

Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Patrick Michl

**In-vivo Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) bei
Lungenkrebspatienten mittels des antikörperbeschichteten Drahtes
„CANCER01“**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Clemens Oerding
Geboren am 16.01.1987 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. Bernd Schmidt

Gutachterin/Gutachter:

Prof. Dr. B. Schmidt

Prof. Dr. D. Vordermark

PD Dr. Ch. Schäper

26.06.2018

02.05.2019

Meinen Eltern

und allen weiteren, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Referat

Die hohe Letalität des Lungenkarzinoms ist maßgeblich auf die ausgeprägte Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung zurückzuführen. Darüber hinaus sind Screening-Methoden, mit denen Lungenkarzinome und Metastasen in frühen Stadien verlässlich detektiert werden können, noch immer nicht ausgereift. Es wird davon ausgegangen, dass Metastasen durch zirkulierende Tumorzellen (CTC) verursacht werden, die sich über die Blutzirkulation in anderen Organen als disseminierte Tumorzellen festsetzen (Pantel und Brakenhoff 2004, S. 448) und sich dort weiter ausbreiten. Schon aus diesem Grund sind der zunehmende Forschungsbedarf und das wachsende Interesse an CTCs zu erklären. Der seit langem offensichtliche Gedanke ist, dass man durch die Untersuchung dieser Zellen eine verlässliche Aussage über den primären Tumor und die Tendenz zur Metastasierung gewinnen könnte. Das ist deshalb so wichtig, weil von vielen Malignomen mit den gängigen Untersuchungsmethoden keine minimalinvasive Probe erhoben werden kann: Die histologische Absicherung eines Befundes erfordert meist die operative Probenentnahme. Zudem lässt sich dies im Regelfall nicht mehrfach im Verlauf der Erkrankung durchführen, um z.Bsp. einen malignitätsverdächtigen Befund zu kontrollieren. Stattdessen könnte eine effektive Technik der CTC-Isolierung dem Patienten belastende Prozeduren ersparen, sollte es gelingen, diese nur „ertragreich“ genug zu machen. Dieses Ideal der CTC - Forschung, nämlich durch die Isolation im Blut zirkulierender Tumorzellen, Informationen auf den Primärtumor zu extrapolieren, wird als „liquid biopsy“ bezeichnet und ist in vielen Publikationen vorzufinden. Somit ist das Ziel und die Vorstellung eine hohe Aussagekraft über die Erkrankung aus dem unschwer erhältlichen Blut zu gewinnen.

Können also zirkulierende Tumorzellen bei Lungenkrebspatienten in-vivo nachgewiesen werden, indem man bei ihnen einen Metalldraht einsetzt, der mit einem bestimmten Oberflächenprotein beschichtet ist, dass zirkulierende Tumorzellen mit epitheliale Charakter daran haften? Diese Frage soll mit dem funktionalisierten strukturierten medizinischen Draht (CANCER01) beantwortet werden, indem dieser mehrfach begleitend zur Chemotherapie angewendet wird. Ist eine zeitliche Entwicklung der Werte erkennbar, können mit den ermittelten Werten Zusammenhänge zu Parametern wie dem histologischem Typ, der Tumorgöße und dem Grad der Metastasierung hergestellt werden, sind weitere Fragen, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt.

Oerding, Clemens: In-vivo-Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) bei Lungenkrebspatienten mittels des antikörperbeschichteten Drahtes „CANCER01“, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 55 Seiten, 2017

Gliederung

	Seite
1	Einleitung 1
1.1	Lungenkarzinom..... 1
1.1.1	Epidemiologie..... 1
1.1.2	Ätiologie..... 1
1.1.3	Klassifikation..... 3
1.1.4	Klinik und Diagnose..... 3
1.1.5	Therapie..... 7
1.1.6	Prognose..... 8
1.2	Zirkulierende Tumorzellen (CTC)..... 9
1.2.1	Definition CTC..... 9
1.2.2	Geschichtliches..... 9
1.2.3	Methoden der CTC-Isolierung..... 10
1.2.3.1	Mechanische Methoden..... 10
1.2.3.2	Elektrische Methoden..... 11
1.2.3.3	Immunzytochemische Methoden..... 11
2	Fragestellungen 14
3	Material und Methodik 15
3.1	Patientenkollektiv..... 15
3.2	Durchführung der Visits..... 17
3.3	Aufbau des Drahtes..... 18
3.4	Anwendung..... 18
3.5	Färbung der Drähte..... 20
3.6	Statistische Auswertung..... 21
4	Ergebnisse 22
4.1	Allgemeines..... 22
4.2	CTC-Cluster..... 23
4.3	Plattenepithelkarzinom..... 25
4.4	Repräsentative Verläufe..... 30
5	Diskussion 35
6	Zusammenfassung 42
Literatur 43
Thesen 49
Erklärungen 51

Abkürzungsverzeichnis:

cfDNA/NA	Zirkulierende freie DNA/Nukleinsäuren
CR	Komplette Remission
CTC	Zirkulierende Tumorzelle(n)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsions-Molekül
LA-NSCLC	Lokal fortgeschrittenes (locally advanced) Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
MET	Mesenchymal-epithelialen-Transition
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PD	Progressive Disease (Fortschreiten der Erkrankung)
PR	Partielle Remission
SD	Stable Disease
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SCC	Plattenepithelkarzinom
UICC	Union internationale contre le cancer / dt.: Internationale Vereinigung gegen Krebs

1 Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom gehört weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Mit einer Inzidenz von ca. 88,5/100.000 männlichen und 39,6/100.000 weiblichen Neuerkrankten pro Jahr steht es bei Männern an zweiter und bei Frauen an dritter Stelle der häufigsten Krebsneuerkrankungen. Lungenkrebs ist die häufigste Krebstodesursache bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen (Katalinic 2012), wobei in den letzten drei Jahrzehnten eine deutliche Verschiebung der globalen Inzidenz von Industrienationen zu Entwicklungsländern zu verzeichnen war. Eine deutlichere Zunahme der Inzidenz bei Frauen seit den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wird häufig mit dem späteren Einsetzen des gewohnheitsmäßigen Nikotinkonsums erklärt (Dela Cruz et al. 2011). Der globale Häufigkeitsgipfel des Bronchialkarzinoms liegt heute bei dem 55.-60. Lebensjahr, nur 5% der Patienten sind unter 40 Jahre alt (Herold 2015).

1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung des Lungenkarzinoms wird zum größten Teil auf die Exposition von chemischen Karzinogenen allen voran Nikotinkonsum zurückgeführt (Dela Cruz et al. 2011). Dieser Zusammenhang wurde erstmals 1964 in einem Bericht der US Public Health Service veröffentlicht worden (Dela Cruz et al. 2011). Dort wurde bereits kalkuliert, dass das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken abhängig von der Menge des Zigarettenkonsums bis zu 20-fach im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht sein kann. Interessanterweise wurde in einer 1912 veröffentlichten Studie, eine der ersten zur Diskussion der Obduktionsbefunde von Lungenkrebs-Patienten, „primäre maligne Neoplasien der Lunge“ als „eine der seltensten Arten“ (Dela Cruz et al. 2011) dieser Krankheit beschrieben. Bronchialkarzinome machten zu dieser Zeit nur ca. 0,5 % aller Krebs-Neuerkrankungen aus (Dela Cruz et al. 2011). Illustrierend ist dabei der Fakt, dass im Jahr 1900 der durchschnittliche jährliche Zigarettenkonsum eines erwachsenen Amerikaners nur 100 Zigaretten und zur Mitte der 1960er Jahre 4400 Zigaretten betrug. (Dela Cruz et al. 2011). So fanden sich seitdem in zahlreichen Veröffentlichungen Bestätigungen dieser nunmehr seit Jahrzehnten unumstrittenen These, dass Zigarettenrauch die Hauptursache für Lungenkarzinom-Erkrankungen darstellt (Dela Cruz et al. 2011). Bei Doll & Peto wird bereits 1981 auf dessen wachsende epidemiologische Bedeutung und auf den eindeutigen ätiologischen Zusammenhang zu Lungenkrebs aufmerksam gemacht.

