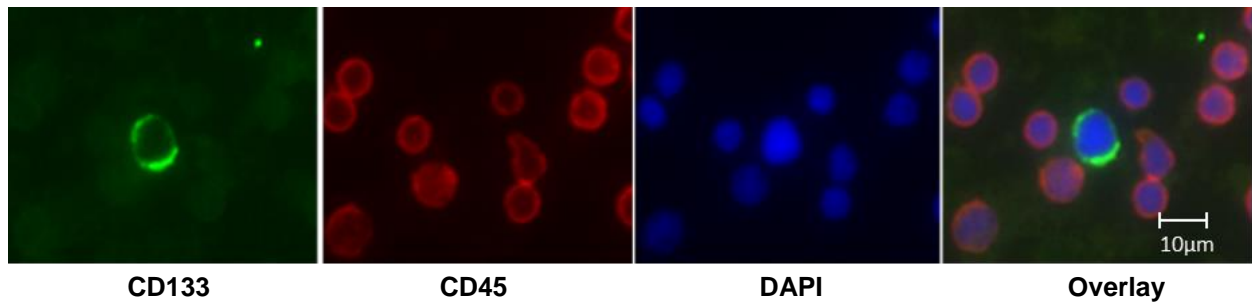


Abb.17: CD133 (grün)-positive und gleichzeitig CD45 (rot)-negative Zelle bei einem NSCLC-Patienten mit im Vergleich zu den umgebenden CD45-positiven Leukozyten größerem DAPI-positivem Kern (blau).

4.2 Quantifizierung einzelner Subgruppen mittels Multi-IF-Färbung und Korrelation mit klinischen Daten (Patienten alle vor Therapiebeginn)

Um den Zusammenhang von N-Cadherin-positiven Zellen, gemessen vor dem Beginn der systemischen Chemotherapie, und dem PFS der Patienten zu untersuchen, wurde ein Kaplan-Meier-Log-Rank-Test durchgeführt. Dieser ergab ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben (5 vs. 8 Monate; $p=0,03$; $[HR]= 2,8$; $95\% \text{ CI}=0,6842-11,5645$) für solche Patienten, bei denen N-Cadherin-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Insgesamt wurden hier bei fünf von 21 Patienten (24%) N-Cadherin-positive Zellen detektiert (Abb.17).

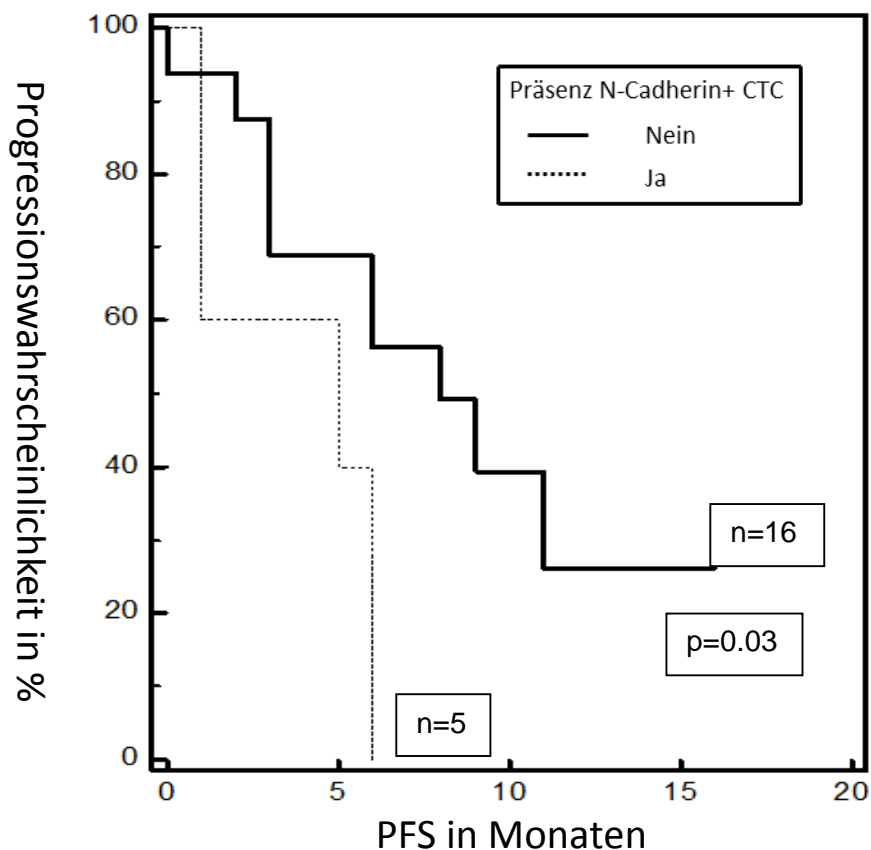


Abb.18: Kaplan-Meier Test: Patienten, bei denen N-Cadherin positive Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten, zeigten ein signifikant kürzeres PFS (5 vs. 8 Monate; $p=0,03$)

Es wurde weiter untersucht, ob das Verhältnis von CD133-exprimierenden Zellen zu Pan-CK-exprimierenden Zellen bei Patienten mit einem NSCLC einen prognostischen Einfluss besitzen könnte. Dabei konnte für einen durch Entscheidungsbaum-Analyse ermittelten Cut-off bei einer Ratio >0 (82. Perzentile), d.h. wenn neben CK-positiven Zellen gleichzeitig CD133-positive Zellen detektiert wurden, ein signifikanter Zusammenhang mit dem progressionsfreien Überleben nachgewiesen werden ($p=0,003$, 95% CI 0,6555-30,1209; [HR] 4,4434). Das PFS von Patienten mit gleichzeitiger Anwesenheit von CD133-positiven Zellen war von acht auf zwei Monate signifikant verkürzt (Abb.19). Vier von 22 Patienten wiesen dabei neben Pan-CK-positiven auch CD133-positive Zellen auf (18%).

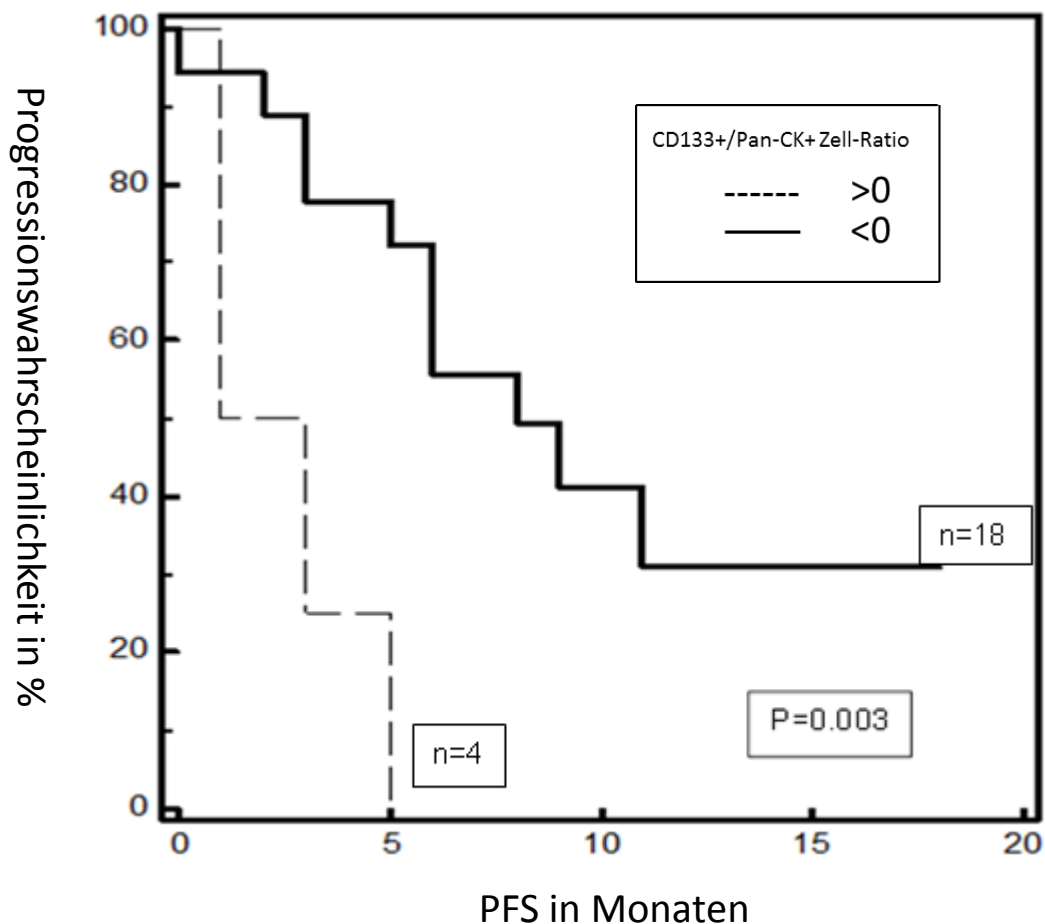
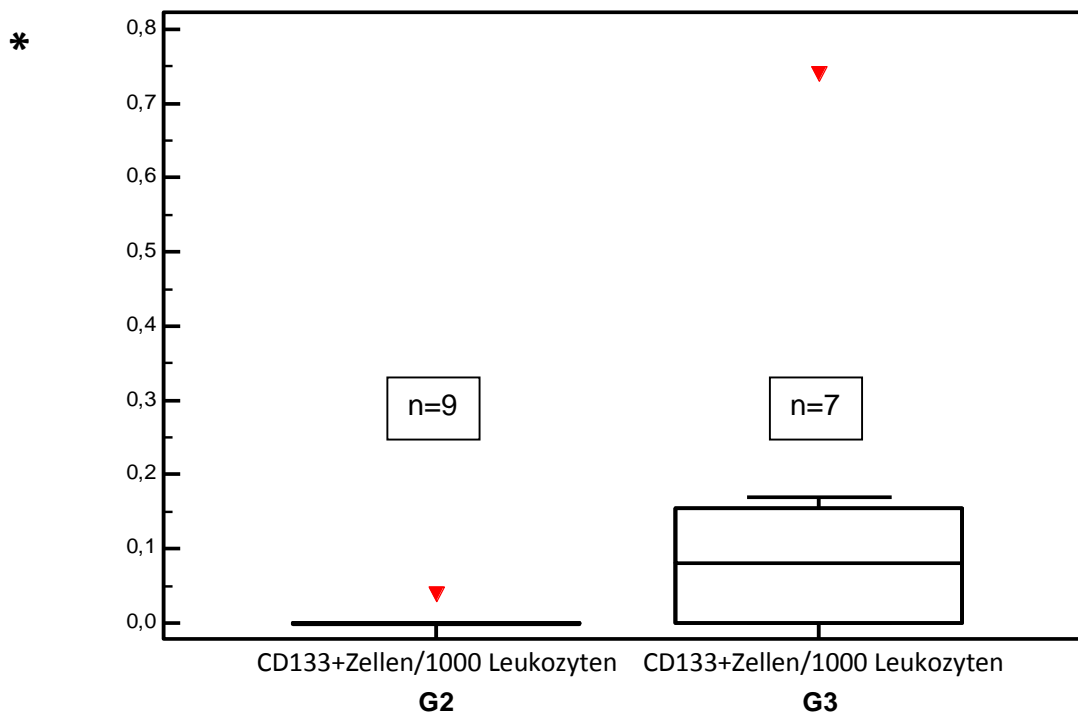


Abb.19: Kaplan-Meier Test: Patienten, die eine CD133+/Pan-CK+ Zelltyp-Ratio >0 aufweisen, zeigten ein signifikant verkürztes PFS (2 vs. 8 Monate, $p=0.003$ $n=4$ vs. 18)

Auch zeigte die Spearman-Rank-Korrelation einen positiven Zusammenhang zwischen der Anzahl detektierter CD133-positiver Zellen und dem Differenzierungsgrad des jeweiligen Primärtumors für Patienten, die noch keine Therapie erhalten haben ($p=0,03$; $r=0,55$). Patienten mit entdifferenziertem Tumor wiesen dabei im Vergleich zu Patienten, deren Primärtumor mittelgradig differenziert war, mehr CD133-positive Zellen auf. Dieses konnte mittels Mann-Whitney-Test ($p=0,04$, $n=9$ Pat. G2 vs. 7 Pat. G3) bestätigt werden (Abb.20).



* Anzahl CD133-positiver Zellen/10 Gesichtsfelder, auf 1000 Leukozyten normiert

Abb.20: Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad des Primärtumors und Anzahl CD133-positiver CTC im Mann-Whitney-Test, in einem Box-and-Whisker-Plot mit Darstellung des Minimal- und Maximalwertes.

4.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und FICTION-Technik an CTC

Zur Etablierung der FICTION-Technik wurden zunächst FisH-Analysen an humanen Leukozyten sowohl in der Interphase als auch an leukozytären Metaphase-Chromosomen durchgeführt um die Funktion der Sonde und das beiliegende FisH-Protokoll zu testen (Abbildungen 21 und 22). Freundlicherweise unterstützte uns dabei das Humangenetische Institut des Universitätsklinikums Essen in Person von Frau Dr. Küchler.

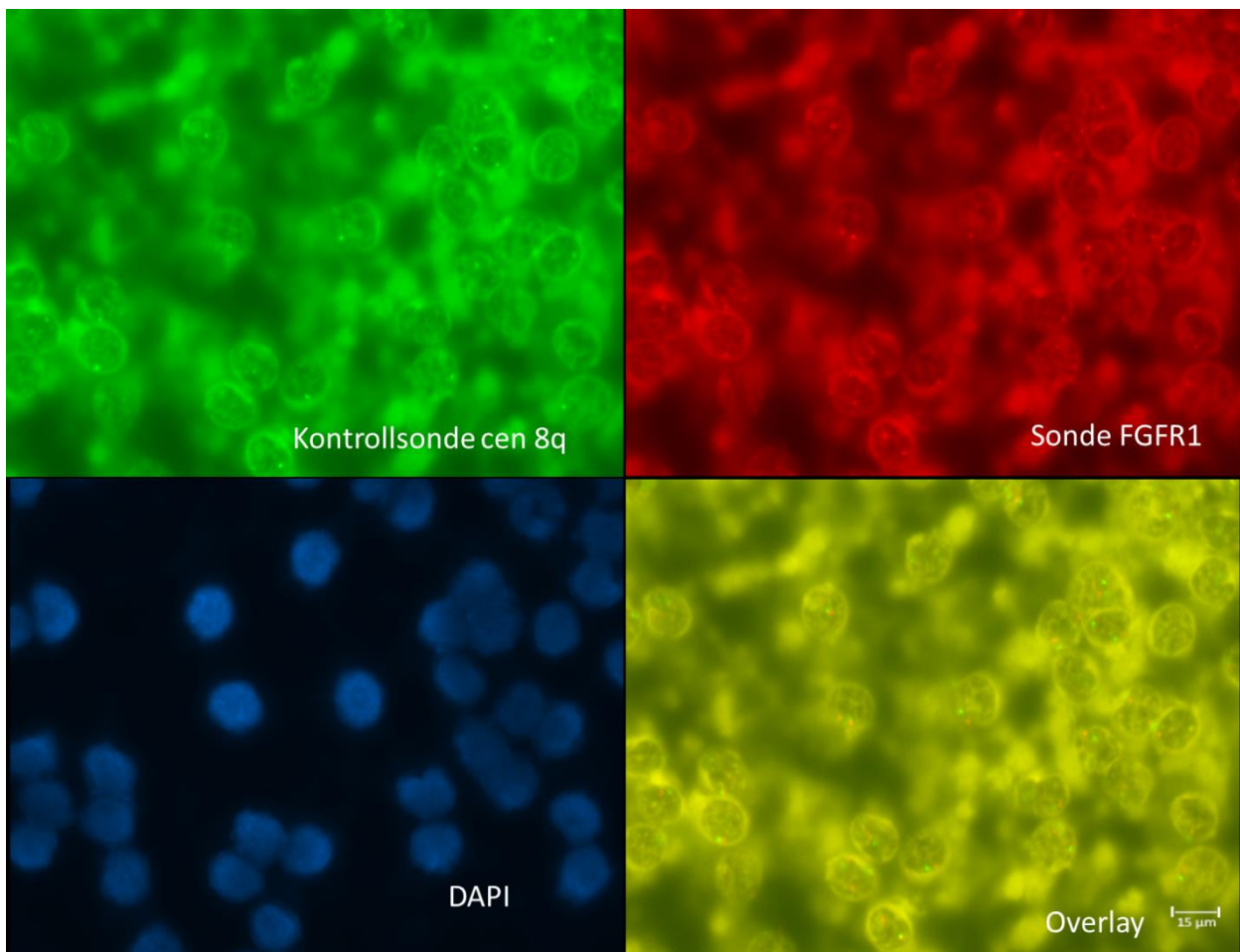


Abb.21: Kontrolle der FGFR1-Sonde mittels FisH an humanen Leukozyten in der Interphase. Die Kontrollsonde, die an eine Zentromerregion bindet, leuchtet grün (FITC, links oben), die Sonde für FGFR1 rot (Texas Red, rechts oben). Unten links die Kernfärbung, unten rechts sind beide Sonden zusammen zu erkennen.