Die karzinogene Wirkung des Zigarettenrauchs ist maßgeblich auf „Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), aromatische Amine, N-Nitrosamine und andere organische und anorganische Bestandteile wie Benzen, Vinylchlorid, Arsen und Chrom“ (Dela Cruz et al. 2011) zurückzuführen. Sogar radioaktive Elemente sind hier zu nennen.

Insbesondere eine Form der Nitrosamine, das 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanon (NNK) stehe im Verdacht Adenokarzinome auszulösen und bewirkt über eine DNA-Mutation eine Aktivierung des k-ras-

Onkogens. Dies wurde bei 24% der Adenokarzinomen der Lunge nachgewiesen. (Rodenhuis und Slebos 1992)

Obwohl zahlreiche Hinweise darauf existieren, dass andere Formen des Tabakkonsums z.Bsp, Zigarren und andere Formen der Verbrennung und Inhalation von Substanzen z.Bsp. Marijuana einen ähnlich schädlichen Effekt hinsichtlich der Karzinogenese haben, ist die Studienlage deutlich weniger umfangreich und folglich nicht gut belegt (Dela Cruz et al. 2011).

Nichtraucher

Ein mit ca. 25% nicht unerheblicher Teil der Lungenkrebs-Erkrankungen betreffen lebenslange Nichtraucher (oder solche, die lebenslang weniger als 100 Zigaretten geraucht haben) (Parkin et al. 2005). Diese Zahl spiegelt vermutlich die Tatsache wider, dass in weiten Teilen der Erde Tabakkonsum, insbesondere bei Frauen, eher eine Rarität ist und gleichzeitig von Tabakrauch unabhängige Risikofaktoren zur Entstehung von Lungenkrebs existieren.

Insgesamt trat in den letzten Jahrzehnten mit deutlichen geographischen Unterschieden ein Häufigkeitsanstieg der Nichtraucher-assoziierten Lungenkrebsfälle ein. Es ließen sich außerdem dabei zwei Tendenzen vermuten: (1) Eine höhere Häufigkeit bei Frauen und (2) eine höhere Prävalenz in verschiedenen Regionen z.Bsp. In Asien (Dela Cruz et al. 2011).

Hinweise auf nicht-Tabakrauch-assoziierte Gründe für Lungenkrebs gibt es für die Exposition mit Asbest, Arsen, Beryllium, Cadmium, Chrom, Nickel, Siliziumverbindungen und Dieselkraftstoff-Dämpfe (Driscoll et al. 2005). Darunter zeigt sich Asbest als seit langem bekannte (erstmalige Erwähnung als pathogenetischer Stoff 1940) und in den Krankheitsentstehungsprozess auch von pleuralen Manifestationen involvierte Noxe. Ebenfalls seit langem bekannt ist die krebserregende Wirkung von Radon. In einer amerikanischen Studie wird der Anteil von Radon-assoziierten Lungenkrebs-Todesfällen bei insgesamt 10 % beschrieben. (Lubin et.al 1995). Weiterhin existieren Daten über ein inverses Verhältnis zwischen der Belüftungssituation in chinesischen Küchen und der Lungenkrebs-Inzidenz bei weiblichen Nichtrauchern (Jin et.al. 2014, Mu et.al. 2013). Dieser Zusammenhang wird sowohl auf die Exposition mit hocherhitzten Öldämpfen, Kohlen, und festen Brennstoffen als auch auf passiven Zigarettenrauch auf Grund schlecht belüfteter Räume zurückgeführt. Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Intensität und Dauer der Exposition und dem Lungenkrebsrisiko.

Andere zumeist erregerbedingte vorangegangene Lungenerkrankungen lassen zumindest einen direkten oder indirekten Einfluss über die Auslösung einer Lungenfibrose (wie im Falle des Torque Teno Virus) auf die Lungenkrebsentstehung vermuten. Hierbei sind HPV, BK-, JC-Viren, Zytomegalieviren, Simian-Virus-40, und Masernviren zu nennen. (Dela Cruz et al. 2011)

Darüber hinaus wurden Lösungsmittel, Verdünner, Farben, Schweißgeräte, Ruß und Abgase als Auslöser von Lungenkrebs festgestellt (Brenner et al. 2010). Zu den genetischen Determinanten, für die zum Teil Medikamente mit spezialisierten Wirkmechanismen existieren, werden unter anderem Mutationen im EGFR-

Gen (Dela Cruz et al. 2011), KRAS-Gen (Kim et al. 2017), P53-Gen (Vaughan et al. 2017), EML4-ALK-Fusionsgen (Soda et al. 2007), Her2-Gen (Mazières et al. 2013), PIC3CA-Gen (Scheffler et al. 2014), BRAF-Gen (Nguyen-Ngoc et al. 2015), hMSH und verschiedenen P450- und Glutathion-S-Transferase-Enzymen (Dela Cruz et al. 2011) gezählt.

1.1.3 Klassifikation

Man unterteilt das Lungenkarzinom in kleinzellige (SCLC) und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC). Der Anteil von kleinzelligen Lungenkarzinomen liegt bei ca. 13%, wohingegen man das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom in das Plattenepithelkarzinom (29%), das Adenomkarzinom (27%), das großzellige Lungenkarzinom (6%), und das Karzinoid (1%) unterteilt (Wilkerson et al. 2013, S. 485). Die histologischen Typen weisen ein Geschlechterverhältnis von $m : w = 3 : 1$ mit Ausnahme des Adenokarzinoms auf, bei dem ein Verhältnis von $m : w = 1 : 6$ besteht. Alle Sybtypen unterscheiden sich maßgeblich in Therapie, Prognose und Verlauf. Den Ursprung von epithelalem Lungengewebe haben aber all diese histologischen Formen gemeinsam.

1.1.4 Klinik und Diagnose

Sowohl in Früh- als auch Spätstadien ist das Lungenkarzinom häufig asymptomatisch. Das klinische Bild und die zur Verdachtsdiagnose führenden Symptome sind vielfältig und werden von lokal-verdrängenden sowie sekundären endokrinologischen Symptomen (letzteres eher im Falle von kleinzelligen Lungenkarzinome) bestimmt. Eine Übersicht liefert die folgende Tabelle (bezüglich nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen NSCLC): (Aebi 2016):

Tabelle 1.1: Lungenkrebs-Symptome

Ursache	Symptom
Lokal tumorbedingt	<ul style="list-style-type: none"> - Husten - Dyspnoe - Thoraxschmerzen - Hämoptysen - Blutig tingiertes Sputum beim Husten - Obere Einflusstauung (oberes Vena-cava-superior-Syndrom) - Dysphagie - Stridor - Heiserkeit (Stimmbandparese bei Infiltration des N. recurrens) - Armschwäche (Infiltration des Plexus brachialis) - Horner-Syndrom (Infiltration des Ganglion stellatum)
Metastasenbedingt	<ul style="list-style-type: none"> - Knochenschmerzen - Schwindel/Kopfschmerzen/fokale neurologische Defizite, Delir Krampfanfälle - Lymphknotenschwellung (supraklavikulär) - Ikterus
Allgemein	<ul style="list-style-type: none"> - Gewichtsverlust - Fieber - Nachtschweiß - Schwäche - Paraneoplastische Syndrome <ul style="list-style-type: none"> - autoimmun (Kollagenosen) - endokrin - hämatologisch einschl. Gerinnung - kutan, z.Bsp. Dermatomyositis - metabolisch z.Bsp. SIADH (Schwartz-Bartter-Syndrom) mit Hyponatriämie - neurologisch, z.Bsp. Lambert-Eaton-Syndrom, Anti-Hu-Syndrom - ossär, z.Bsp. hypertrophe Osteoarthropathie (Pierre-Marie Bamberger-Syndrom) - renal

Quelle: onkopedia.com

Im Falle der oben genannten Symptome erfolgt im Regelfall eine zielgerichtete Diagnostik. Ein Teil der Diagnosen sind Zufallsbefunde gänzlich ohne wegweisende klinische Symptome.