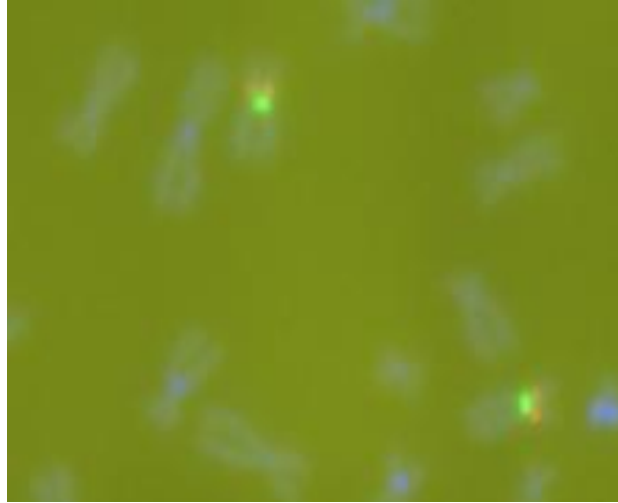


Abb.22: Kontrolle der FGFR1-Sonde mittels FisH an Metaphase-Chromosomen humaner Leukozyten (Kontrollsonde am Zentromer grün (FITC), FGFR1- Sonde rot (Texas Red)). Die Chromosomen wurden überdies mit DAPI gefärbt, welches in der Zentromerregion konzentriert ist.

Es wurde anschließend mithilfe eines Gemisches aus PBMC gesunder Spender und Lungenkarzinomzellen der Zelllinie NCI 1581, die freundlicherweise von Dr. Breitenbücher aus der Arbeitsgruppe Schuler zur Verfügung gestellt worden sind, nachgewiesen, dass die Immunfärbung auch nach der FisH noch detektierbar ist. Während sich die Leukozyten im Overlay durch eine Anfärbung von CD45 rot leuchtend zeigen, ist der Kern der Tumorzelle durch die DAPI-Färbung nach wie vor gut erkennbar. Die Kernfärbung der Leukozyten wird durch die CD45-Färbung bei der gewählten Helligkeitsstufe am Mikroskop weitestgehend überstrahlt. Die Wahl der Helligkeitsstufe im Cy3-Kanal, in welchem sowohl die CD45-Färbung als auch die FGFR1-Sonde dargestellt werden, erwies sich als problematisch, da zur Darstellung der Sonde eine hohe Helligkeitsstufe von Nöten war, die schnell zu einer Überstrahlung der Sonde durch die CD45-Färbung führte (Abb. 23).

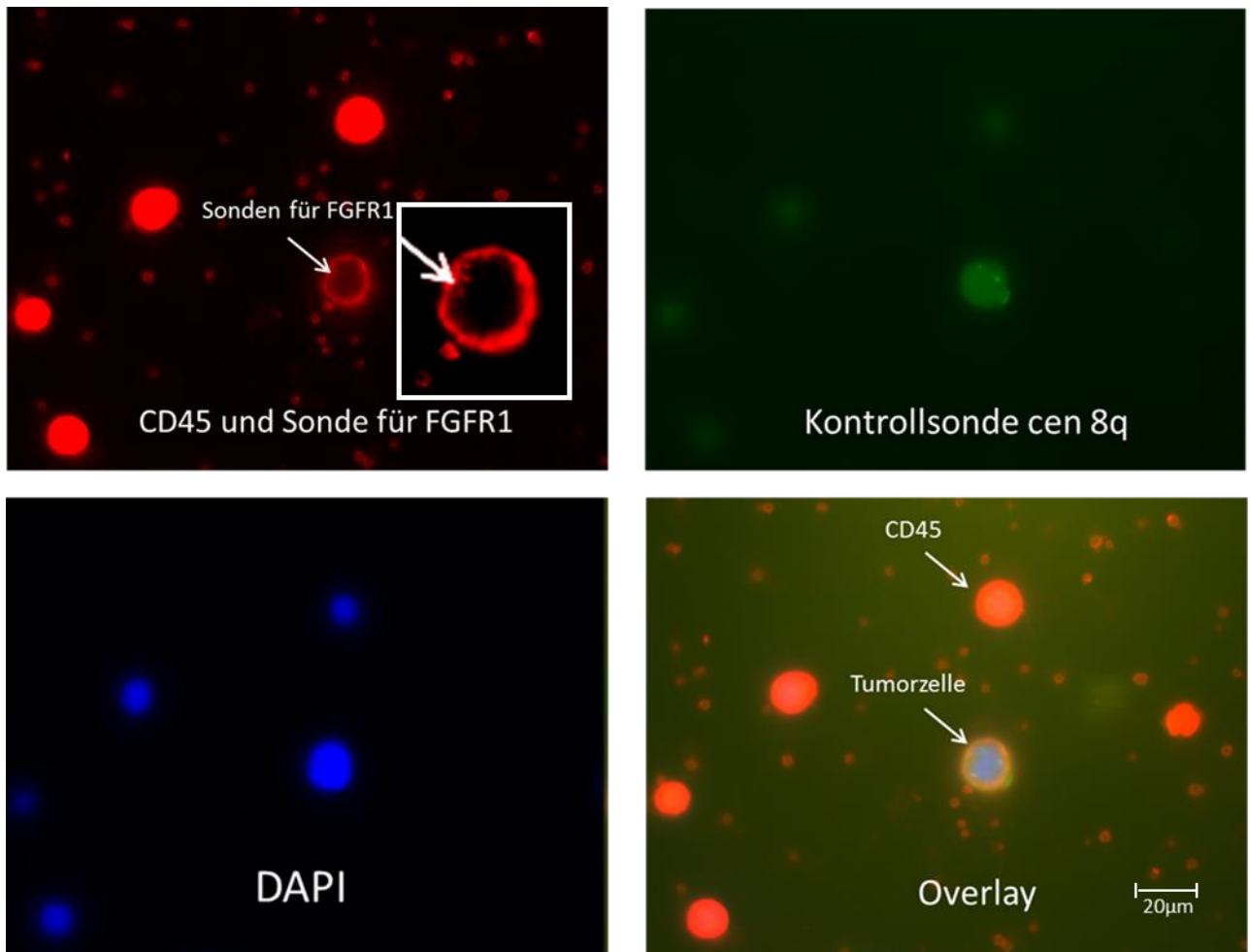


Abb.23: „FICTION“-Technik an einem Gemisch humaner Leukozyten mit Zellen der Lungenkarzinomzelllinie NCI-1581, zur Unterscheidung zwischen PBMC und Tumorzelle. Die Leukozyten zeigen sich aufgrund der CD45-Anfärbung rot leuchtend, wohingegen an der Tumorzelle im Overlay die DAPI-Färbung gut zu erkennen ist.

Aus diesem Grund wurde entschieden, zur Unterscheidung zwischen Leukozyten und CTC statt der CD45-Färbung Pan-CK anzufärben, da dieses in einem zur Sonde verschiedenen Kanal (AF647) dargestellt werden konnte (Abb.24).

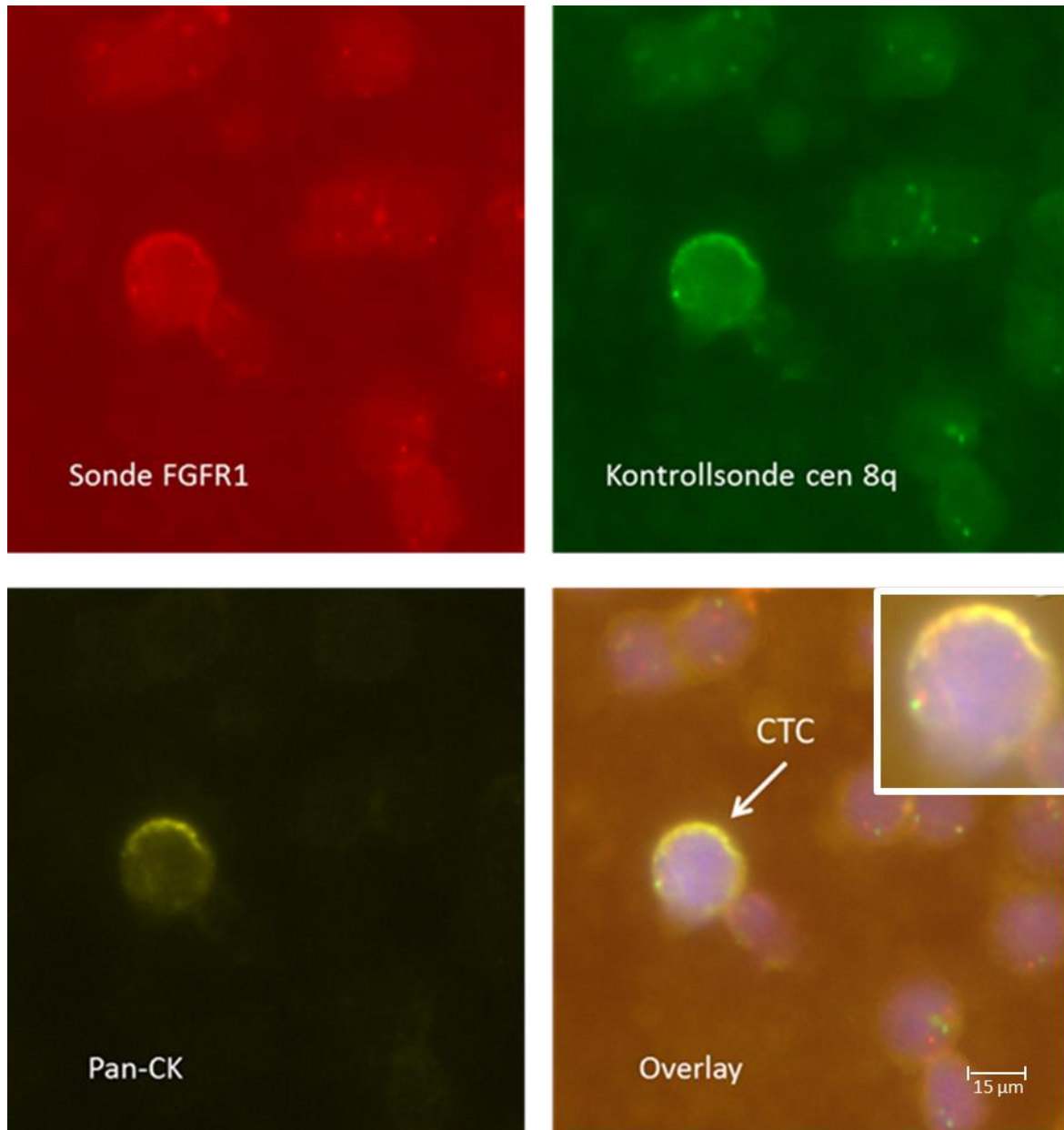


Abb.24: „FICTION“-Technik an Blut eines NSCLC-Patienten, der keine FGFR1-Amplifikation aufweist. Färbung mit Pan-CK- Antikörper. Die Pan-CK-positive CTC ist mit einem Pfeil markiert und im Overlay rechts oben vergrößert dargestellt.

4.4 Molekulare Charakterisierung von CTC mittels Real-time qRT-PCR

Die molekulare Charakterisierung von CTC erfolgte in zwei Zellfraktionen. Nachdem mittels CD45-Antikörper-gekoppelten magnetischen Beads eine partielle Depletion hämatopoetischer Zellen in jeder Blutprobe durchgeführt wurde, erfolgte mithilfe von Anti-EpCAM-Beads die Auftrennung der verbliebenen mononukleären Zellen in zwei Fraktionen. Eine EpCAM-positive, epitheliale Zellfraktion und eine „Restzellsuspension“, welche solche CTC enthalten soll, die EpCAM-negativ sind und/oder mesenchymale bzw. stammzellartige Oberflächeneigenschaften besitzen und somit epithelialen Anreicherungsverfahren nicht zugänglich sind. Aus beiden Fraktionen wurde jeweils die mRNA isoliert und die oben genannten Genexpressionen gemessen (siehe Material und Methoden).

4.4.1 Identifizierung prognostischer Marker aus CTC von NSCLC-Patienten

Primer und Schmelzkurven (Verdünnungsreihe)

Es wurden Gene bzw. deren Genprodukte ausgewählt, die beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und/oder anderen Karzinomentitäten als Marker für epitheliale Tumorzellen (*Keratin18*, *EpCAM*) Verwendung finden. Ebenso solche, die charakteristisch sind für Zellen, die eine epithelial-mesenchymale Transformation (*Twist1*, *Snail1*) durchmachen oder stammzellartige Eigenschaften (*CD133*, *ALDH1*) besitzen.

In mRNA-Verdünnungsreihen wurde nachgewiesen, dass das Detektionsvermögen des jeweiligen Primers für die aus den Patientenproben isolierten mRNA-Mengen ausreicht (Abb.25).

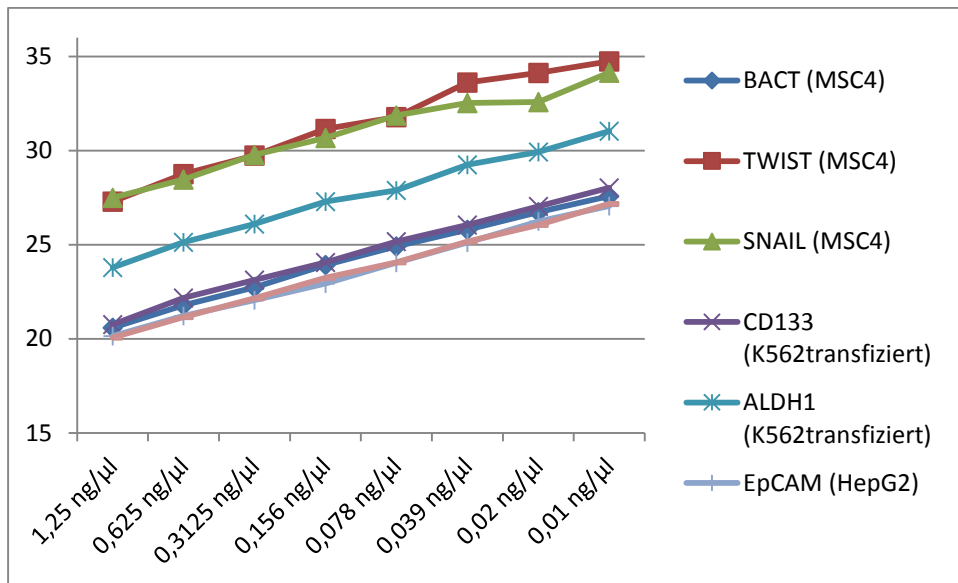
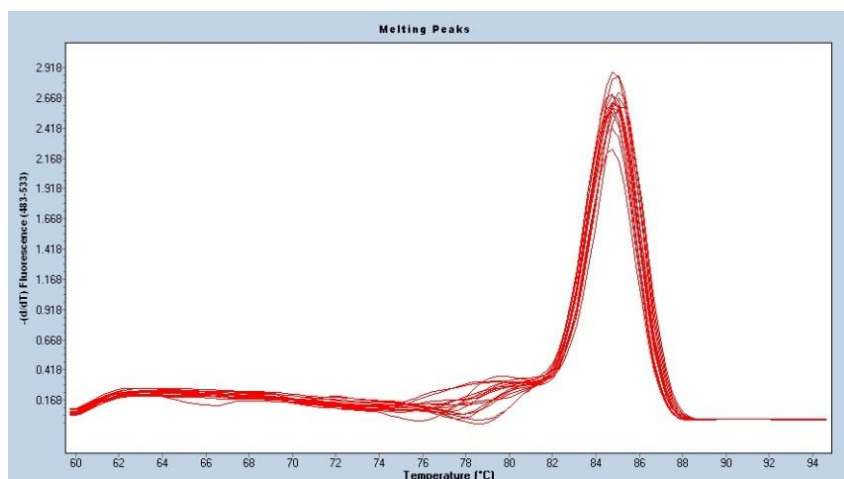
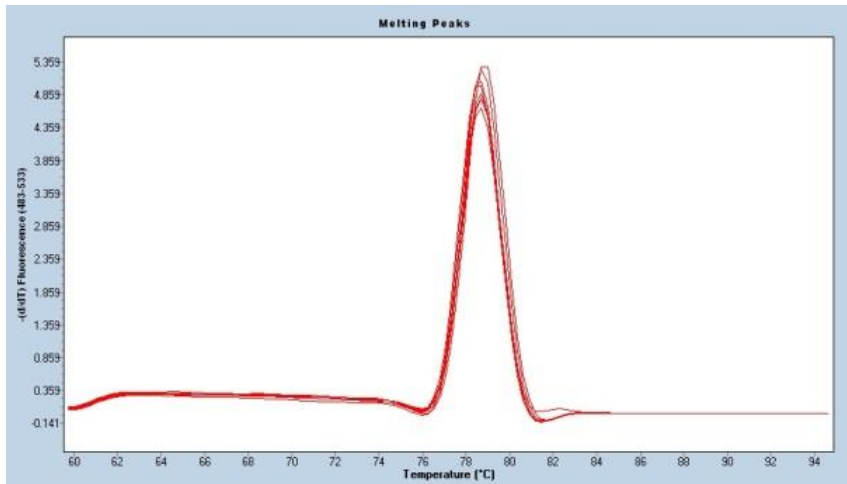


Abb.25: RNA-Verdünnungsreihen: Kontinuierlich steigende CT-Werte bei geringer werdender RNA-Konzentration, wobei ein Plateaubereich noch nicht erreicht wird.

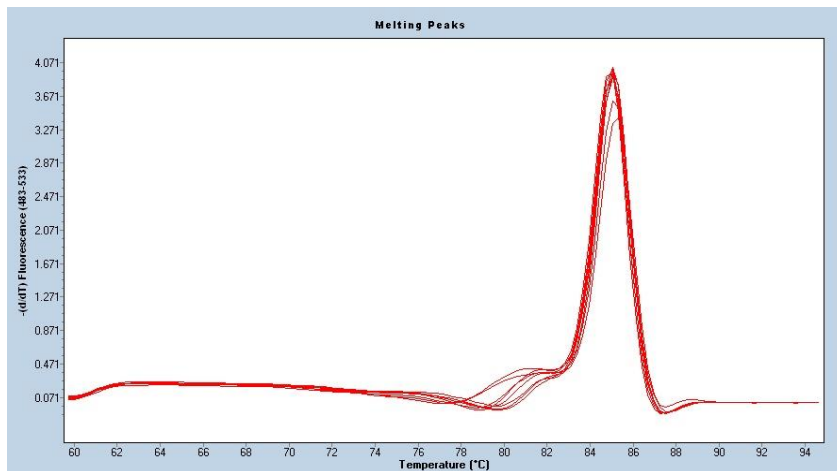
Mittels einer Schmelzkurvenanalyse wurde anhand von Konzentrationsreihen getestet, ob konstant ein spezifisches Produkt oder Primer-Dimere gebildet werden. Ein spezifisches Produkt weist durch die cDNA-Doppelstrangbildung im Vergleich zu unspezifischen Primer-Dimeren eine höhere Schmelztemperatur auf (Abb. 26).



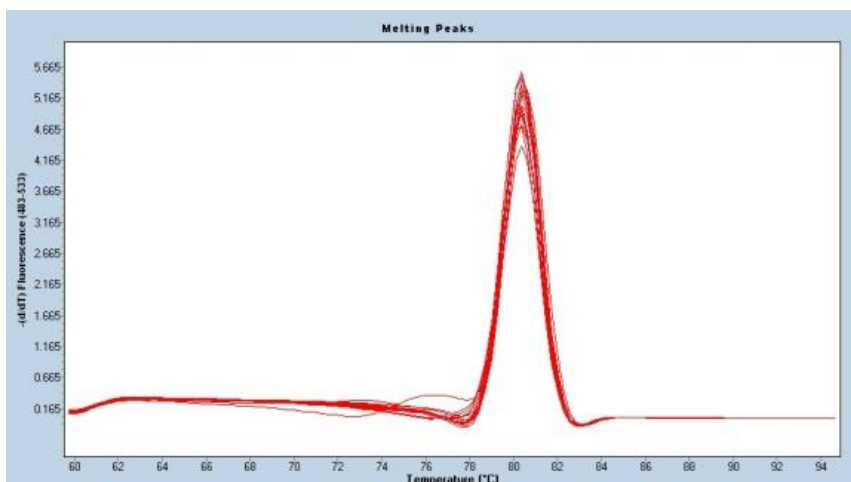
β -Actin MSC4



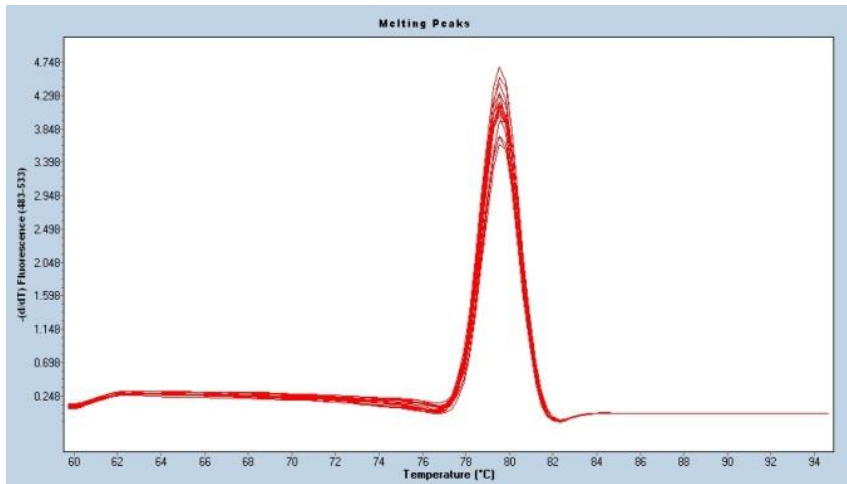
EpCAM HepG2



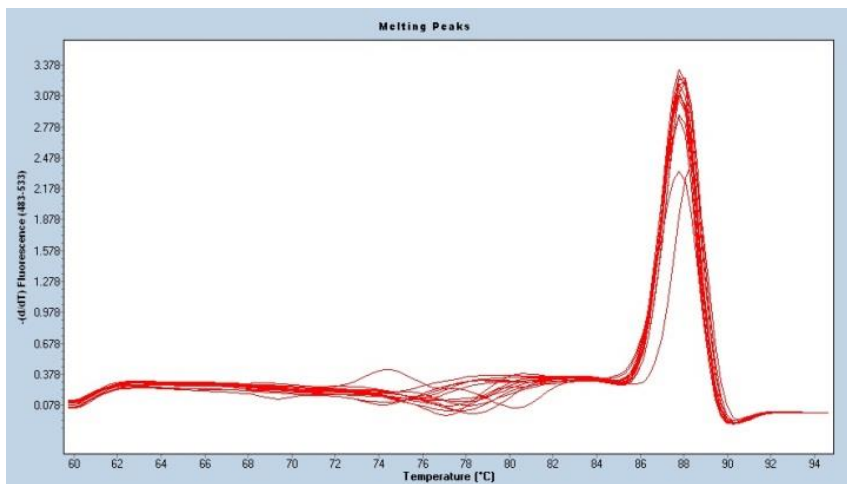
KRT18 HepG2



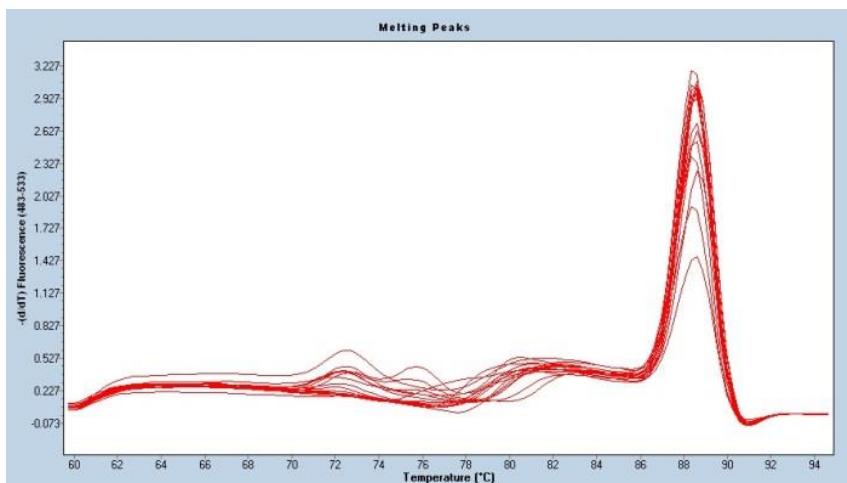
ALDH1 K562-CD133:IEG



CD133 K562-CD133:IEG



Snail1 MSC4



Twist1 MSC4

Abb.26: Schmelzkurven der qRT-PCR-Produkte für die eingesetzten Primer, anhand von 2 µl RNA (HepG2-RNA für *KRT18* und *EpCAM*, *MSC4*-RNA für *b-ACTIN*, *Twist1* und *Snail1*, K562-CD133:IEG -RNA für *ALDH1* und *CD133*) in einer Verdünnungsreihe von 1,5-0,0125 ng/µl.

4.4.2 Statistische Auswertung der real-time qRT-PCR-Ergebnisse mit klinischen Patientendaten

Für die statistische Auswertung und die Identifizierung möglicher prognostisch relevanter molekularer Marker wurde das Patientenkollektiv in zwei verschiedene Kollektive unterteilt, welche dann getrennt betrachtet wurden. Das erste umfasst nur Patienten vor dem Beginn einer Chemotherapie (n=29), das zweite fasst die Patienten vor Beginn der jeweiligen Therapie mit solchen, deren Therapie bei Probenabnahme bereits begonnen hat (eins bis sechs Wochen nach Therapiebeginn), zusammen (n=43). Jeder Patient ging nur zu einem Untersuchungszeitpunkt in die Auswertung ein.

Die Patientenanzahl in den einzelnen Auswertungen ist kleiner als 43. Dies ist dadurch begründet, dass durch Schmelzkurvenanalyse und mitgeführte Kontrollen solche Patientenproben ausgeschlossen wurden, in denen keine suffiziente Messung erfolgte.

Patientenkollektiv vor Therapiebeginn (n=29):

Im Kaplan-Meier-Log-Rank-Test zeigte sich für eine erhöhte Expression von *Keratin18* nach Festlegen eines Cut-offs bei der 67. Perzentile, die mittels Entscheidungsbaum-Analyse ermittelt wurde, ein signifikanter Zusammenhang zwischen verlängertem PFS und erhöhter *Keratin18* Expression ($p=0,04$, 95% CI=0,07468-0,796; [HR]=0,2438).

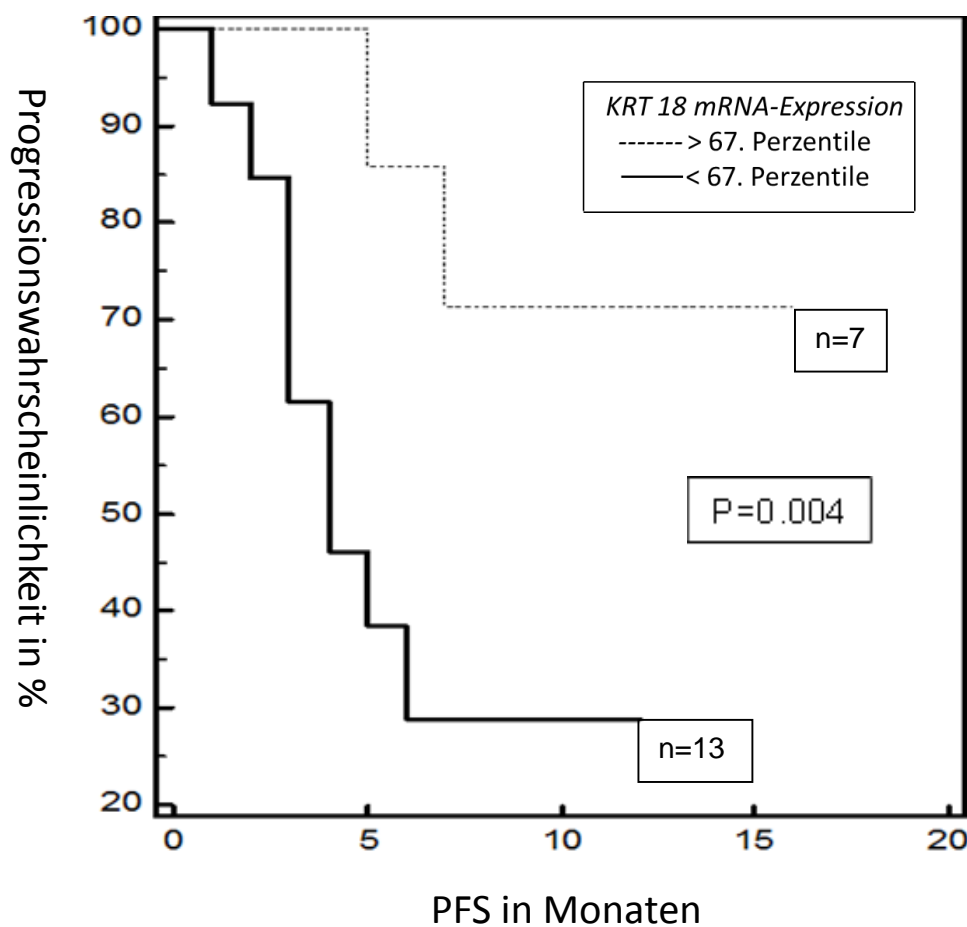


Abb.27: Kaplan-Meier-Test: Eine erhöhte *KRT18*-mRNA-Expression (>67. Perzentile) in der EpCAM-positiven Zellfraktion vor Therapiebeginn indizierte ein verlängertes PFS (4 Monate vs. Endpunkt nicht erreicht; $n=13 < 67.$ Perzentile vs. $7 > 67.$ Perzentile).

In der Restzellfraktion zeigte sich für die *Keratin18*-mRNA-Expression in der ROC-Kurven-Analyse, dass eine erhöhte *Keratin18*-Expression prädiktiv für das Tumorsprechen auf die Therapie sein könnte, nachdem eine Entscheidungsbaum-Analyse einen Cut-off bei der 53. Perzentile ergab. Es wurden die Proben von 19 Patienten ausgewertet. Neun Patienten zeigten dabei ein partielles Tumorsprechen (PR, partial response), bei zehn Patienten war das Tumorgeschehen radiologisch unverändert (SD, stable disease) oder progredient (PD, progressive disease). Die ROC-Kurven-Analyse konnte mit einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von 78% zwischen den Patienten mit PR und SD/PD unterscheiden (n=19, 10 SD/PD vs. 9 PR; p= 0,02; AUC= 0,74; CI=0,49-0,91). Eine höhere *Keratin18*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion geht mit einem schlechteren Ansprechen auf die Platin-basierte Therapie einher (Abb. 28).

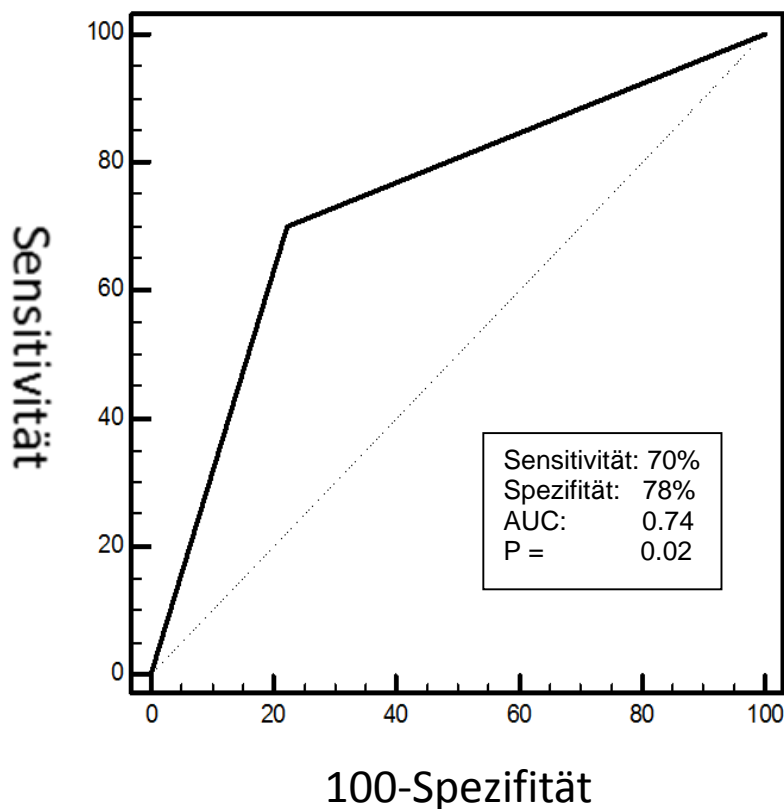


Abb.28: ROC-Kurven-Analyse: Eine erhöhte *Keratin18*-mRNA-Expression in der EpCAM-depletierten Restzellfraktion vor Therapiebeginn könnte prädiktiv für schlechteres Ansprechen sein (PR vs. SD/PD, n=10 SD/PD vs. 9 PR).