Die primäre Diagnostik umfasst eine umfassende Laboranalyse mit Bestimmung von Gerinnungsparametern, Blutbild, Elektrolyten, Nierenparametern, Leberparametern und LDH. Weiterhin ein CT des Thorax mit Kontrastmittel, ggf. ein MRT, eine Bronchoskopie mit Biopsie oder eine transthorakale Biopsie (Aebi 2016). Nachdem ein Primärtumor zytologisch und/oder histologisch nachgewiesen wurde, erfolgt die Feststellung der Tumorausbreitung und Suche nach eventuellen Metastasen. Eine Übersicht zum üblichen Vorgehen liefert die untenstehende Tabelle (bezüglich nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome NSCLC) (Aebi 2016).

Nach Komplettierung der Diagnostik und des Stagings erfolgt eine Einteilung nach TNM-Klassifikation, zu der korrespondierend ein Stadium nach UICC bestimmt wird; auf beide soll hier nicht im Detail eingegangen werden. Die Stadien sind entscheidend für die Wahl der Therapie und die Prognose.

Tabelle 1.2.: Lungenkrebs-Diagnostik

Untersuchung	Anmerkung
Pleurapunktion	Bei Pleuraerguss, ggf. Pleurabiopsie und Thorakoskopie
Sonographie Oberbauch	
PET-CT	Bei kurativem Therapiekonzept
EUS/EBUS mit Biopsie	Bei V.a. mediastinalem Lymphknotenbefall
MRT Schädel	Suche nach zerebralen Metastasen
CT-Schädel	Alternative zu MRT
Knochenszintigraphie	Alternative zu PET-CT
CT Abdomen	Alternative zu PET-CT
Mediastinoskopie	Alternative zu EBUS/EUS
MRT Ganzkörper	Falls PET-CT nicht möglich, nur bei kurativem Ansatz

Quelle onkopedia.com

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Bronchialkarzinoms ist komplex. Viele Faktoren, darunter histologischer Typ, Stadium, Begleiterkrankungen, Befallsmuster etc., bestimmen die Wahl der Therapie. Dabei ist insbesondere das Stadium nach UICC ausschlaggebend, das sich nach der Tumorgröße, der Invasivität und der Art der befallenen Strukturen, den begleitenden Komplikationen, der Lokalisation und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und der Existenz von Fernmetastasen richtet.

Im Dienste der Übersichtlichkeit, und um den Rahmen einer Synopsis nicht zu überschreiten, konzentriert sich der folgende Absatz auf die Therapie des Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC).

Die Therapie der Wahl in den frühen Stadien (Stadium I-IIIa) ist die chirurgische Entfernung (Vansteenkiste et al. 2013). Grundsätzlich wird die Entfernung eines kompletten Lungenlappens dem Entfernen eines Segments vorgezogen. In Abhängigkeit vom Tumorstadium sollte eine adjuvante Chemotherapie erfolgen (es wird eine Kombination aus einem Chemotherapeutikum mit Cisplatin empfohlen. Nach aktuellem Kenntnisstand sollten in diesem Stadium molekulare Analysen keinen Einfluss auf die Wahl des Chemotherapeutikums haben und es sind bei kurativem Therapieansatz auch keine Targeted-Therapien wie z.Bsp. Erlotinib oder Crizotinib empfehlenswert). Eine adjuvante bietet gegenüber einer neoadjuvanten Chemotherapie einen overall-survival-Vorteil. Ein alternativer radikaler Therapieansatz in frühen Stadien ist die Stereotaktische Ablative Radiotherapie (SABR). Diese ist bei Patienten mit COPD und höherem Alter mit einem niedrigen toxischen Effekt assoziiert. Radiotherapie in intensivierter Form wird bei Tumorgrößen > 5 cm empfohlen in Blöcken mit bis zu täglicher Anwendung. Eine postoperative Radiotherapie brächte bei komplett-tumorresizierten Patienten keine, bei imkomplett-resizierten jedoch einen Vorteil.

Bei lokal ausgedehnten Lungenkarzinomen (LA-NSCLC) ist grundsätzlich eine Chemotherapie angezeigt, sollte der Patient dies tolerieren. Am häufigsten untersucht sind Kombinationen aus einem Platin-basierten Chemotherapeutikum und einer Bestrahlung. Weitere Ansätze sind Platin-basierte Zwei-Chemotherapeutika-Regime oder die Gabe von einem Platinbasierten Chemotherapeutikum mit anschließender Radiotherapie.

Bei nichtresektablen lokal fortgeschrittenen NSCLC ist sowohl die definitive (der Tumor wird ausschließlich durch Radiochemotherapie behandelt, eine Operation erfolgt nicht) als auch neoadjuvante Radiochemotherapie in Verbindung mit einer Operation möglich. (Vansteenkiste et al. 2013)

Im Stadium IV wird grundsätzlich ein palliatives Prozedere festgelegt, sollte es sich nicht lediglich um eine solitäre Nebennieren-, ZNS- oder pulmonale Metastase handeln. In diesem Falle kommt ein kurativer Ansatz mit möglicher Operation in Frage (Aebi et al. 2016) (Stadium IV betrifft 35-40 % der erstdiagnostizierten Patienten [Aebi et al. 2016], ca. 70 % weisen ein systemisch oder lokal ausgebreitetes Krankheitsbild bei Erstdiagnose auf [Molina et al. 2008]). Grundsätzlich stehen verschiedene Chemotherapeutika und im Falle von EGFR- und Exon 19 und 21-Mutationen sowie ALK- und ROS1-Translokationen gezielte „Target“-Therapien zur Verfügung. (Aebi et al. 2016) Hierfür existieren bereits umfangreiche Schemata als Leitlinien zur First-line-therapy und Empfehlungen zur Second-line-therapy (Chan, Hughes 2015).

1.1.6 Prognose

Die Prognose des Lungenkarzinoms variiert stark und wird von dem Tumorstadium bestimmt. Insgesamt betragen die durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensraten bei Männern 16 % und bei Frauen 21 %. Darüber hinaus spielen für die Prognose das Alter, das Geschlecht, der Allgemeinzustand (z.Bsp durch den Karnofsky-Index ausgedrückt) und die Ausprägung des Gewichtsverlusts und der systemischen Entzündungsreaktion des Körpers eine Rolle (Simmons et al. 2015).

Die mittlere Überlebenszeit von Stadium-IV-Patienten wurde in einer europäisch-multizentrischen Studie mit 7,8 Monaten beziffert (Simmons et al. 2015).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

1.2.1 Definition CTC

CTCs sind Zellen, die sich aus dem Verband eines Primärtumors lösen, in das Gefäßsystem wandern und im Blut (oder möglicherweise Lymphsystem) zirkulieren (s. Abbildung 1). Für ihre Entstehung sind Schritte der metastatischen Kaskade notwendig: ausreichende Proliferation und Angiogenese des Primärtumors, direkter Kontakt zum Endothel der Kapillaren und Zirkulation bzw. Embolisierung (Fidler 2002). CTCs stellen eine sehr kleine Zellpopulation dar. Nur ca. $1/10^5$ - $1/10^6$ mononukleärer Zellen des Blutes von Krebspatienten sind CTCs (Ross et al. 1993). Bei den gängigen ex-vivo Detektionsmethoden werden im Durchschnitt in 7,5 ml Blut nur 1-10 CTCs gefunden (Xu et al. 2015, S. 10356; Allard et al. 2004, S.5; Riethdorf et al. 2007, S. 922).