Weiter zeigt sich für Patienten vor Therapiebeginn, dass eine erhöhte *EpCAM*-mRNA-Expression in der *EpCAM*-positiven Fraktion mit einem verlängerten PFS einhergeht. So zeigt der Kaplan-Meier-Log-Rank-Test nach Festlegen eines Cut-offs durch Entscheidungsbaum-Analyse bei der 71. Perzentile einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen PFS und *EpCAM*-Expression (Abb. 29, $p=0,025$; PFS 5 Monate vs. Endpunkt nicht erreicht; $n= 12$ vs. 4 ; CI nicht möglich; $[HR]=0,0$).

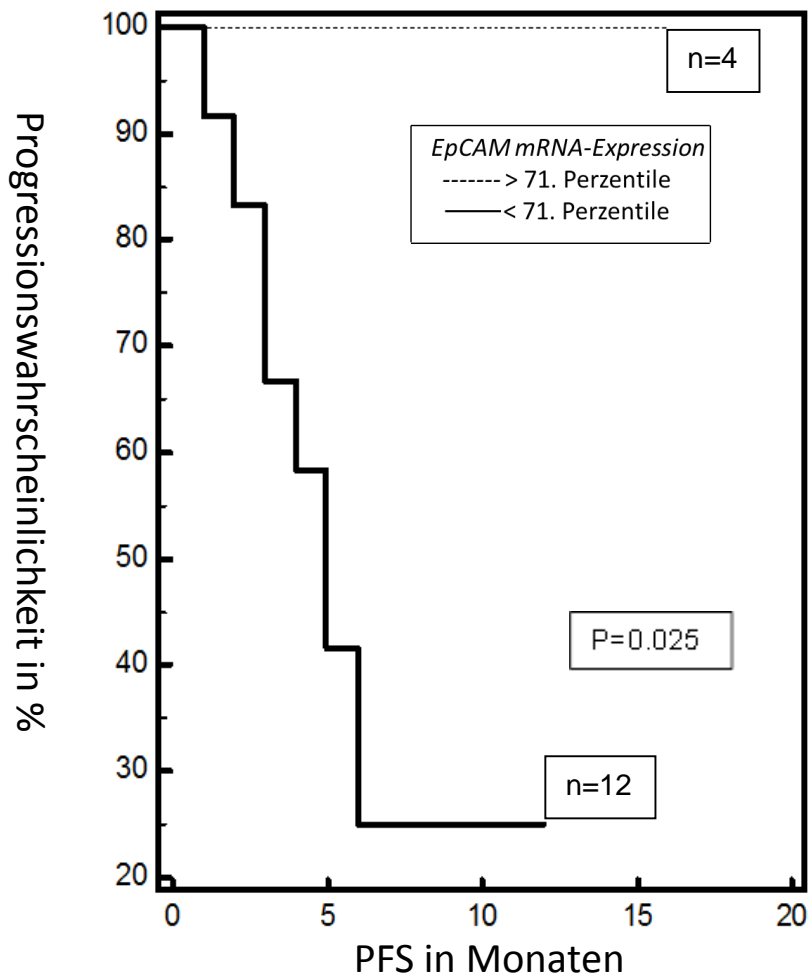


Abb.29: Kaplan-Meier-Test: Eine höhere *EpCAM*-mRNA-Expression in der *EpCAM*+ -Fraktion korreliert mit längerem PFS ($p=0,025$).

Für die *ALDH1*-mRNA-Expression in der EpCAM-positiven Fraktion lieferte ein Spearman-Test einen signifikanten positiven Zusammenhang mit dem PFS ($p=0,01$; $r=0,53$). Nachdem dann eine Entscheidungsbaum-Analyse einen Cut-off bei der 76. Perzentile ergab, wurde ein Kaplan-Meier-Test zur Bestätigung des Zusammenhanges durchgeführt. Dieser lieferte ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter *ALDH1*-mRNA-Expression in der EpCAM-positiven Fraktion und einem längeren PFS (Abb. 30, $p=0,03$; 8,4 vs. 4,6 Monate; $n=5$ vs. 16, $CI=0,04918-0,4793$; $[HR]=0,1535$).

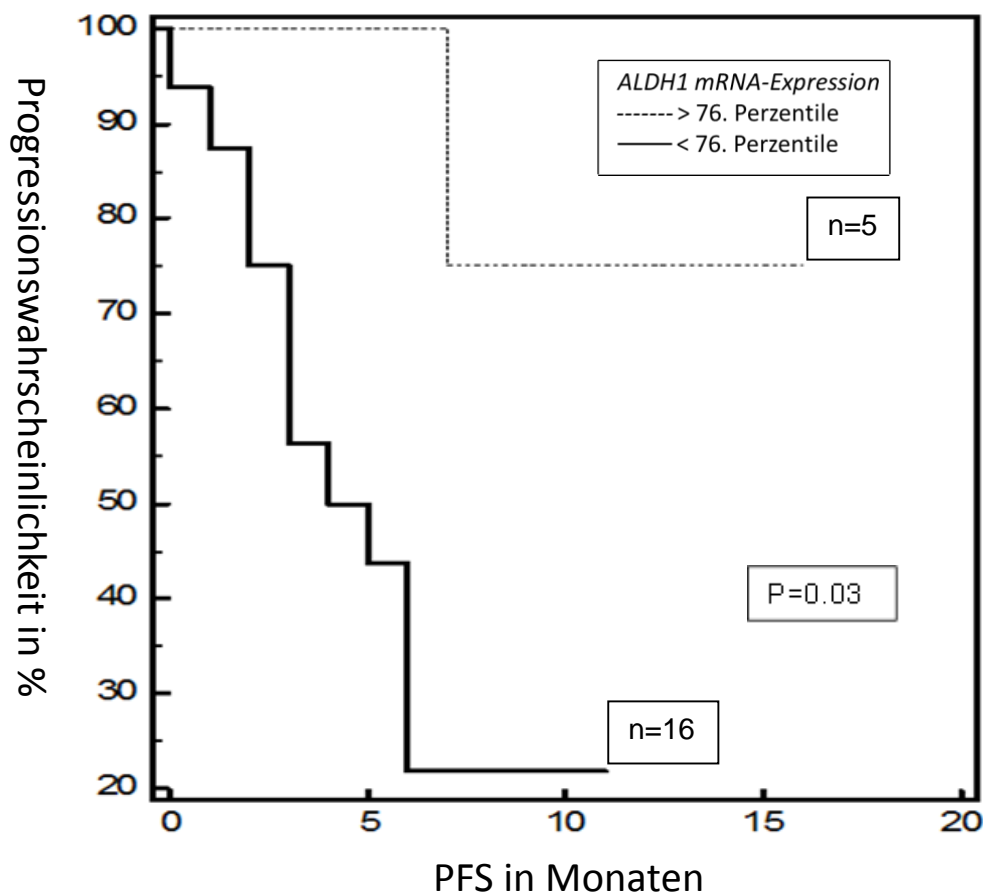


Abb.30: Kaplan-Meier-Test: Erhöhte *ALDH1*-Expressionen in der EpCAM-positiven Fraktion sind signifikant mit verlängertem PFS im Kaplan-Meier-Test korreliert (8,4 vs. 4,6 Monate; $n=5 > 76.$ Perzentile vs. $16 < 76.$ Perzentile; $p=0,03$).

Ebenso konnte für eine erhöhte *ALDH1*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion mittels Spearman-Test eine positive Korrelation zu der Länge des PFS gezeigt werden. Dieses könnte einen Zusammenhang andeuten, wenngleich keine Signifikanz vorliegt ($p=0,09$; $r=0,4$, $n=18$). Für einen Zusammenhang zwischen erhöhter *ALDH1*-mRNA-Expression spricht auch der Mann-Whitney-Test nach Festlegen eines Cut-offs bei 61. Perzentile mittels Entscheidungsbaum-Analyse ($p=0,07$; $n=18$, Abb. 31).

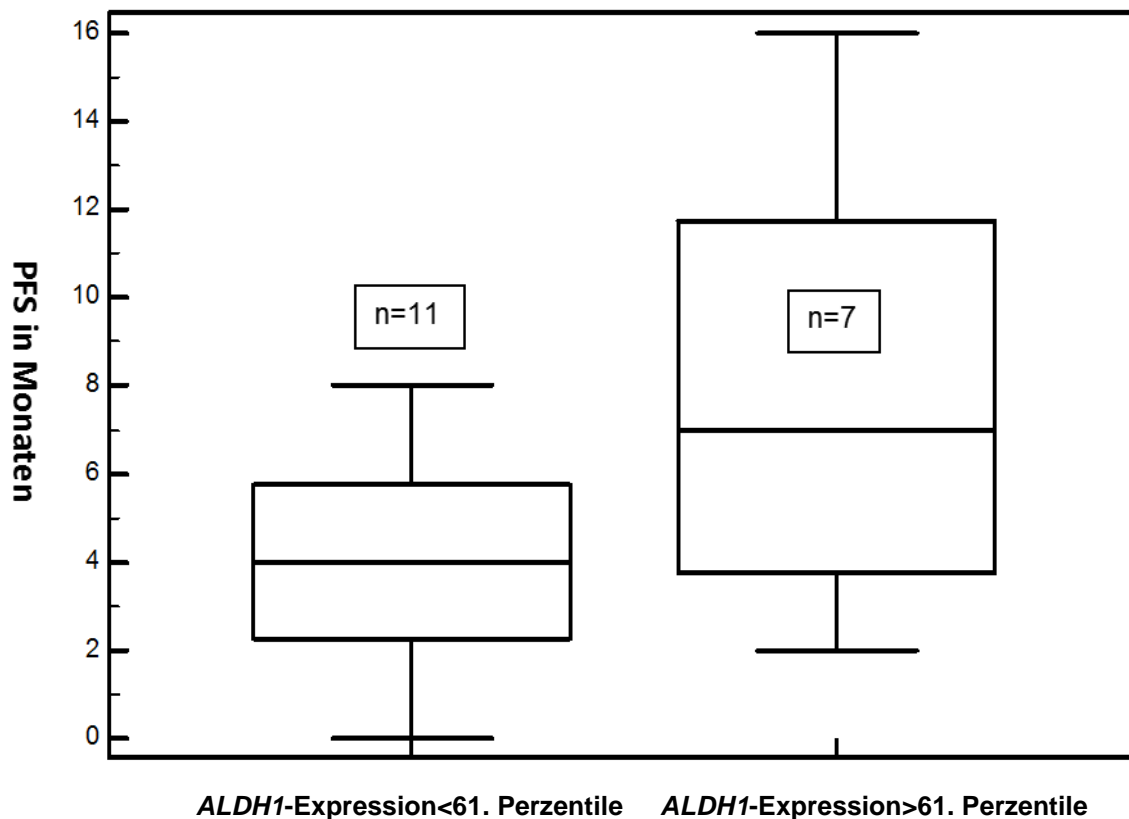


Abb.31: Mann-Whitney-Test vor Therapiebeginn in einem Box-and-Whisker-Plot mit Darstellung des Minimal- und Maximalwertes: Eine höhere *ALDH1*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion korreliert mit längerem PFS ($p=0,07$).

Patienten vor und unter laufender Therapie (n=43):

Für die *EpCAM*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion konnte im Kaplan-Meier-Test für einen Cut-off bei der 53. Perzentile, der durch Entscheidungsbaum-Analyse ermittelt wurde, gezeigt werden, dass eine stärkere *EpCAM*-mRNA-Expression signifikant mit einem verlängerten PFS einhergeht ($p=0,007$, 5 Monate vs. Endpunkt nicht erreicht, $n= 15$ vs. 13 ; $CI=0,1244-0,8266$; $[HR]=0,3207$), nachdem die Spearman-Rank-Korrelation ebenfalls einen positiven signifikanten Zusammenhang ($p=0,03$, $r=0,3$) ergab (siehe Abb.32).

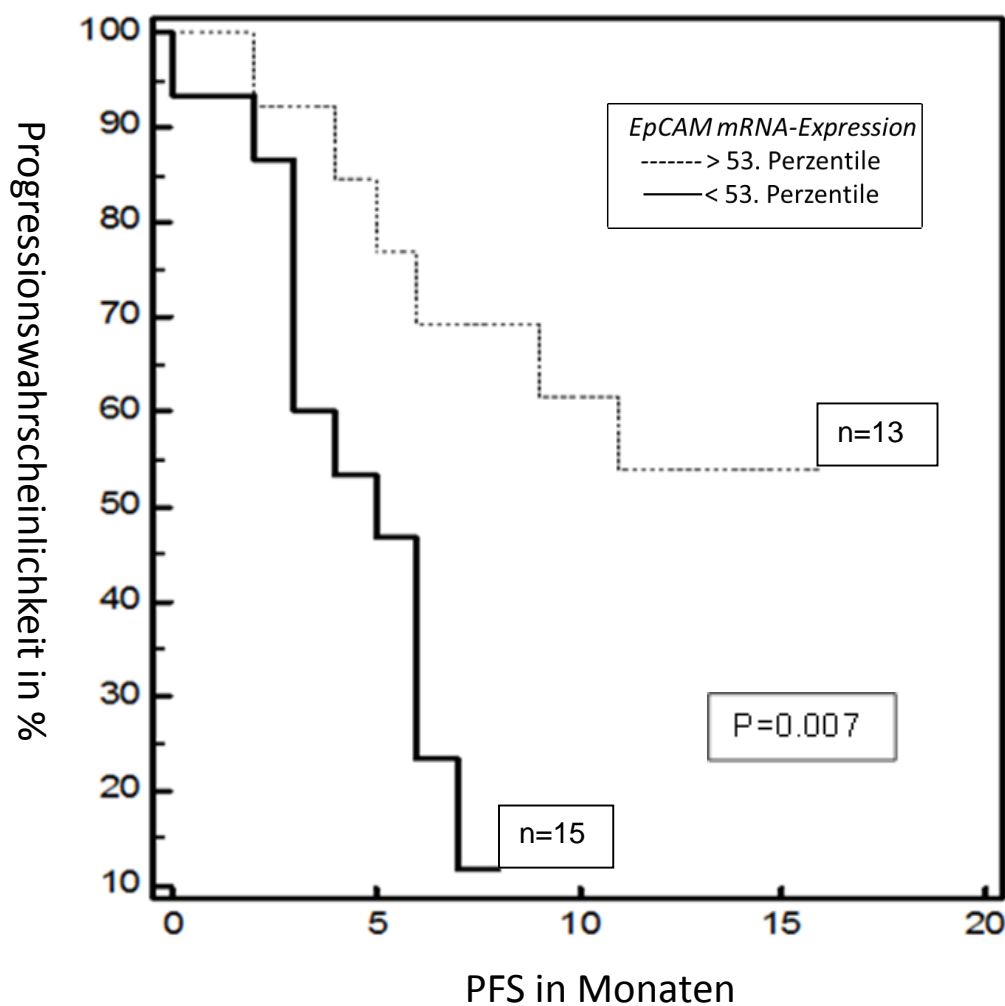


Abb.32: Kaplan-Meier-Test: Eine erhöhte *EpCAM*-mRNA Expression (>53. Perzentile) in der Restzellfraktion war signifikant mit verlängertem PFS korreliert ($p=0,007$).

Für die mRNA-Expression des EMT-Markers *Twist1* in der Restzellfraktion von neun Patienten, bei denen eine Expression nachgewiesen werden konnte, zeigte ein Spearman-Test einen signifikanten Zusammenhang zwischen Höhe der Expression und dem Ansprechen auf Chemotherapie ($p=0,01$; $r=0,78$; $n=9$). Eine daraufhin durchgeführte ROC-Kurven-Analyse konnte mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 100% zwischen Patienten mit gutem und solchen mit keinem sichtbaren Ansprechen auf Therapie unterscheiden ($p=0,0001$; $AUC=0,950$; $CI=0,593-1,0$). Von den neun Patienten wiesen vier eine partielle Remission des Tumorgeschehens auf, fünf eine unveränderte oder progrediente Situation. Eine höhere *Twist1*-mRNA-Expression ging mit einem schlechteren Ansprechen einher (Abb.33).

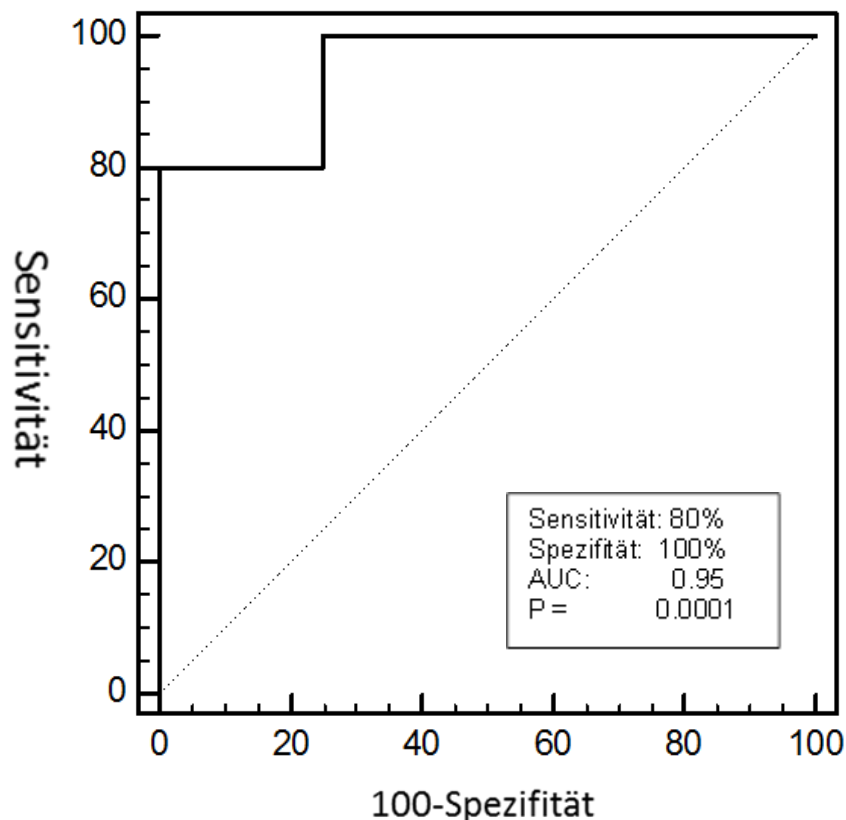


Abb.33: ROC-Kurven-Analyse: Mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 100% prognostizierte eine höhere *Twist1*-mRNA-Expression ein schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie ($p=0,0001$; $AUC: 0,95$).

In der EpCAM-positiven Zellfraktion konnte für die *CD133*-mRNA-Expression nach Festlegen eines Cut-offs bei der 25. Perzentile mittels Entscheidungsbaum-Analyse in der ROC-Kurven-Analyse ein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen gezeigt werden ($p=0,007$; $AUC=0,73$; $CI=0,516-0,892$). Der Test konnte mit einer Sensitivität von 55% und einer Spezifität von 92% signifikant zwischen elf Patienten mit schlechtem Ansprechen (SD/PD) und 13 Patienten mit gutem Ansprechen (PR) unterscheiden ($n=24$) (Abb.34). Die mRNA-Expression von *CD133* war bei den Patienten mit gutem Ansprechen durchschnittlich erhöht.

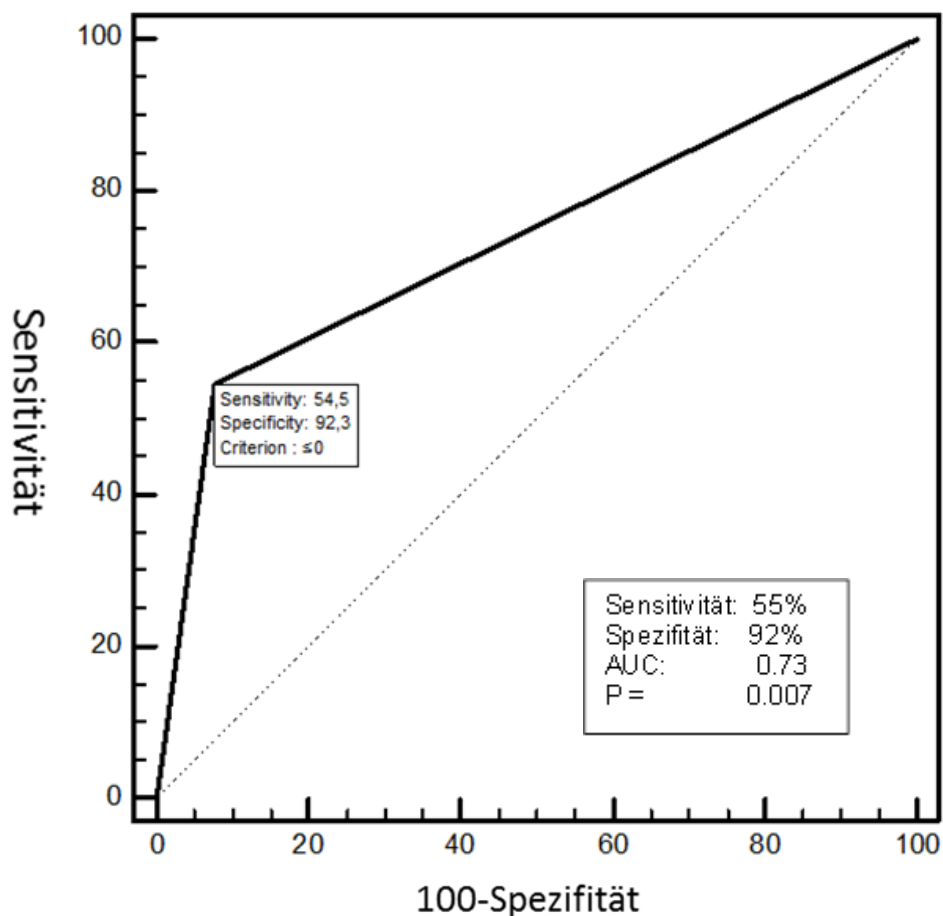


Abb.34: ROC-Kurven-Analyse: *CD133*-mRNA-Expression zur Unterscheidung zwischen gutem und schlechtem Therapieansprechen nach sechs Wochen.

Betrachtet man die *ALDH1*-Expression in der Restzellfraktion bei Patienten vor und unter Therapie, zeigt sich ein Zusammenhang zum Ansprechen auf die Therapie nach sechs Wochen. Die ROC-Analyse an 30 Patienten ergibt einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhter *ALDH1*-Expression (>73. Perzentile) und gutem Ansprechen (PR, partial response) auf die Therapie, sodass der Test anhand der *ALDH1*-Expression mit einer Sensitivität von 100% zwischen partiellem Ansprechen und unveränderter bzw. progredienter Erkrankung unterscheiden konnte. Die Spezifität von 40% ist dabei unzureichend (P=0,002, AUC=0,7; 15 Patienten PR vs. 15 Patienten SD/PD; CI=0,506-0,853; Abb. 35). Der Test liefert einen Hinweis, dass die Höhe der *ALDH1*-Expression potenziell für Aussagen zum Therapieansprechen herangezogen werden kann.

4.4.3 Kombination von Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen und real-time qRT-PCR

Im nächsten Schritt wurden nun die als signifikant identifizierten Marker aus den Multi-IF-Färbungen mit solchen der mRNA-Expressionsmessungen kombiniert, um mögliche Signaturen oder sogenannte Multi-Marker Panel-Tests zu identifizieren, die mit höherer Sensitivität und Spezifität anhand dieser Marker zwischen Ansprechen und Nicht-Ansprechen auf die Therapie unterscheiden können. Hierfür wurden Patienten vor und während der Chemotherapie eingeschlossen.

Es konnte in einer ROC-Kurven-Analyse für die mittels IF-Färbung ermittelte Pan-CK+-Zellzahl über einem Cut-off bei der 73. Perzentile, wenn gleichzeitig eine *Keratin18*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion über dem festgelegten Cut-off bei der 53. Perzentile qRT-PCR-basiert gemessen wurde, mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 56% zwischen neun Patienten mit partieller Remission und solchen sechs mit stabilem oder progredientem Krankheitsgeschehen unterschieden werden (Abb. 36, p=0,002; AUC=0,78; CI=0,495-0,946). Patienten mit Werten über der jeweils angegebenen Perzentile zeigten ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie.

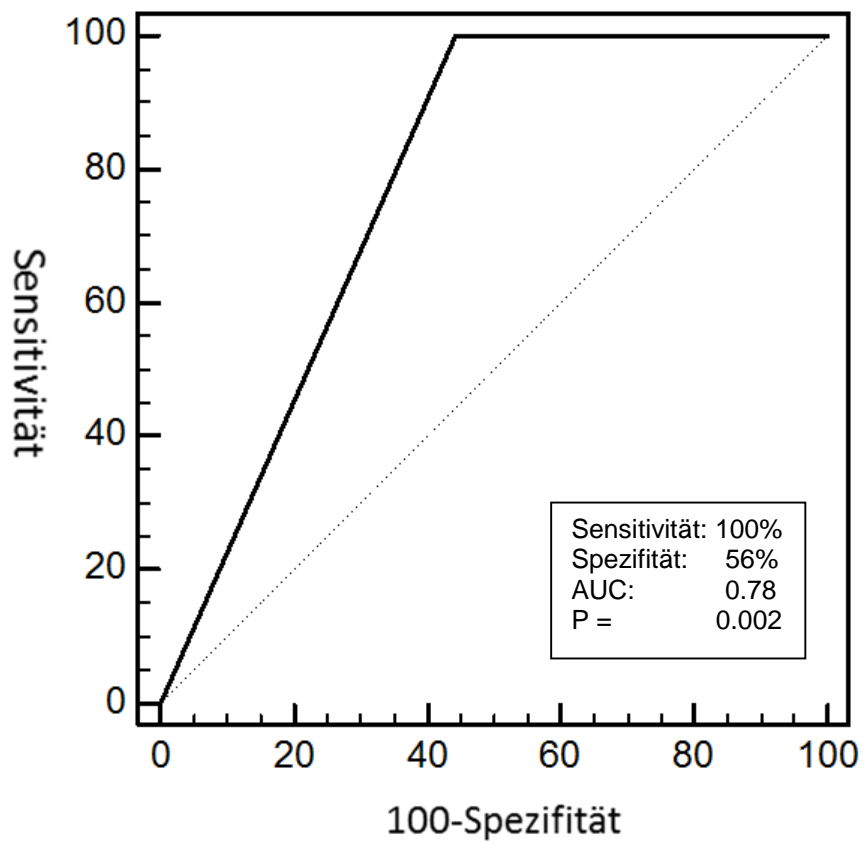


Abb.35: ROC-Kurven-Analyse: Eine erhöhte Pan-CK+-Zellzahl kombiniert mit erhöhter *Keratin18* mRNA-Expression als sensibler Test zur Evaluation des Therapieansprechens, PR vs. SD/PD ($p=0,002$; AUC: 0,78; $n=9$ PR vs. 6 SD/PD).

4.4.4 Vergleich neuer potenzieller Marker und der beim NSCLC etablierten Serummarker CYFRA 21-1 und CEA

Es wurde untersucht, inwieweit Zusammenhänge zwischen den in dieser Arbeit angewendeten Markern und CYFRA 21-1 (Cytokeratinfragment 19) oder CEA (Carcinoembryonales Antigen) bestehen, sofern beide Proben zur Bestimmung vom selben Zeitpunkt stammten. Beides sind Serummarker, die in der Klinik bei NSCLC-Patienten zur Beobachtung und Abschätzung des Krankheitsverlaufes eingesetzt werden, CEA allerdings nur bei Adenokarzinomen. CEA und CYFRA 21-1 wurden dabei vom Zentrallabor des Uniklinikums Essen bestimmt.

Die Spearman-Rank-Korrelation lieferte folgende signifikante Korrelationen:

mRNA-Expression	CEA im Serum	CYFRA 21-1 im Serum
Snail1 EpCAM+Fraktion	p=0,03 r=-0,44 n=23	
Snail1 Restzellfraktion	p=0,004 r=0,54 n=26	p=0,02 r=-0,47 n=24
Twist Restzellfraktion		p=0,002 r=-0,93 n=7
CD133 Restzellfraktion		p=0,02 r=-0,52 n=20

Tab.4: Korrelationen von uns verwendeter Marker mit den klinisch zur Verlaufskontrolle eingesetzten Serummarkern CYFRA 21-1 und CEA.

4.4.5 Unterschiede in der Markerexpression hinsichtlich der Histologie

Mittels Spearman-Test konnten signifikante Korrelationen zwischen dem Tumorstadium nach UICC-Kriterien und der Histologie des Tumors bei Patienten, die sich vor Therapiebeginn befanden, mit der Proteinexpression von *Keratin18* in der EpCAM-positiven Fraktion (p=0,004, r=0,601, n=21), *ALDH1* in der EpCAM-depletierten Fraktion (p=0,055, r=0,435, n=20) und *CD133* in der EpCAM-depletierten Fraktion (p=0,029, r=0,583, n=14) beobachtet werden.

Mögliche Expressionsunterschiede der Marker zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen wurden weiter mit dem Anova-Test („One-way analysis of variance“) geprüft. Dieser Test lieferte ebenfalls für *Keratin18* in der EpCAM-positiven Fraktion ($p=0,008$, Abb.39)) und für *ALDH1* in der EpCAM-depletierten Fraktion ($p=0,008$, Abb. 40), nicht jedoch für *CD133* in der EpCAM-depletierten Fraktion ($p=0,115$), ein signifikantes Ergebnis. Sowohl für *Keratin18* als auch für *ALDH1* zeigt sich bei Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu Adenokarzinomen eine stärkere Expression.

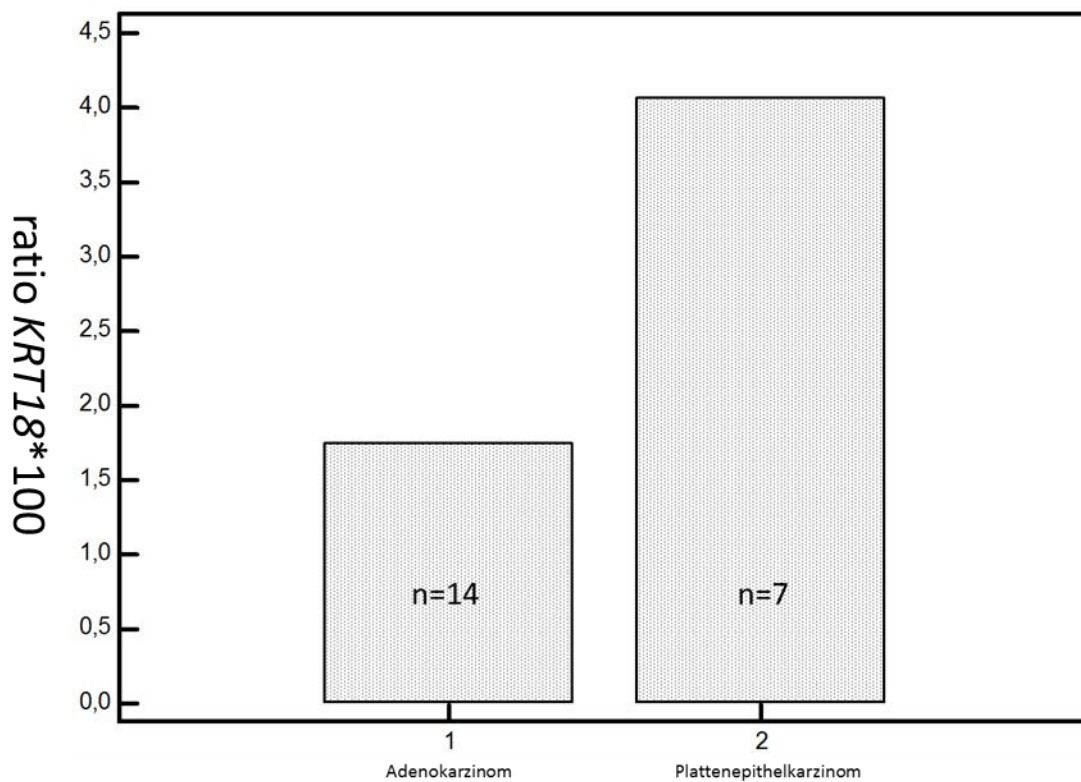


Abb.36: Unterschied in der *KRT18*-Expression zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen, dargestellt als Balkendiagramm.

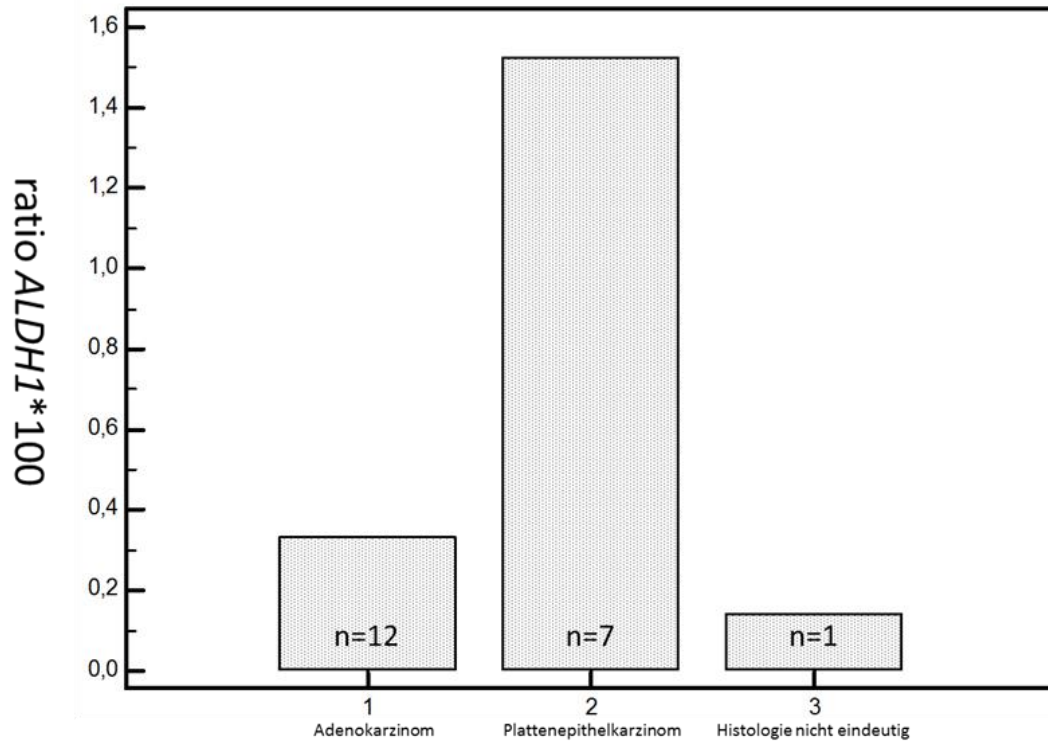


Abb.37: Unterschied in der *ALDH1*-Expression zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen, dargestellt als Balkendiagramm.