1.2.2 Geschichtliches

Zirkulierende Tumorzellen sind seit geraumer Zeit Gegenstand medizinischer Forschung. Bereits im Jahr 1869 fand das Phänomen Erwähnung. Thomas Ashworth untersuchte Blutproben eines ausgedehnt metastasierten Tumorpatienten unter dem Mikroskop mit einer Magentafärbung und sah darin dem Primärtumor ähnelnde Zellen. (Ashworth 1869). 1889 äußerte der englische Chirurg Stephen Paget die Hypothese, dass zur Entstehung von Metastasen das Zusammenspiel zwischen einem Primärtumor („seed“ = Saat, Samen) und einem Zielorgan („soil“ = Erde, Boden) notwendig wäre. (Fidler 2002)(seed and soil-Hypothese). Auch heute noch findet sich die Kernaussage dieser Publikation in den Erklärungsansätzen der Metastasen- und CTC-Forschung wieder.

Die Einführung der Papanicolaou-Färbung im Jahre 1950 brachte größere Sicherheit in der Diagnostik von CTCs. Pathologen konnten nach Zentrifugation und Entfernung von Erythrozyten die übrigen Zellen auf Papanicolaous Malignitätskriterien untersuchen: Lobulierung und Vergrößerung der Zellkerne, granuliertes und fragmentiertes Chromatin (Jin et al. 2014, S. 34). Im Jahre 1959 zeigten die Untersuchungen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation von

S.H. Seal, dass CTCs ein höheres spezifisches Gewicht haben als Leukozyten. Dennoch räumte er ein, dass die Schwankungsbreite dieser Werte höher sein könnte als zunächst angenommen (Jin et al. 2014, S. 34). Zur Positiv-Selektion diene weiterhin die Färbung und Untersuchung durch einen geübten Pathologen. Weitere wichtige Studien besagen, dass CTCs im Gegensatz zu Leukozyten als Cluster organisiert vorkommen

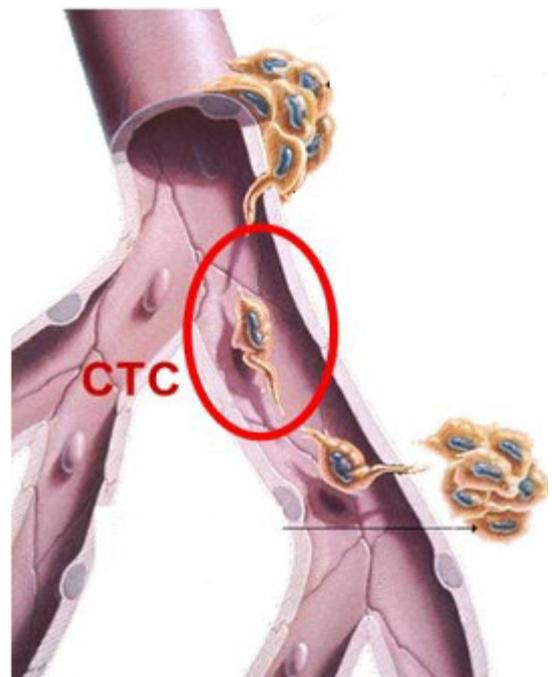


Abbildung 1: Illustration CTC, Quelle: Parkinson et al, J Transl Med 2012

können und sich von jenen in Größe, Dichte und innerer Struktur unterscheiden (Jin et al. 2014, S. 34f.) (Allen et al. 1974).

Die These von Talmadge und Wolman 1982, dass eine Metastase nur aus einer einzigen Zelle hervorgeht (Talmadge et al. 1982), unterstützt die Theorie, es handle sich um zirkulierende Zellen, die Metastasen verursachen.

Trotz der langjährigen wissenschaftlichen Bedeutung hat dennoch erst die große Bandbreite an Isolier- und Charakterisierungsmethoden der letzten Jahre dazu geführt, dass die Untersuchung/Charakterisierung von CTCs zu einem vielversprechenden Aspekt der Krebsforschung wurden.

1.2.3 Methoden der CTC-Isolierung

Die bisher etablierten Methoden der CTC-Isolierung machen sich verschiedene Eigenschaften der zirkulierenden Tumorzellen zunutze. Die hauptsächlich angewandten Methoden lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Dabei soll hier auf das Hauptprinzip des Verfahrens eingegangen werden. Häufig werden nämlich verschiedene Methoden miteinander kombiniert um Vorteile der einzelnen Techniken auszunutzen. So kann man zum Beispiel mit einer Zentrifugationstechnik sehr effizient nicht benötigte Zellen auf ein Minimum reduzieren, erreicht aber eine geringe Reinheit der Zielzellen. Dafür ließe sich z.Bsp. Ein Antikörper-gekoppeltes positiv-selektierendes Verfahren einsetzen.

Die drei Hauptgruppen sind: Mechanische Methoden, Elektrische Methoden und Immunologisch-biochemische Methoden.

1.2.3.1 Mechanische Methoden

Dazu gehören Sortierungen nach der Größe der Zellen mittels eines Siebes oder dem Dichtegradienten mittels Zentrifugationsverfahren.

Siebe kommen in verschiedenen Formen wie Poren, Pfeilern oder Verengungen im Lauf eines mikroskopischen Tubus vor (Jin et al. 2014, S. 36). Dazu zählen Technologien wie ISET (RareCells, Paris, Frankreich) (Vona et al. 2000). ISET und RareCells nutzen vergleichbare Ansätze, werden aber von unterschiedlichen Firmen vertrieben und sind daher nicht identisch,

Zentrifugationsverfahren sind z. Bsp. FICOLL (Noblet und Cutts 1967) und Oncoquick (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland Rosenberg et al. 2002, S. 2). Beim Letzten handelt es sich um Röhren, die durch einen Filter in zwei Kammern unterteilt werden. Nach der Zugabe von Blut und einer Trägerflüssigkeit werden mittels Zentrifugation die Bestandteile nach Dichtegradient getrennt und anschließend entfernt. Dieses Verfahren wird heute üblicherweise als Vorbereitung für eine weitere Methode genutzt. Der unspezifische Verlust von Zellen ist kein ausschließliches aber vermehrt beobachtetes Problem dieser Methode (Millner et al. 2013). Die Anwendung nach solchen mechanischen Prinzipien ist auch deshalb problematisch, weil sie häufig mit Hilfe von Tumorzelllinien entwickelt werden (Jin et al. 2014, S. 35). Diese sind im Gegensatz zu realen CTCs größer und homogener. Außerdem haben mehrere Studien die Vermutung aufkommen lassen, dass kultivierte Krebszellen weniger verformbar als Leukozyten und reale CTCs, folglich

besser zu isolieren sind (Jin et al. 2014, S. 35).

Weiterhin gibt es die Methode der Hydrodynamic Chromatography, die sich im wesentlichen unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten der zu untersuchenden Partikel zu Nutze macht. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit größere Probenmengen in kürzerer Zeit zu untersuchen (Jin et al. 2014, S. 37).