5 Diskussion

Methode zur Anreicherung und Isolierung von CTC

Mittlerweile konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass im peripheren Blut zirkulierende Tumorzellen eine heterogene Population darstellen, deren morphologische und molekulare Charakteristika nicht denen des Primärtumors oder einzelner Metastasen entsprechen müssen (O'Flaherty, Gray et al. 2012). Deshalb scheinen die bisher häufig verwendeten Isolierungstechniken, deren Detektionsspektrum auf epitheliale Marker wie EpCAM (Veridex CellSearch-System) oder verschiedene Zytokeratintypen (EPISPOT-Assay (Keratin19)) beschränkt sind, nur bedingt geeignet, alle Subgruppen zirkulierender Tumorzellen und damit einhergehend deren mutmaßlich unterschiedliche Eigenschaften abzubilden. Auch größenbasierte Anreicherungsverfahren sind wahrscheinlich nicht in der Lage, das komplette Spektrum der CTC zu detektieren, da anscheinend solche CTC vorkommen, welche die ungefähre Größe einer mononukleären Blutzelle aufweisen (Nel, Baba et al. 2013).

Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Konzeption der in der hier vorgelegten Promotionsarbeit verwendeten Methode, eine Negativanreicherung durchzuführen, d.h. hämatopoetische Zellen zu depletieren, um so eine möglichst umfängliche Darstellung der CTC-Subtypen zu erreichen. Dabei ist anzumerken, dass mit der angewendeten Methode keine vollständige Depletion erreicht werden konnte, sondern eine Depletionsrate von ca. 73% (Nel, Baba et al. 2013). Ein Nachteil der Negativ-Selektion ist also, dass der deutlich überwiegende Anteil der nach Anreicherung erhaltenen Zellen nach wie vor hämatopoetischen Ursprungs ist und somit einen leukozytären „Hintergrund“ verursacht. Warum eine vollständige Depletion der hämatopoetischen Zellen über den Pan-Leukozytenmarker CD45 nicht möglich ist, ist nur unzureichend verstanden und wird kontrovers diskutiert (Yang, Lang et al. 2009). Unter anderem zur Beseitigung dieses Hintergrundes wurde für die real-time qRT-PCR-Versuche auch eine Positiv-Selektion für epitheliale CTC mit Anti-EpCAM-Beads durchgeführt und anschließend sowohl in dieser als auch in der übrigen „Restzellfraktion“ die Bestimmung der verschiedenen Marker durchgeführt.

Ein weiterer streitbarer Punkt unserer Anreicherungs-methode sind in verschiedenen Arbeiten beschriebene zirkulierende Zellen, die neben epithelialen (hauptsächlich Pan-Zytokeratin) zusätzlich CD45 als hämatopoetischen Marker exprimieren (Yu, Stott et al. 2011), (Lustberg, Jatana et al. 2012). Muinelo-Romay et al. konnten solche Zellen ebenfalls detektieren, allerdings keinen Einfluss dieser Zellen auf das Überleben nachweisen. Zur CTC-Isolierung fand dabei das CellSearch-System Anwendung (Muinelo-Romay, Vieito et al. 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten CK+CD45+ -Zellen detektiert werden. Die sowohl CK- als auch CD45-positiven Zellen, die auch nach CD45-Depletion präsent sind, werden von Lustberg et al. ausnahmslos als positiv für CD13 beschrieben, ein Oberflächenantigen, welches unter anderem von Granulozyten, aber auch epithelialen Zellen exprimiert werden kann. Ein möglicher Erklärungsansatz zur Herkunft dieser Zellen ist das Knochenmark als Ursprungsort oder Durchgangsstation dieser Tumorzellen (Lustberg, Jatana et al. 2012). Die CD45-basierte Depletion von Leukozyten geht dementsprechend jedoch auch mit einem teilweisen Verlust dieser Zellen einher.

In dieser Arbeit wurden die unter das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom fallenden Adeno- und Plattenepithelkarzinome zusammen betrachtet. In Anbetracht dessen, dass es sich dabei histologisch um unterschiedliche Erkrankungen handelt, wurde geschaut, inwieweit die gemeinsame Betrachtung zulässig ist. Dieses wurde für die verwendeten Marker durch einen Spearman-Rank-Korrelationstest und die „One-way analysis of variance“ überprüft. Mittels dieser Tests wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den beiden Entitäten für die mittels PCR gemessenen Marker *Keratin18* und *ALDH1* festgestellt. So sind sowohl *Keratin18* ($p=0,008$) als auch *ALDH1* ($p=0,008$) beim Plattenepithelkarzinom signifikant stärker exprimiert. Für die übrigen verwendeten Marker zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Gemeinsam ist beiden (Sub-)Entitäten hingegen die Platin-basierte Chemotherapie.

Immunfluoreszenzbasierte Detektion von CTC

In NSCLC-Patienten konnten wir solche zirkulierenden Zellen nachweisen, die positiv für die Marker Pan-Zytokeratin, EpCAM, N-Cadherin, Twist und CD133 sind. Auf einem Objektträger wurden aufgrund der am Fluoreszenzmikroskop verfügbaren

Kanäle/Filter für bestimmte Wellenlängen und den erhältlichen Antikörerkombinationen neben DAPI zur Kernfärbung stets CD45 und Pan-Zytokeratin sowie entweder N-Cadherin, EpCAM oder CD133 angefärbt. Dieses führte dazu, dass es nicht möglich war, N-Cadherin und CD133 auf einem Slide gleichzeitig anzufärben, um mögliche Zusammenhänge zwischen CTC mit mesenchymalen Eigenschaften nach EMT und solchen mit Stammzeleigenschaften zu evaluieren. Derartige Zusammenhänge werden in der Literatur beschrieben, so beispielsweise die Generierung von Stammzellen durch den EMT-Prozess (Mani, Guo et al. 2008). Pro Untersuchungszeitpunkt standen je zwei Objektträger zur Verfügung.

Für die Detektion von CTC, die epitheliale Eigenschaften aufweisen, wurden Antikörper gegen Pan-CK und EpCAM eingesetzt. Beide sind als Antigene zur Detektion epithelialer CTC in der Literatur zahlreich beschrieben (Alix-Panabieres and Pantel 2013). Zu diskutieren ist jedoch die Frage, inwieweit Zellen epithelialer Herkunft auch im Blut Gesunder vorkommen bzw. benigne Erkrankungen, entzündliche Prozesse oder Umstände wie operative Eingriffe die Zahl Pan-CK positiver Zellen im Blut erhöhen. Pantel et al. beschrieben so etwa epitheliale Zellen im Blut von Patienten mit verschiedenen benignen Erkrankungen des Dickdarms (Pantel, Deneve et al. 2012). Andererseits kann auch eine geringe Spezifität der verwendeten Antikörper für falsch positive Ereignisse verantwortlich sein.

In den durchgeführten Färbungen wurde stets auch CD45 angefärbt, einerseits um auszuschließen, dass hämatopoetische Zellen fälschlicherweise positiv als CTC detektiert würden und andererseits als Nachweis einer suffizienten Färbung. Daraus ergab sich ein bereits erwähnter Diskussionspunkt (s.o.): Gibt es zirkulierende Tumorzellen, die auch CD45 exprimieren? 50% der Zellen, die als positiv für Pan-Zytokeratin detektiert wurden, sind auch positiv für CD45, wenngleich häufig in geringerer Intensität als die restlichen PBMC. In unserer Auswertung wurden diese Zellen als CTC gewertet, da kein Anhalt für eine Zytokeratinexpression hämatopoetischer Zellen gefunden werden konnte (Nel, Jehn et al. 2014). Neben einer möglichen „CTC-Durchwanderung“ des Knochenmarks könnte als mögliche Hypothese für eine (schwache) CD45-Expression Zytokeratin-positiver Zellen das Phänomen der „Trogozytose“, welches einen Austausch oder ein Übernehmen von Membranbestandteilen zwischen Zellen meint und auch für Tumorzellen beschrieben

ist, diskutiert werden (Dhainaut and Moser 2014). Es wurde etwa für Tumorzellen des Mammakarzinoms beschrieben, welche in der Lage sind, durch Trogozytose mesenchymale Eigenschaften wie die Expression von N-Cadherin zu aquirieren (Lis, Capdet et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde N-Cadherin als EMT-Marker ausgewählt, da Vimentin als das elementare Strukturprotein mesenchymaler Zellen auch von PBMC exprimiert wird, sodass es zur Detektion von CTC, deren Phänotyp mesenchymale Eigenschaften aufweist, nicht geeignet erschien. Es konnte ein verkürztes progressionsfreies Überleben bei Patienten nachgewiesen werden, in deren Blutprobe N-Cadherin-positive Zellen detektiert werden konnten, im Vergleich zu N-Cadherin-negativen Patienten. Für das Prostatakarzinom wurde durch Microarrays von Tumorgewebe bei einem Switch von E-Cadherin zu N-Cadherin ebenfalls eine Assoziation mit schlechter Prognose gezeigt (Gravdal, Halvorsen et al. 2007).

In einer Übersichtsarbeit, die elf verschiedene Publikationen über die CD133-Expression in solidem Tumorgewebe bei NSCLC untersuchte, konnte eine Assoziation von positiver CD133-Expression mit einem niedrigeren Differenzierungsgrad des Tumors und schlechter Prognose gezeigt werden. Dafür, dass eine erhöhte CD133-Expression in Tumorzellen bzw. CTC auch positive Korrelation zu Follow-up-Parametern oder günstigen Tumoreigenschaften zeigen könnte, lassen sich in der Literatur keine Hinweise finden.

Im Gegenteil wird dort eine Korrelation zwischen hoher CD133-Expression und schlechtem Gesamtüberleben beschrieben (Qu, Li et al. 2013). CTC, die CD133 exprimieren, wurden darüber hinaus beim kolorektalen Karzinom isoliert. Dort waren sie in fortgeschrittenen Stadien (Dukes B und C) prädiktiv für ein kürzeres Gesamtüberleben (Iinuma, Watanabe et al. 2011). Diese Beobachtungen decken sich mit dem Ergebnis unserer Färbungen bei NSCLC-Patienten, dass bei Anwesenheit von CD133-positiven Zellen neben Pan-CK-positiven Zellen das progressionsfreie Überleben im Vergleich zu Patienten ohne CD133-positive Zellen signifikant um sechs Monate verkürzt war.

real-time qRT-PCR-basierte Detektion von CTC

Von den mittels real-time qRT-PCR evaluierten Markern, deren Expression jeweils in der positiv angereicherten Fraktion wie auch der Restzellfraktion gemessen wurden, zeigen *EpCAM*, *Keratin18*, *Twist1*, *ALDH1* und *CD133* signifikante Assoziationen zu den Follow-up-Parametern PFS und/oder Response.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass eine erhöhte *Keratin18*-Expression prognostisch günstig oder ungünstig sein kann, abhängig davon, ob die Zellen gleichzeitig EpCAM auf der Zelloberfläche exprimieren oder nicht. Für die mittels Anti-EpCAM-Beads positiv angereicherte Zellfraktion liefert die Kaplan-Meier-Analyse ein signifikant längeres PFS für Patienten mit einer erhöhten Expression von *Keratin18* (>67. Perzentile), für die Restzell- und damit EpCAM-depletierte Fraktion hingegen zeigt eine ROC-Kurven-Analyse eine zu 70% sensitive und 78% spezifische Differenzierung zwischen besserem und schlechterem Therapieansprechen, wobei hier eine erhöhte *Keratin18*-Expression (> 53. Perzentile) mit schlechterem Ansprechen assoziiert ist.

Für die *EpCAM*-mRNA-Expression ergaben die Experimente ebenso einen positiven Zusammenhang zwischen höherer *EpCAM*-Expression (>71. Perzentile) und längerem PFS. Dieses ist mit Arbeiten anderer Autoren nicht in direkten Einklang zu bringen. Eine höhere Expression von *EpCAM* in CTC sowohl auf immunologischer als auch molekularer Ebene wird dort bei verschiedenen Karzinomentitäten als für den Krankheitsverlauf negativ beschrieben (Ni, Cozzi et al. 2013), (Schulze, Gasch et al. 2013). Allerdings stellen Hosokawa et al. aufgrund ihrer Beobachtung, dass mit fortgeschrittenem Tumorstadium die Anzahl EpCAM-positiver Zellen, welche mittels CellSearch System isoliert werden können, signifikant abnimmt, die Hypothese auf, dass die Abnahme dieser Zellen durch EMT und damit einem Switch zu aggressiveren CTC-Subtypen bedingt ist (Hosokawa, Kenmotsu et al. 2013), Patienten mit vermehrter *EpCAM*-Expression also weniger aggressive zirkulierende Tumorzellsubtypen aufweisen.

Bei neun von 51 mittels PCR untersuchten Patientenproben konnte eine Expression des EMT-Markers *Twist1* festgestellt werden. Eine höhere *Twist1*-Expression in den positiven Proben zeigte sich in der ROC-Kurven-Analyse prädiktiv für ein schlechtes Therapieansprechen nach sechs Wochen (Sensitivität 100%, Spezifität 80%). Ein

signifikanter Einfluss auf das PFS zeigte sich allerdings nicht. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer Arbeit von Hui et al. aus 2013, welche die *Twist1*-Expression in solidem Tumorgewebe untersucht haben (Hui, Zhang et al. 2013).

In Bezug auf den zweiten in dieser Arbeit untersuchten EMT-Marker *Snail1* konnte hier keine signifikante Assoziation zu Follow-up-Daten ermittelt werden. In der Literatur wird eine Assoziation unter anderem von Min et. al. beim hepatozellulären Karzinom beschrieben, genauer ein positiver Zusammenhang zwischen hoher *Snail*-Expression im Tumorgewebe und extrahepatischer Metastasierung (Min, Choi et al. 2009). Für das NSCLC konnte gezeigt werden, dass eine höhere Expression von *Snail1* (neben anderen EMT-Markern) mit höherer Strahlen-Resistenz der Tumorzellen einhergeht (Gomez-Casal, Bhattacharya et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit stellt sich allerdings ein signifikanter Zusammenhang zwischen *Snail1* und den serologischen Tumormarkern CEA und CYFRA 21-1 dar. Dabei korreliert die *Snail1*-Expression in der Restzellfraktion umgekehrt mit der Serumkonzentration von CEA und CYFRA 21-1. Da erhöhte Serumwerte dieser Tumormarker im Allgemeinen auf eine hohe Tumorlast hindeuten (Pang, Wang et al. 2013), scheint eine erhöhte *Snail1*-Expression prognostisch eher günstig zu sein, was jedoch Ergebnissen anderer Studien und Erkenntnissen über die Auswirkungen von EMT, bei der *Snail1* eine wichtige Rolle spielt, widerspricht (s.o.).

Es wird in dieser Arbeit eine positive Assoziation zwischen höherer *ALDH1*-Expression und besserer Prognose gezeigt. Zur Bedeutung von *ALDH1* als Stammzellmarker für die Prognose liefern andere Arbeiten unterschiedliche Ergebnisse. So beschreiben Dimou et al. ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen höherer *ALDH1*-Expression und besserer Prognose, gemessen in solidem Tumorgewebe von NSCLC-Patienten (Dimou, Neumeister et al. 2012). Jiang et al. hingegen beobachten eine Korrelation zwischen höherer *ALDH1*-Aktivität in Tumorzellen, die mithilfe des „Aldefluor“-Assay isoliert wurden, und geringerer Differenzierung sowie schlechterer Prognose beim NSCLC (Jiang, Qiu et al. 2009). Von Kasimir-Bauer et al. wird für CTC aus Brustkrebspatientinnen ein Zusammenhang zwischen *ALDH1*-Expression und Therapieresistenz sowie schlechterer Prognose dargelegt (Kasimir-Bauer, Hoffmann et al. 2012).