1.2.3.2 Elektrische Methoden

Dielektrophorese (DEP) ist ein Verfahren, das sich unterschiedliche Zellgrößen, Kern- und Zellmorphologien zu Nutze macht (Jin et al. 2014, S. 38). Auf Grund dieser Eigenschaften ist auch die Tendenz zur Polarisierung in einem elektrischen Feld unterschiedlich. Je stärker diese ausgeprägt ist desto größer ist auch die Tendenz in einer Versuchsanordnung durch das Medium zu einem der Pole zu wandern. Mit dieser Methode können Zellen verschiedenen Phänotyps und physiologischer Stadien voneinander getrennt werden (Jin et al. 2014, S. 38). Allerdings hat das Verfahren in der Praxis der CTC-Forschung gegenüber Filtermethoden und Hydrodynamic Chromatography eine untergeordnete Bedeutung, da es an Selektivität gegenüber Leukozyten und Verarbeitungsgeschwindigkeit schlechtere Ergebnisse aufweist (Jin et al. 2014, S. 38).

1.2.3.3. Immunzytochemische Methoden

Es werden hier immunochemische Oberflächeneigenschaften der Zellen zur Differenzierung genutzt (Millner et al. 2013). Damit ist eine Antikörperbindung an Oberflächenproteine der zu detektierenden Zellen gemeint. Es existieren hierfür verschiedene Systeme, die negativ- oder positiv-selektierend konstruiert werden können, also entweder Antikörper einsetzen um überschüssige Zellen zu entfernen oder die angestrebten Zellen direkt zu isolieren. Die ersten Schritte sind die Entfernung der Erythrozyten oder Zelldetritus mittels Lyse oder einer mechanischen Methode (z.Bsp. Zentrifugation) und die Behandlung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern bzw. Farbstoffen: Kern-DNA (DAPI) als Beweis für die Existenz einer nukleären Zelle, EpCAM als häufigsten epithelialen Marker, diverse Zytokeratine ebenfalls als Hinweis für epithelialen Ursprung und CD45+ als Pan-Lymphozytenmarker zur Negativkontrolle. So basieren diese Methoden zunächst auf der Annahme, dass es sich bei Zellen mit epithelialelem Charakter, die im Blut anzutreffen sind, um CTCs des diagnostizierten Karzinoms handelt.

Zu den beschriebenen Methoden zählt das FDA-zugelassene CellSearchTM der Firma Veridex, das eine immunologische mit einer magnetischen Technik verbindet (Allard et al. 2004). Dabei werden antikörperbeschichtete Magnetkügelchen in eine Blutprobe gegeben, die sich über die EpCam- Antikörper an die Zellen binden und nach Inkubation magnetisch vom Überstand getrennt werden. Auf diese Weise findet eine Positiv-Selektion von CTCs statt. Eine immunologisch-magnetisch vermittelte Negativ-Selektion findet sich bei dem Quadrupole magnetic sorter (Tong et al. 2007, S. 310). Das System dient einer Vorbereitung der Probe für die Weiterverarbeitung mittels RT-PCR (wobei diese hier als wichtige eigenständige Nachweismethode von CTC-RNA und DNA Erwähnung finden sollte. Allerdings sind dafür wie bereits angedeutet Schritte der Aufreinigung und Konzentrierung nötig, von denen in diesem Kapitel die Rede ist).

Dabei werden nach Lyse und Entfernung von Erythrozyten an CD45-AK gekoppelte Nanopartikel in eine Probe gegeben und danach im magnetischen Feld getrennt. Ähnlich immunologisch-magnetisch funktionieren Systeme wie MagSweeper (Talasaz et al. 2009, S. 1), bei dem ein magnetischer Arm, durch die Probenflüssigkeit fährt und darin befindliche Magnetpartikel anzieht. Jene sind je nach Methodik mit einem Antikörper verbunden. Bei dieser Methode und bei CellSearch handelt es sich wie auch in der vorliegenden Arbeit um Anti-EpCAM-Antikörper, die mit dem ausschließlich epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM eine Bindung eingehen und somit durch ihren epithelialen Charakter mit CTCs Bindungen eingehen sollen. Das Prinzip wurde bereits an mehreren Tumorentitäten getestet: Mammakarzinom (Cristofanilli et al.), Prostatakarzinom, Kolorektales Karzinom und Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC) (Millner et al. 2013; Xu et al. 2015, S. 10352; Qian et al. 2015, S. 1).

Selbstverständlich wird auch versucht CTCs ohne eine der beschriebenen Technologien zu detektieren. Allerdings erfordert die konventionelle Auswertung und Betrachtung einer Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop nach wie vor einen Zwischenschritt zur Konzentrierung, da sonst ein verlässliches Auffinden von CTCs nicht möglich wäre. Dafür dienen häufig mechanische Techniken wie Filter oder Zentrifugen (wie oben beschrieben). Um diesen Schritt und den Nachteil des unspezifischen Zellverlusts zu vermeiden wurde der Scanner FAST (fiber-optic array scanning technology) entwickelt. Dieses System sieht die schnelle automatische Detektion von fluoreszenzmarkierten CTCs vor. Es wurde bereits eine Studie mit Mammakarzinom-Patienten durchgeführt (Hsieh et al. 2006, S. 1894). FACS (Swennenhuis et al. 2013, S. 0) (Durchflusszytometrie) ist in der CTC-Forschung ein Selektionssystem, das eingesetzt wird um eine besonders hohe Reinheit einer bestimmten Zellpopulation zu erreichen (Millner et al. 2013). FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) dient der Detektion von Chromosomenanomalien und basiert ebenfalls auf der Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Das „Ikonoscope“ (Ntouroupi et al. 2008, S. 791) ist ein Scanner, der Fluoreszenzmikroskopie mit der FISH-Methode kombiniert um so bei EpCAM- und Zytokeratin-positiven Zellen gleichzeitig eine Chromosomenaberration als Malignitätszeichen festzustellen. Die FISH-Verfahren nutzen aber eigens dafür entwickelte Geräte für schnellere Scan-Geschwindigkeit und somit höheren Durchsatz.

Wie schon erwähnt ist die positiv-Selektion zirkulierender Tumorzellen mittels Antikörperbindung gegen EpCAM ein in mehreren Konstruktionen verwendetes Prinzip. In der vorliegenden Studie wurde ein medizinisches Gerät verwendet, das erstmals CTCs in-vivo zu detektieren vermag.

Der Draht CANCER01 hat bereits im Vorfeld in einzelnen Studien Anwendung gefunden. Dabei ist die Machbarkeit der Detektion von zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen worden. Zuerst zu erwähnen sei hier eine deutsch-polnische Studie, die Patienten mit Lungen- und Mammakarzinomen einschloss (Saucedo-Zeni et al. 2012). Allerdings wurde hier keine Kinetik untersucht, also die Anwendungen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht beim selben Patienten in einem bestimmten zeitlichen Rahmen wiederholt. Diese Studie stellte die erste In-Vivo-Anwendung des Drahtes dar.

Eine jüngst von einer Arbeitsgruppe der Universität Halle veröffentlichte Studie zeigte die erfolgreiche Isolation bei Prostatakarzinom-Patienten in-vivo und ex-vivo (Theil et al. 2016). Ein weiterer Einsatz des

Drahtes zeigte die Isolierbarkeit bei prä- bzw. postoperativen Lungenkrebspatienten (Chudak et al. 2016, S. S104ff.).

Bei Gorges (Gorges et al. 2016) wurde der funktionalisierte Draht ebenfalls im Zusammenhang mit einer Chemotherapie bei Lungenkarzinom-Patienten angewendet und ein Zusammenhang der CTC-Zahl zu den Tumorstadien und dem Verlauf einer Erkrankung vermutet, allerdings wurde eine statistische Signifikanz nicht beobachtet.

2 Fragestellungen

Können durch die Anwendung des funktionalisierten Drahtes bei Lungenkrebspatienten zirkulierende Tumorzellen isoliert werden?

Lassen sich Zusammenhänge zu der Tumorentität, dem Tumorstadium und der Kinetik der Verläufe in dieser Proof-of-Principle-Studie herstellen?

Wie lassen sich die Ergebnisse in den Kontext vorangegangener Studien zu anderen Tumorentitäten und Methoden der CTC-Isolierung einordnen?

Welche Vorschläge zu Methodik oder Studiendesign lassen sich für weiterführende Studien formulieren?
Welche Ergebnisse geben Anlass für genauere Betrachtungen?

3 Material und Methodik

3.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Studie wurde der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor Beginn der Untersuchungen im Dezember 2012 vorgelegt. Nach ausführlicher Beratung wurden keine Einwände gegen die Durchführung erhoben. Jeder Patient stimmte schriftlich der Teilnahme an der Studie zu.

Es wurden insgesamt 24 Patienten der Klinik für Innere Medizin I, Schwerpunkt Pneumologie des Universitätsklinikums Halle eingeschlossen, wobei für die konkreten statistischen Betrachtungen letztlich Daten von 17 Patienten verwendet wurden (die weiteren konnten auf Grund vorzeitigen Abbruchs der Studie, Wohnortwechsel, nicht auswertbarem Basiswert etc. nicht weiter betrachtet werden). Zeitgleich wurde eine Ex-vivo-Studie durchgeführt, bei denen Daten von 10 gemeinsamen Patienten zeitgleich zur in-vivo-Anwendung erhoben wurden (siehe Abbildung 3.1). Auf diesen Zusammenhang soll in der vorliegenden Arbeit nicht vertiefend eingegangen werden.

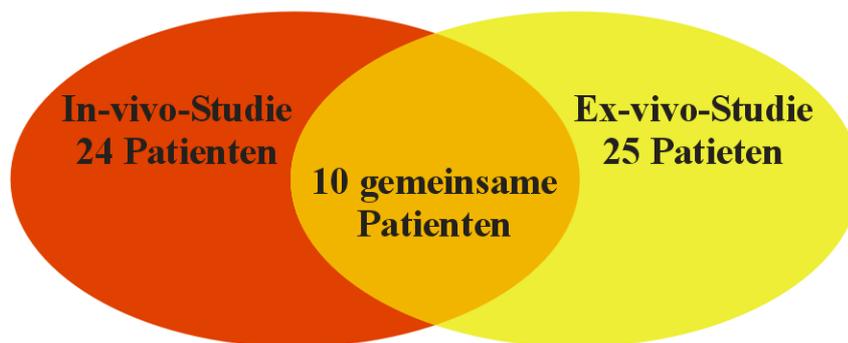


Abbildung 3.1.: Schema zum Studienaufbau In-vivo/Ex-vivo

Das mediane Alter zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses lag bei 66 Jahren. Die Altersspanne erstreckte sich von 54 bis 77 Jahren. Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war die Diagnose eines primären Lungenkarzinoms oder der Progress eines bekannten Lungentumors. Letztere Patienten sollten für mindestens 12 Wochen keine tumorspezifische Therapie erhalten haben. Es wurden Patienten mit allen histologischen Typen eingeschlossen. Für den Einschluss der Patienten in die Studie war weiterhin entscheidend, dass eine Chemotherapie geplant war.

3.2 Durchführung der Visits

Es erfolgten 5 Anwendungen des Detektors:

Anwendung 1 unmittelbar, d.h. ca. 30 min vor Gabe der ersten Chemotherapie (bzw. des neuen Chemotherapiezyklus), die weiteren Anwendungen (2,3,4,5) im Abstand von 2-4 Wochen bis zum nächsten Restaging (siehe Abbildung 3.2).

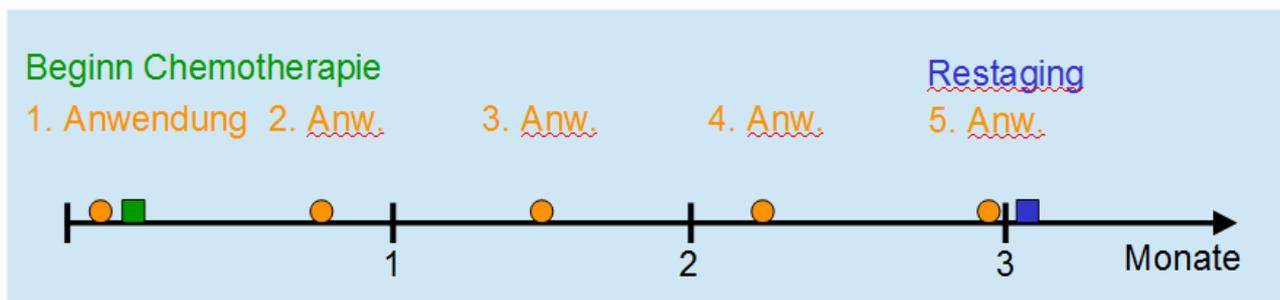


Abbildung 3.2.: Zeitliches Schema der Draht-Anwendungen

3.3 Aufbau des Drahtes:

Es wurde das zertifizierte medizinische Gerät „CANCER01“ der Firma GILUPI (Potsdam) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen 16 cm-langen Metalldraht, dessen Spitze (2cm Länge) mit einer Goldbeschichtung versehen ist (siehe Abbildung 3.3). Darauf ist ein Hydrogel aufgebracht, in das chimäre Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM eingelagert sind. Kommen im Blut zirkulierende Zellen mit epitheliale Charakter in Kontakt mit diesem Draht, findet eine Antikörperbindung statt, über die sich die Zellen an den Draht anheften und auf diese Weise isoliert werden können. Nach Fixierung der Zellen werden unter Zuhilfenahme verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe diese unter dem Lichtmikroskop begutachtet und gezählt.

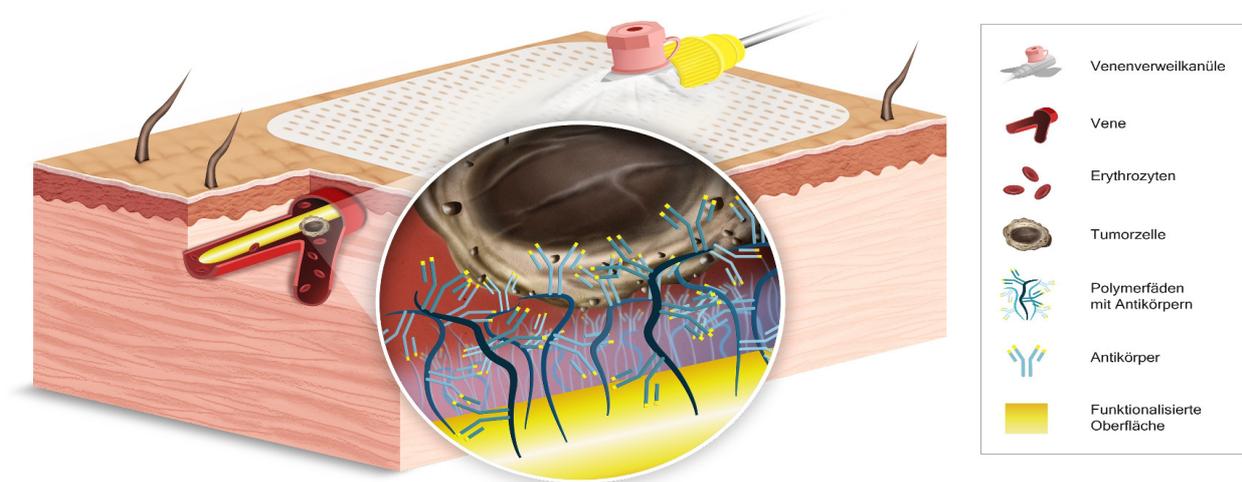


Abbildung 3.3: Aufbau des funktionalisierten Drahtes und Anwendung mittels Venenverweilkanüle