Zu hinterfragen ist weiterhin der Punkt, inwieweit es zulässig ist, Patienten vor Start der Chemotherapie mit solchen, die sich bereits unter Therapie befinden, in einer Gruppe gemeinsam zu betrachten. Einerseits wird ein Teil der CTC, insbesondere solche mit EMT- oder Stammzelleigenschaften, als chemotherapieresistent beschrieben (Liu, Zhang et al. 2014), andererseits scheinen bestimmte Subgruppen unter Umständen doch von einer Therapie beeinflusst zu werden, sodass ein Einsatz zum Therapiemonitoring überhaupt möglich ist (Usiakova, Mikulova et al. 2014).

Die größte Problematik der von uns angewendeten real-time qRT-PCR stellt der leukozytäre Hintergrund dar, der auch nach Anreicherung mittels EpCAM-Beads und Depletion von hämatopoetischer Zellen immer noch vorhanden ist. Nel et al. konnten trotz des leukozytären Hintergrundes für die in dieser Arbeit angewendeten Methode zeigen, dass es möglich ist, quantitative mRNA-Expressionsunterschiede verschiedener CTC-Marker zu detektieren und hinsichtlich des klinischen Therapieansprechens zu betrachten (Nel, Baba et al. 2014).

Generelle Schwierigkeiten und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen lediglich einen Ansatz dar, mögliche prognostisch relevante Marker für CTC zu identifizieren. Es soll die Grundidee aufgezeigt werden, CTC als heterogene Population zu begreifen und diese in Isolierung und Detektion möglichst weitreichend zu erfassen. Eine Validierung dieser Marker an größeren, homogeneren Patientengruppen (Stadium, Histologie, Therapiezeitpunkt) ist unerlässlich, um eine suffiziente statistische Auswertung zu ermöglichen, welches mangels größerer Probenzahlen in diesem Rahmen nicht möglich war. Weiterhin wäre eine Beobachtung und der Vergleich von Patienten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten äußerst hilfreich, um den Einfluss einer Chemotherapie auf CTC-Zahlen und -Morphologie genau zu beobachten.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zirkulierende Tumorzellen (CTC) von Patienten, die an einem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) leiden, mithilfe immunomagnetischer Beads angereichert und isoliert. Diese Zellen wurden auf ihre Anwendbarkeit hinsichtlich eines möglichen prognostischen Vorhersagewertes mittels der Multi-Immunfluoreszenzfärbung und der real-time quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion untersucht.

Dabei wurden Marker ausgewählt, die eine Differenzierung zwischen epithelialen, mesenchymalen und stammzellartigen Eigenschaften ermöglichen. Ein etwaiger Zugewinn mesenchymaler oder stammzellartiger Eigenschaften im Kontext einer Epithelial-Mesenchymalen Transition dieser ursprünglich epithelialen Zellen wird in der Literatur mit einem aggressiveren Wachstum, höherem Metastasierungspotential und gesteigerter Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht. Das CTC-„Profil“ eines Patienten könnte so also in der Lage sein, wertvolle Informationen über den individuellen Krankheitsverlauf zu liefern. So weisen in der vorliegenden Arbeit vor allem die Anwesenheit N-Cadherin-positiv gefärbter Zellen bei Patienten sowie verhältnismäßig erhöhte Expressionen von *Keratin18*, *EpCAM* und der *Aldehyddehydrogenase1* auf eine prognostische Relevanz hin.

Diese Arbeit zeigt Ansätze auf, sich der Anwendbarkeit von zirkulierenden Tumorzellen bei NSCLC-Patienten als prognostisches Werkzeug und als Möglichkeit zum individuellen Therapiemonitoring bzw. zur Therapiesteuerung einer Platin-basierten Chemotherapie zu nähern. Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis individueller Variationen der Zusammensetzung zirkulierender Tumorzellen beim NSCLC, welche mit unterschiedlichen klinischen Parametern korrelieren.

Weiterhin konnte belegt werden dass diese Zellen sich als Ausgangspunkt für sogenannte „Downstream“-Analysen eignen (beispielsweise FICTION-Technik).

7 Referenzen

1. Alix-Panabieres, C. (2012). "EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients." Recent Results Cancer Res 195: 69-76.
2. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel (2013). "Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer." Clin Chem 59(1): 110-118.
3. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel (2014). "Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision." Lab Chip 14(1): 57-62.
4. Barak, V., H. Goike, K. W. Panaretakis and R. Einarsson (2004). "Clinical utility of cytokeratins as tumor markers." Clin Biochem 37(7): 529-540.
5. Breitenbuecher, F., S. Hoffarth, K. Worm, D. Cortes-Incio, T. C. Gauler, J. Kohler, T. Herold, S. Kurt Werner, L. Freitag, S. Kasper and M. Schuler (2014). "Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients." PLoS One 9(1): e85350.
6. Brodowicz, T., T. Ciuleanu, J. Crawford, M. Filipits, J. R. Fischer, V. Georgoulas, C. Gridelli, F. R. Hirsch, J. Jassem, P. Kosmidis, M. Krzakowski, C. Manegold, J. L. Pujol, R. Stahel, N. Thatcher, J. Vansteenkiste, C. Minichsdorfer, S. Zochbauer-Muller, R. Pirker and C. C. Zielinski (2012). "Third ECOG consensus on the systemic treatment of non-small-cell lung cancer." Ann Oncol 23(5): 1223-1229.
7. Campos, M., R. Luque, J. Jimenez, R. Martinez, F. Warleta, C. Sanchez-Quesada, M. Delgado-Rodriguez, A. Calvo and J. J. Gaforio (2013). "Simultaneous phenotypic and genetic characterization of single circulating tumor cells from colon cancer patients." Histol Histopathol.
8. Campos, M., C. Prior, F. Warleta, I. Zudaire, J. Ruiz-Mora, R. Catena, A. Calvo and J. J. Gaforio (2008). "Phenotypic and genetic characterization of circulating tumor cells by combining immunomagnetic selection and FICTION techniques." J Histochem Cytochem 56(7): 667-675.
9. Camps, C., E. Felip, R. Garcia-Campelo, J. M. Trigo and P. Garrido (2013). "SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2013." Clin Transl Oncol.
10. Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." Science 331(6024): 1559-1564.
11. Chang, J. S., L. T. Chen, Y. S. Shan, S. F. Lin, S. Y. Hsiao, C. R. Tsai, S. J. Yu and H. J. Tsai (2015). "Comprehensive Analysis of the Incidence and Survival Patterns of Lung Cancer by Histologies, Including Rare Subtypes, in the Era of Molecular Medicine and Targeted Therapy: A Nation-Wide Cancer Registry-Based Study From Taiwan." Medicine (Baltimore) 94(24): e969.
12. Chen, Y., T. Cui, L. Yang, M. Mireskandari, T. Knoesel, Q. Zhang, M. Pacyna-Gengelbach and I. Petersen (2011). "The diagnostic value of cytokeratin 5/6, 14, 17, and 18 expression in human non-small cell lung cancer." Oncology 80(5-6): 333-340.
13. Collins, L. G., C. Haines, R. Perkel and R. E. Enck (2007). "Lung cancer: diagnosis and management." Am Fam Physician 75(1): 56-63.
14. Coumans, F. A., S. Siesling and L. W. Terstappen (2013). "Detection of cancer before distant metastasis." BMC Cancer 13: 283.
15. Creighton, C. J., D. L. Gibbons and J. M. Kurie (2013). "The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective." Cancer Manag Res 5: 187-195.

16. de Mello, R. A., P. Madureira, L. S. Carvalho, A. Araujo, M. O'Brien and S. Popat (2013). "EGFR and KRAS mutations, and ALK fusions: current developments and personalized therapies for patients with advanced non-small-cell lung cancer." Pharmacogenomics 14(14): 1765-1777.
17. Dhainaut, M. and M. Moser (2014). "Regulation of immune reactivity by intercellular transfer." Front Immunol 5: 112.
18. Dimou, A., V. Neumeister, S. Agarwal, V. Anagnostou, K. Syrigos and D. L. Rimm (2012). "Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer." Am J Pathol 181(4): 1436-1442.
19. Eberhardt, W. E., T. C. Gauler, C. Lepechoux, G. Stamatis, S. Bildat, T. Krbek, S. Welter, D. Grunenwald, B. Fischer, L. Rodrigo Hde, D. Theegarten, T. Le Chevalier, S. Seeber, M. Stuschke and C. Poettgen (2013). "10-year long-term survival (LTS) of induction chemotherapy with three cycles cisplatin/paclitaxel followed by concurrent chemoradiation cisplatin/etoposide/45 Gy (1.5 Gy bid) plus surgery in locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)-a multicenter phase-II trial (CISTAXOL)." Lung Cancer 82(1): 83-89.
20. Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe and J. Verweij (2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." Eur J Cancer 45(2): 228-247.
21. Esmaeilsabzali, H., T. V. Beischlag, M. E. Cox, A. M. Parameswaran and E. J. Park (2013). "Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods." Biotechnol Adv 31(7): 1063-1084.
22. Fehm, T., O. Hoffmann, B. Aktas, S. Becker, E. F. Solomayer, D. Wallwiener, R. Kimmig and S. Kasimir-Bauer (2009). "Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells." Breast Cancer Res 11(4): R59.
23. Franco-Chuaire, M. L., S. C. Magda Carolina and L. Chuaire-Noack (2013). "Epithelial-mesenchymal transition (EMT): principles and clinical impact in cancer therapy." Invest Clin 54(2): 186-205.
24. Gerber, D. E., P. K. Paik and A. Dowlati (2015). "Beyond adenocarcinoma: current treatments and future directions for squamous, small cell, and rare lung cancer histologies." Am Soc Clin Oncol Educ Book: 147-162.
25. Giordano, A. and M. Cristofanilli (2012). "CTCs in metastatic breast cancer." Recent Results Cancer Res 195: 193-201.
26. Gomez-Casal, R., C. Bhattacharya, N. Ganesh, L. Bailey, P. Basse, M. Gibson, M. Epperly and V. Levina (2013). "Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes." Mol Cancer 12(1): 94.
27. Gorgens, A., A. K. Ludwig, M. Mollmann, A. Krawczyk, J. Durig, H. Hanenberg, P. A. Horn and B. Giebel (2014). "Multipotent hematopoietic progenitors divide asymmetrically to create progenitors of the lymphomyeloid and erythromyeloid lineages." Stem Cell Reports 3(6): 1058-1072.
28. Gravdal, K., O. J. Halvorsen, S. A. Haukaas and L. A. Akslen (2007). "A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer." Clin Cancer Res 13(23): 7003-7011.
29. Griesinger, F., W. Eberhardt, M. Früh, O. Gautschi and W. Hilbe (2015). "Leitlinien, Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC), Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik

und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen."

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsccl>.

30. Hecht, S. S. (1999). "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 91(14): 1194-1210.
31. Hofman, V., C. Bonnetaud, M. I. Ilie, P. Vielh, J. M. Vignaud, J. F. Flejou, S. Lantuejoul, E. Piaton, N. Mourad, C. Butori, E. Selva, M. Poudenx, S. Sibon, S. Kelhef, N. Venissac, J. P. Jais, J. Mouroux, T. J. Molina and P. Hofman (2011). "Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker." *Clin Cancer Res* 17(4): 827-835.
32. Hosokawa, M., H. Kenmotsu, Y. Koh, T. Yoshino, T. Yoshikawa, T. Naito, T. Takahashi, H. Murakami, Y. Nakamura, A. Tsuya, T. Shukuya, A. Ono, H. Akamatsu, R. Watanabe, S. Ono, K. Mori, H. Kanbara, K. Yamaguchi, T. Tanaka, T. Matsunaga and N. Yamamoto (2013). "Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system." *PLoS One* 8(6): e67466.
33. Hui, L., S. Zhang, X. Dong, D. Tian, Z. Cui and X. Qiu (2013). "Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC." *PLoS One* 8(4): e62171.
34. Husemann, Y., J. B. Geigl, F. Schubert, P. Musiani, M. Meyer, E. Burghart, G. Forni, R. Eils, T. Fehm, G. Riethmuller and C. A. Klein (2008). "Systemic spread is an early step in breast cancer." *Cancer Cell* 13(1): 58-68.
35. Iinuma, H., T. Watanabe, K. Mimori, M. Adachi, N. Hayashi, J. Tamura, K. Matsuda, R. Fukushima, K. Okinaga, M. Sasako and M. Mori (2011). "Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer." *J Clin Oncol* 29(12): 1547-1555.
36. Izbicki, J. R., S. B. Hosch, U. Pichlmeier, A. Rehders, C. Busch, A. Niendorf, B. Passlick, C. E. Broelsch and K. Pantel (1997). "Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer." *N Engl J Med* 337(17): 1188-1194.
37. Jiang, F., Q. Qiu, A. Khanna, N. W. Todd, J. Deepak, L. Xing, H. Wang, Z. Liu, Y. Su, S. A. Stass and R. L. Katz (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer." *Mol Cancer Res* 7(3): 330-338.
38. Juan, O., J. Vidal, R. Gisbert, J. Munoz, S. Macia and J. Gomez-Codina (2013). "Prognostic significance of circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with docetaxel and gemcitabine." *Clin Transl Oncol*.
39. Kasimir-Bauer, S., O. Hoffmann, D. Wallwiener, R. Kimmig and T. Fehm (2012). "Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells." *Breast Cancer Res* 14(1): R15.
40. Keysar, S. B. and A. Jimeno (2010). "More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules." *Mol Cancer Ther* 9(9): 2450-2457.
41. Khan, M. A., H. C. Chen, D. Zhang and J. Fu (2013). "Twist: a molecular target in cancer therapeutics." *Tumour Biol* 34(5): 2497-2506.
42. Konigsberg, R., E. Obermayr, G. Bises, G. Pfeiler, M. Gneist, F. Wrba, M. de Santis, R. Zeillinger, M. Hudc and C. Dittrich (2011). "Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients." *Acta Oncol* 50(5): 700-710.
43. Koren, A., H. Motaln and T. Cufer (2013). "Lung cancer stem cells: a biological and clinical perspective." *Cell Oncol (Dordr)* 36(4): 265-275.

44. Krebs, M. G., R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, J. M. Hou, A. Greystoke, T. H. Ward, R. Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive and F. H. Blackhall (2011). "Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 29(12): 1556-1563.
45. Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." *J Cell Biol* 172(7): 973-981.
46. Li, Z. (2013). "CD133: a stem cell biomarker and beyond." *Exp Hematol Oncol* 2(1): 17.
47. Liberko, M., K. Kolostova and V. Bobek (2013). "Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice." *Crit Rev Oncol Hematol* 88(2): 338-356.
48. Ligthart, S. T., F. A. Coumans, F. C. Bidard, L. H. Simkens, C. J. Punt, M. R. de Groot, G. Attard, J. S. de Bono, J. Y. Pierga and L. W. Terstappen (2013). "Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer." *PLoS One* 8(6): e67148.
49. Lis, R., J. Capdet, P. Mirshahi, M. Lacroix-Triki, F. Dagonnet, C. Klein, M. Mirshahi, J. J. Fournie, A. Raffi and M. Poupot (2010). "Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells." *Int J Oncol* 37(6): 1453-1461.
50. Liu, H., X. Zhang, J. Li, B. Sun, H. Qian and Z. Yin (2014). "The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells." *J Cancer Res Clin Oncol*.
51. Lustberg, M., K. R. Jatana, M. Zborowski and J. J. Chalmers (2012). "Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells." *Recent Results Cancer Res* 195: 97-110.
52. Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* 133(4): 704-715.
53. Marrinucci, D., K. Bethel, R. H. Bruce, D. N. Curry, B. Hsieh, M. Humphrey, R. T. Krivacic, J. Kroener, L. Kroener, A. Ladanyi, N. H. Lazarus, J. Nieva and P. Kuhn (2007). "Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells." *Hum Pathol* 38(3): 514-519.
54. Martin-Subero, J. I., I. Chudoba, L. Harder, S. Gesk, W. Grote, F. J. Novo, M. J. Calasanz and R. Siebert (2002). "Multicolor-FUNCTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses." *Am J Pathol* 161(2): 413-420.
55. Min, A. L., J. Y. Choi, H. Y. Woo, J. D. Kim, J. H. Kwon, S. H. Bae, S. K. Yoon, S. H. Shin, Y. J. Chung and C. K. Jung (2009). "High expression of Snail mRNA in blood from hepatocellular carcinoma patients with extra-hepatic metastasis." *Clin Exp Metastasis* 26(7): 759-767.
56. Molina, J. R., P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild and A. A. Adjei (2008). "Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship." *Mayo Clin Proc* 83(5): 584-594.
57. Moll, R. (1994). "Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors." *Int J Biol Markers* 9(2): 63-69.
58. Muineloro-Romay, L., M. Vieito, A. Abalo, M. A. Nocelo, F. Baron, U. Anido, E. Brozos, F. Vazquez, S. Aguin, M. Abal and R. L. Lopez (2014). "Evaluation of Circulating Tumor Cells and Related Events as Prognostic Factors and Surrogate Biomarkers in Advanced NSCLC Patients Receiving First-Line Systemic Treatment." *Cancers (Basel)* 6(1): 153-165.
59. Negrath, S., L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. A. Haber and M. Toner (2007). "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology." *Nature* 450(7173): 1235-1239.