Quelle: GILUPI

3.4 Anwendung

Der Draht wird durch eine handelsübliche periphere Venenverweilkanüle der Größe 20G (Firma BRAUN) eingeführt. Diese sollte in der Kubitalvene angelegt werden, da hier am ehesten vom Kontakt zu einem ausreichenden Blutvolumen ausgegangen werden kann (siehe Abbildung 3.4). Zudem haben Kubitalvenen normalerweise einen ausreichend geraden Verlauf, der das sichere Liegen des Detektors ermöglicht. In Ausnahmefällen musste auf Unterarmvenen zurückgegriffen werden, da im Laufe der Chemotherapie eine verdickte und verhärtete Gefäßwand die Anlage einer Venenverweilkanüle unmöglich machte. Das ist vermutlich auf fibrotische Umbauprozesse zurückzuführen. Weiterhin wurde die Venenverweilkanüle in fast allen Fällen unmittelbar vor der Drahtanwendung gelegt, um das Risiko von Umbauvorgängen und Reizungen der Venenwand zu minimieren.

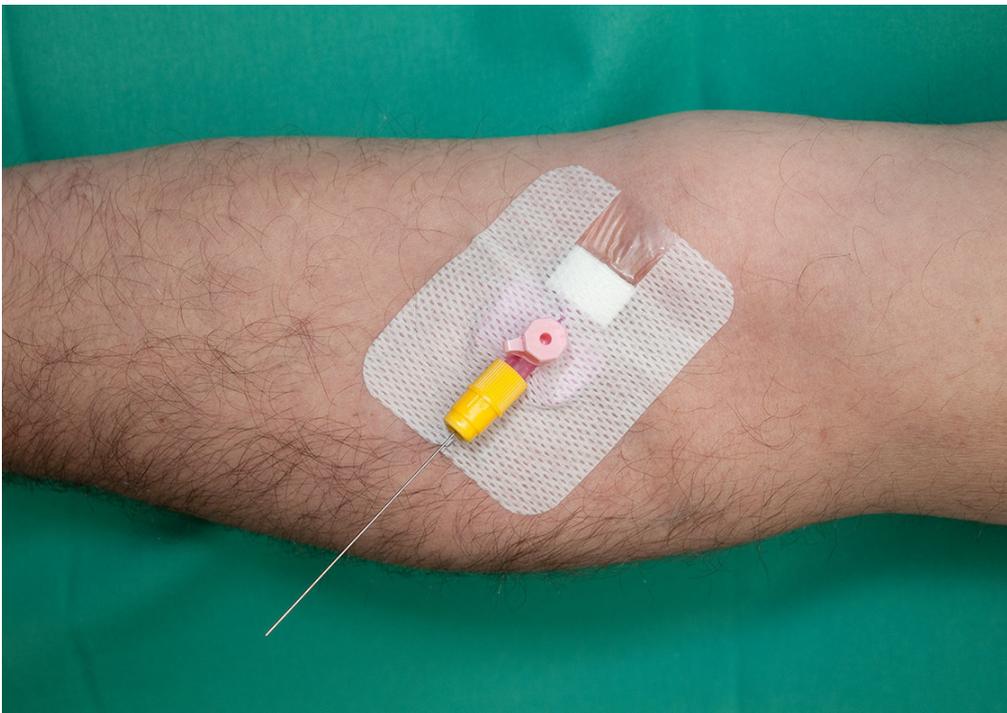


Abbildung 3.4.: Draht während einer Anwendung

Zunächst wurde die Durchgängigkeit mit der Verabreichung von 10 ml NaCl-Lösung geprüft. Der Draht verblieb für 30 min bei ruhig gehaltenem, leicht angewinkeltem Ellenbogen und wurde nach Entfernen in 3 Waschschritten mit PBS-Puffer gespült, somit von unspezifisch gebundenen Blutzellen befreit, und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in Aceton fixiert. Diese Fixierung diente der Konservierung und dem Transport des zu untersuchenden Substrats. Danach wurde der Draht für weitere zehn Minuten an der Luft getrocknet und bis zum Versand bei -20°C aufbewahrt. Für weitere

molekularbiologische Untersuchungen wurde bei jeder Sitzung im Anschluss direkt ein zweiter Draht eingeführt. Auch hierbei wurde zunächst mit 10 ml PBS Lösung gespült. Dieser wurde nicht mit Aceton fixiert sondern nur gewaschen, zerschnitten und bei -80°C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Zur quantitativen (sprich: mikroskopischen) Auswertung und zur Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten diese Drähte aber nicht.

3.5 Färbung der Drähte:

Die gebundenen Zellen wurden zunächst permeabilisiert (0.1% Triton X-100/PBS für 10 Minuten), geblockt (3% BSA/PBS für 30 Minuten). Die Anfärbung der Zellen erfolgte mit drei verschiedenen an Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen. Hoechst-Kernfärbung 33342, Anti-CD45-APC (Exbio, clone MEM-28-Alexa647) sowie Anti-Pan-Cytokeratin (CK8, CK18, CK19: Exbio, clone C11-Alexa488; Millipore, clone LP5K- FITC; Exbio, clone A53-B/A2-Alexa488) und Anti-EpCAM-Farbstoff (Acris, clone HEA125-FITC). Die Anwendung einer Hoechst-Kernfärbung diente dem Nachweis, dass es sich um eine Zelle mit Zellkern handelt. CD45 ist ein Pan-Leukozyten-Protein (leukocyte common antigene LCA). Die Färbung mit Antikörpern gegen dieses Protein diente dem Nachweis unspezifisch gebundener Leukozyten. Die Zytokeratine CK8, CK18, CK19 sind Intermediärfilamente und epitheliale Strukturproteine, die in Karzinomen überexprimiert sind (Chen et al. 2013, S. 57). Somit dienen sie dazu, bei den zuvor gebundenen Zellen die Annahme einer Malignität zu stützen. Die Drähte wurden mit 20-facher Vergrößerung in allen drei Fluoreszenzkanälen unter dem Lichtmikroskop (Axio Imager A1 Mikroskop ausgestattet mit einer AxioCam Digitalkamera und AxioVision 4.6 software (Zeiss)) betrachtet, nach Zellen durchsucht. Diese Zellen wurden im Falle von CD45-Negativität sowie Hoechst- und Pan-CK-Positivität und/oder EpCAM-Positivität als zirkulierende Tumorzelle gewertet (siehe Abbildung 3.5)

Darüber hinaus musste die als CTC identifizierte Zelle eine Größe zwischen 5 und 50 μm , einen runden bis ellipsoiden Zellkern und ein zum Zellkern überwiegendes Zellkern/Zytoplasma-Verhältnis haben (Theil et al. 2016, S. 1).