60. Nel, I., H. A. Baba, J. Ertle, F. Weber, B. Sitek, M. Eisenacher, H. E. Meyer, J. F. Schlaak and A. C. Hoffmann (2013). "Individual profiling of circulating tumor cell composition and therapeutic outcome in patients with hepatocellular carcinoma." Transl Oncol 6(4): 420-428.
61. Nel, I., H. A. Baba, F. Weber, B. Sitek, M. Eisenacher, H. E. Meyer, J. F. Schlaak and A. C. Hoffmann (2014). "IGFBP1 in epithelial circulating tumor cells as a potential response marker to selective internal radiation therapy in hepatocellular carcinoma." Biomark Med 8(5): 687-698.
62. Nel, I., U. Jehn, T. Gauler and A. C. Hoffmann (2014). "Individual profiling of circulating tumor cell composition in patients with non-small cell lung cancer receiving platinum based treatment." Transl Lung Cancer Res 3(2): 100-106.
63. Ni, J., P. Cozzi, J. Hao, J. Beretov, L. Chang, W. Duan, S. Shigdar, W. Delprado, P. Graham, J. Bucci, J. Kearsley and Y. Li (2013). "Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway." Int J Biochem Cell Biol 45(12): 2736-2748.
64. O'Flaherty, J. D., S. Gray, D. Richard, D. Fennell, J. J. O'Leary, F. H. Blackhall and K. J. O'Byrne (2012). "Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer." Lung Cancer 76(1): 19-25.
65. Pallier, K., A. Cessot, J. F. Cote, P. A. Just, A. Cazes, E. Fabre, C. Danel, M. Riquet, M. Devouassoux-Shisheboran, S. Ansieau, A. Puisieux, P. Laurent-Puig and H. Blons (2012). "TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma." PLoS One 7(1): e29954.
66. Pang, L., J. Wang, Y. Jiang and L. Chen (2013). "Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer." Exp Ther Med 6(2): 355-360.
67. Pantel, K., E. Deneve, D. Nocca, A. Coffy, J. P. Vendrell, T. Maudelonde, S. Riethdorf and C. Alix-Panabieres (2012). "Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases." Clin Chem 58(5): 936-940.
68. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin 55(2): 74-108.
69. Qu, H., R. Li, Z. Liu, J. Zhang and R. Luo (2013). "Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review." Int J Clin Exp Pathol 6(11): 2644-2650.
70. Rami-Porta, R., J. J. Crowley and P. Goldstraw (2009). "The revised TNM staging system for lung cancer." Ann Thorac Cardiovasc Surg 15(1): 4-9.
71. Riethdorf, S., H. Fritsche, V. Muller, T. Rau, C. Schindlbeck, B. Rack, W. Janni, C. Coith, K. Beck, F. Janicke, S. Jackson, T. Gornet, M. Cristofanilli and K. Pantel (2007). "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system." Clin Cancer Res 13(3): 920-928.
72. Riethdorf, S. and K. Pantel (2008). "Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization." Pathobiology 75(2): 140-148.
73. Rossi, E., U. Basso, R. Celadin, F. Zilio, S. Pucciarelli, M. Aieta, C. Barile, T. Sava, G. Bonciarelli, S. Tumolo, C. Ghiotto, C. Magro, A. Jirillo, S. Indraccolo, A. Amadori and R. Zamarchi (2010). "M30 neoepitope expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis." Clin Cancer Res 16(21): 5233-5243.

74. Sanchez-Tillo, E., Y. Liu, O. de Barrios, L. Siles, L. Fanlo, M. Cuatrecasas, D. S. Darling, D. C. Dean, A. Castells and A. Postigo (2012). "EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness." Cell Mol Life Sci 69(20): 3429-3456.
75. Satelli, A. and S. Li (2011). "Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy." Cell Mol Life Sci 68(18): 3033-3046.
76. Saucedo-Zeni, N., S. Mewes, R. Niestroj, L. Gasiowski, D. Murawa, P. Nowaczyk, T. Tomasi, E. Weber, G. Dworacki, N. G. Morgenthaler, H. Jansen, C. Propping, K. Sterzynska, W. Dyszkiewicz, M. Zabel, M. Kiechle, U. Reuning, M. Schmitt and K. Lucke (2012). "A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire." Int J Oncol 41(4): 1241-1250.
77. Schnell, U., V. Cirulli and B. N. Giepmans (2013). "EpCAM: structure and function in health and disease." Biochim Biophys Acta 1828(8): 1989-2001.
78. Schulze, K., C. Gasch, K. Staufer, B. Nashan, A. W. Lohse, K. Pantel, S. Riethdorf and H. Wege (2013). "Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma." Int J Cancer 133(9): 2165-2171.
79. Serke, M. and N. Schonfeld (2007). "[Diagnosis and staging of lung cancer]." Dtsch Med Wochenschr 132(21): 1165-1169.
80. Turnbull, R. B., Jr., K. Kyle, F. R. Watson and J. Spratt (1967). "Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates." Ann Surg 166(3): 420-427.
81. Usiakova, Z., V. Mikulova, D. Pinterova, M. Brychta, J. Valchar, M. Kubecova, P. Tesarova, V. Bobek and K. Kolostova (2014). "Circulating tumor cells in patients with breast cancer: monitoring chemotherapy success." In Vivo 28(4): 605-614.
82. Warren, G. W. and K. M. Cummings (2013). "Tobacco and lung cancer." Am Soc Clin Oncol Educ Book 2013: 359-364.
83. Wicha, M. S. and D. F. Hayes (2011). "Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected." J Clin Oncol 29(12): 1508-1511.
84. Wittekind, C., Meyer, H.-J. (2010). TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage, 129-133, UICC International union against cancer.
85. Yang, L., J. C. Lang, P. Balasubramanian, K. R. Jatana, D. Schuller, A. Agrawal, M. Zborowski and J. J. Chalmers (2009). "Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells." Biotechnol Bioeng 102(2): 521-534.
86. Yokobori, T., H. Iinuma, T. Shimamura, S. Imoto, K. Sugimachi, H. Ishii, M. Iwatsuki, D. Ota, M. Ohkuma, T. Iwaya, N. Nishida, R. Kogo, T. Sudo, F. Tanaka, K. Shibata, H. Toh, T. Sato, G. F. Barnard, T. Fukagawa, S. Yamamoto, H. Nakanishi, S. Sasaki, S. Miyano, T. Watanabe, H. Kuwano, K. Mimori, K. Pantel and M. Mori (2013). "Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis." Cancer Res 73(7): 2059-2069.
87. Young, R., E. Paillet, F. Billiot, F. Drusch, A. Barthelemy, M. Oulhen, B. Besse, J. C. Soria, F. Farace and P. Vielh (2012). "Circulating tumor cells in lung cancer." Acta Cytol 56(6): 655-660.
88. Yu, M., A. Bardia, B. S. Wittner, S. L. Stott, M. E. Smas, D. T. Ting, S. J. Isakoff, J. C. Ciciliano, M. N. Wells, A. M. Shah, K. F. Concannon, M. C. Donaldson, L. V. Sequist, E. Brachtel, D. Sgroi, J. Baselga, S. Ramaswamy, M. Toner, D. A. Haber and S. Maheswaran (2013). "Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition." Science 339(6119): 580-584.

89. Yu, M., S. Stott, M. Toner, S. Maheswaran and D. A. Haber (2011). "Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization." J Cell Biol 192(3): 373-382.
90. Zhang, X., G. Liu, Y. Kang, Z. Dong, Q. Qian and X. Ma (2013). "N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines." PLoS One 8(3): e57692.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ALDH1	<u>A</u> ldehyd- <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase 1
AUC	<u>A</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
CD (15, 19, 44, 45, 133, 144)	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
(c)DNA	(<u>c</u> omplementary) <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
CEA	<u>C</u> arcino <u>e</u> mbrionales <u>A</u> ntigen
CK	<u>C</u> yto <u>k</u> eratin
CSC	<u>C</u> ancer <u>s</u> tem <u>c</u> ell
CT	Computertomographie
CTC	<u>C</u> irculating <u>t</u> umor <u>c</u> ell
Cy3	Cyanin
CYFRA	Cytokeratinfragment
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
EML4-ALK	<u>E</u> chinoderm <u>m</u> icrotubule-associated protein-like 4- <u>A</u> naplastic lymphoma <u>k</u> inase
EpCAM	<u>E</u> pithelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule
FBS	<u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum
FGFR1	<u>F</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor 1
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> so <u>t</u> hiocyanate
g	<u>G</u> ramm
G (1, 2, 3)	Grading (Differenzierungsgrad eines Tumors)
GFP	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GIST	<u>G</u> astrointestinaler <u>S</u> troma <u>t</u> umor

IF	<u>I</u> mmun <u>f</u> ä <u>r</u> bung
min	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
MRT	<u>M</u> agnet- <u>R</u> esonanz- <u>T</u> omographie
MSC	<u>M</u> esenchymal <u>s</u> tem <u>c</u> ell
n	Anzahl
N-Cadherin	<u>N</u> eural <u>c</u> alcium <u>a</u> dhering
NSCLC	<u>N</u> on- <u>s</u> mall- <u>c</u> ell <u>l</u> ung <u>c</u> ancer
p	Signifikanzwert
PBMC	<u>P</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PD	<u>P</u> rogressive <u>d</u> isease
PET	<u>P</u> ositronen- <u>E</u> missions- <u>T</u> omographie
PR	<u>P</u> artial <u>r</u> esponse
qRT-PCR	<u>q</u> uantitative <u>R</u> everse- <u>T</u> ranskriptase <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
r	Korrelationskoeffizient
R0/R1/R2-Resektion	R0: Resektion im Gesunden R1: Resektion mit verbleibendem mikroskopischen Tumorrest R2: Resektion mit verbleibendem makroskopischen Tumorrest
RLT-Puffer	Spezieller Lysepuffer zum Lysieren von Zellen und Gewebe
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid
ROC	<u>R</u> eceiver <u>o</u> perating <u>c</u> haracteristic
SD	<u>S</u> table <u>d</u> isease
TNM	<u>T</u> umor <u>N</u> ode <u>M</u> etastasis

UICC	<u>U</u> nion <u>i</u> nternationale <u>c</u> ontre le <u>c</u> ancer
SSC	<u>S</u> aline <u>s</u> odium <u>c</u> itrate
PFS	<u>P</u> rogression <u>f</u> ree <u>s</u> urvival

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Übersicht der Therapiealgorithmen für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, S.10
- Abb. 2: Leitlinie für die palliative, medikamentöse Erstlinientherapie des NSCLC in fortgeschrittenen Stadien, S.12
- Abb. 3: Schritte der Metastasierungskaskade, S.14
- Abb. 4: Bedeutende Signaltransduktionsmechanismen während der EMT, S.17
- Abb. 5: Übersicht verschiedener Methoden zur CTC-Detektion, S.20
- Abb. 6: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Methode, S.33
- Abb. 7: Kontrolle für Pan-CK (gelb) an HepG2-Zellen gemischt mit humanen Leukozyten, S.44
- Abb. 8: Positiv-Kontrollen für N-Cadherin an mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, S.44
- Abb. 9: Positiv-Kontrolle für den CD133-Antikörper an einem Gemisch von K562-Zellen, S.44
- Abb.10: Kontrolle für EpCAM-positive Zellen an einem HepG2-PBMNC-Gemisch, S.45
- Abb.11: Pan-CK-positive Zellen (gelb) bei einem NSCLC-Patienten, S.45
- Abb.12: EpCAM+/CK-/CD45- Zelle mit DAPI-positivem Kern bei einem NSCLC-Patienten, S.45
- Abb.13: Pan-CK+/EpCAM+/CD45- Zelle einem NSCLC-Patienten, S.46
- Abb.14: N-Cadherin-positive Zelle bei einem NSCLC-Patienten, S.46
- Abb.15: N-Cadherin- und Pan-CK- positive Zelle bei einem NSCLC-Patienten, S.46
- Abb.16: Twist-positive Zelle (grün) bei einem NSCLC-Patienten, S.46
- Abb.17: CD133 (grün)-positive und gleichzeitig CD45 (rot)-negative Zelle bei einem NSCLC-Patienten, S.47
- Abb.18: Kaplan-Meier Test zu N-Cadherin-positiven Zellen in Patientenblut, S.48
- Abb.19: Kaplan-Meier Test zu CD133+/Pan-CK+ Zelltyp-Ratio und Progressionswahrscheinlichkeit, S.49

- Abb.20: Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad des Primärtumors und Anzahl CD133-positiver CTC im Mann-Whitney-Test, S.50
- Abb.21: Kontrolle der FGFR1-Sonde mittels FisH an humanen Leukozyten in der Interphase, S.51
- Abb.22: Kontrolle der FGFR1-Sonde mittels FisH an Metaphase-Chromosomen humaner Leukozyten, S.52
- Abb.23: „FICTION“-Technik an einem Gemisch humaner Leukozyten mit Zellen der Lungenkarzinomzelllinie NCI-1581, S.53
- Abb.24: „FICTION“-Technik an Blut eines NSCLC-Patienten, S.54
- Abb.25: RNA-Verdünnungsreihen zur Plateaubereichskontrolle der Primer, S.56
- Abb.26: Schmelzkurven der qRT-PCR-Produkte für die eingesetzten Primer, S. 56-58
- Abb.27: Kaplan-Meier Test zu *KRT18*-mRNA-Expression und Zeit zur Progression S.60
- Abb.28: ROC-Kurven-Analyse zu *Keratin18*-mRNA-Expression und Therapieansprechen in der EpCAM-depletierten Restzellfraktion vor Therapiebeginn, S.61
- Abb.29: Kaplan-Meier-Test zur *EpCAM*-mRNA-Expression in der EpCAM+-Fraktion, S.62
- Abb.30: Kaplan-Meier Test: Erhöhte *ALDH1*-Expressionen in der EpCAM-positiven Fraktion sind signifikant mit verlängertem PFS im Kaplan-Meier-Test korreliert, S.63
- Abb.31: Mann-Whitney Test zur Korrelation der *ALDH1*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion mit dem PFS, S.64
- Abb.32: Kaplan-Meier Test zur *EpCAM*-mRNA-Expression in der Restzellfraktion, S.65
- Abb.33: ROC-Kurven Analyse zu *Twist*-mRNA-Expression und Therapieansprechen, S.66
- Abb.34: ROC-Kurven Analyse zur *CD133*-mRNA-Expression und dem Therapieansprechen, S.67
- Abb.35: ROC-Kurven-Analyse zur Pan-CK+-Zellzahl kombiniert mit erhöhter *Keratin18* mRNA-Expression als Test zur Evaluation des Therapieansprechens, S.69
- Abb.36: Unterschied in der *KRT18*-Expression zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen, S.71
- Abb.37: Unterschied in der *ALDH1*-Expression zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen, S.72

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, S.9

Tab. 2: Übersichtstabelle zum untersuchten Patientenkollektiv, S.40

Tab. 3: Übersichtstabelle zur Quantität der mittels Multi-IF-Färbung detektierten Zellen, S.43

Tab. 4: Korrelationen von uns verwendeter Marker mit den klinisch zur Verlaufskontrolle eingesetzten Serummarkern CYFRA 21-1 und CEA, S.70

8.4 Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater **Priv.-Doz. Dr. med. Andreas-Claudius Hoffmann** für die Ermöglichung dieses äußerst spannenden Projektes, seine stete Ansprechbarkeit bei Problemen und die engagierte, kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Ich danke **Univ. Prof. Dr. med. Martin Schuler**, dem Direktor der Inneren Klinik (Tumorforschung),

Dr. med. Thomas Gauler für die Unterstützung bei der Recherche von klinischen Verlaufsparemtern,

Prof. Dr. med. Sebastian Bauer und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für ihre große Hilfsbereitschaft und das Zurverfügungstellen von GIST-Zellen,

Prof. Dr. med. Karl-Sebastian Lang für die Ermöglichung der Nutzung des Fluoreszenzmikroskopes,

Dr. med. Alma Küchler für ihre Unterstützung bei der Etablierung der FisH-Technik,

Priv. Doz. Dr. rer. nat. Bernd Giebel für das Zurverfügungstellen von Zelllinien sowie

Prof. Dr. rer. nat. Sabine Kasimir-Bauer für ihre konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Dr. rer. medic. Ivonne Nel**, die diese Arbeit während der gesamten Entstehung mit großer Hilfsbereitschaft und kompetenten Ratschlägen begleitet hat.

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.