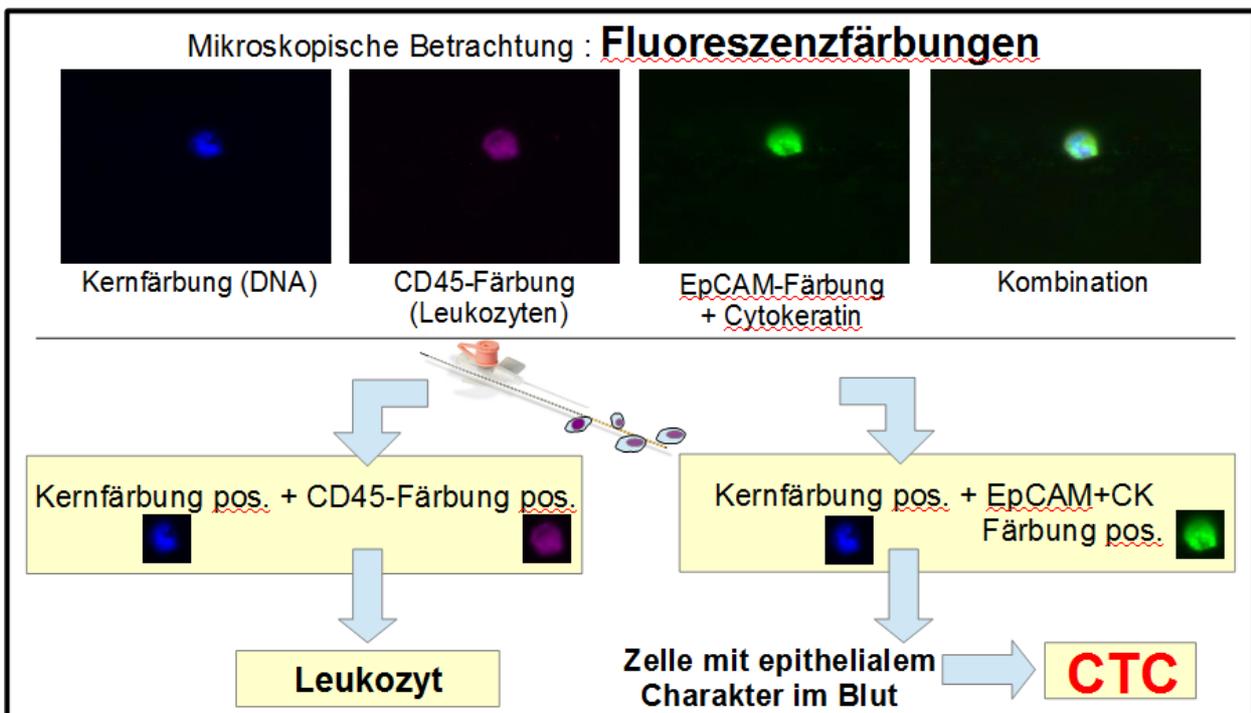


Abbildung 3.5.: Mikroskopische Auswertung nach Fluoreszenz-Anfärbung

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Die CTC-Anzahl und die Überlebenszeit wurden dem Ergebnis des Restagings und dem histologischen Typ gegenübergestellt. Für den

Vergleich der CTC-Anzahl der In-vivo/Ex-vivo Anwendung des Drahtes wurde der Wilcoxon-Test verwendet, für die Untersuchung des Einflusses eines Basiswerts ≥ 5 CTC auf den Verlauf der Erkrankung und für den Zusammenhang mit dem histologischen Tumortyp der Chi-Quadrat- und Fisher's Exact-Test.

Der Mann-Whitney-Test wurde für den Vergleich der CTC-Zahl-Entwicklungen in ihrer Kinetik verwendet. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests erfolgte die Untersuchung der CTC-Differenz zwischen erster und letzter Anwendung gruppiert nach rückläufiger bzw. stabiler Erkrankung und einer Progredienz.

Das Restaging erfolgte nach ca. 3 Monaten den aktuellen RECIST 1.1-Kriterien folgend.

4 Ergebnisse:

4.1. Allgemeines

Von den insgesamt 24 Patienten wurden für die statistischen Auswertungen 17 Patienten berücksichtigt (Bei 3 Patienten konnte kein Basiswert bestimmt werden, in weiteren 4 Fällen verstarb der Patient vor Abschluss des Restagings und letzter Drahtanwendung, verzog oder setzte die Therapie aus sonstigen Gründen nicht fort). Bei 46/76 Anwendungen (59,2 %) konnten CTC detektiert werden. Es fanden sich zwischen 1 und 92 CTCs, der Median lag bei 2 CTC.

Nach einer Untergruppierung der 17 Patienten in 12 Patienten mit und 5 Patienten ohne Metastasen ergab sich für erstere ein Median von 4,5 CTC im Basiswert und eine Streubreite von 0 – 32 CTC, damit etwas höhere Werte als bei der letzteren Gruppe mit M0, Median 2 CTCs und Streubreite 0 – 28 CTCs. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p=0.977$, Wilcoxon rank-sum test). Die Gesamtheit der Ergebnisse ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Eine eindeutige positive Korrelation zwischen dem Progress der Erkrankung und der CTC-Zahl im Verlauf der Anwendung konnte nicht festgestellt werden. Es zeigten sich sogar durchschnittlich geringere Zahlen beim Endwert im Vergleich zum Basiswert in der Progressive-Disease-Gruppe (siehe Tabelle 4.1.) Die Basiswerte ≥ 5 CTC waren mit einem Anteil von 50 % in der Progressive-disease-Gruppe annähernd gleichverteilt mit der Partial-Remission/Complete-Remission/Stable-Disease-Gruppe (43,6 %). Bildet man eine Rangfolge der CTC-Anzahl-Entwicklungen jeweils im Vergleich zu der darauffolgenden Anwendung zeigte sich eine leicht größere CTC-Abnahme in der Gruppe der Remissions- und Stable-Disease-Patienten, der Zusammenhang war nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test). Ebenso fand sich keine statistische Signifikanz hinsichtlich der CTC-Differenzen der ersten und letzten Legung in den Gruppen rückläufige/vollständig remittierte Erkrankung und fortschreitende Erkrankung ($p=2,2$).

Die Kaplan-Meyer-Kurven (Diagramm 4.4.-4.6) zeigen Überlebenszeiten im Vergleich zwischen PD und CR,PR,SD, zwischen dem CTC-Mittelwert ≥ 5 und < 5 und zwischen dem Basiswert der CTC-Anzahl ≥ 5 bzw. < 5 .

In Diagramm 4.7 sind die gesamten Ergebnisse in Abhängigkeit von der Anwendungsnummer und PD versus CR/PR/SD dargestellt.

4.2. CTC-Cluster

Bei 8 von 76 Drahtanwendungen wurden CTC-Cluster detektiert. Auffallend ist, dass Patienten, die in der Summe der Anwendungen mehr als 4 CTC-Cluster aufwiesen (1 Patient mit insgesamt 7, 1 Patient mit insgesamt 8 CTC-Clusters) ausschließlich bei Progressive-Disease-Patienten vorgekommen sind. Bei 3 Patienten, die in die weitere statistische Betrachtung nicht eingeflossen sind, da der Basiswert nicht bestimmbar war, fanden sich ebenfalls 7-8 CTC-Cluster (2 Patienten) und 5-6 CTC-Cluster (1 Patient).

Tabelle 4.1.: CTC-Zahlen in Abhängigkeit vom Resultat des Restagings

	CR/PR/SD	PD	CR/PR/SD + PD
Anzahl Patienten	7	10	17
Anzahl der Drahtanwendungen	33	43	76
Mittelwert der CTC-Anzahl	12	6	8
Median ± Standardabweichung der CTC-Anzahl	4 ± 20	0 ± 12	2 ± 17
Minimalwert der CTC-Anzahl	0	0	0
Maximalwert der CTC-Anzahl	92	56	92
Anteil der Anwendungen CTC-Zahl ≥ 1	24/33 (72,7 %)	21/43 (48,8 %)	45/76 (59,2 %)
Anteil der Patienten mit einem Basiswert CTC (V1) ≥ 5	3/7 (42,9 %)	5/10 (50 %)	8/17 (47,1 %)
Mittlere CTC-Differenz: V1 zu V5 (positiver Wert=Zunahme)	2	-7	-3

PD=Progressive Disease, SD=Stable Disease, PR=Partial Remission, CR=Complete Remission. Basiswert = das Ergebnis der jeweiligen ersten Drahtanwendung.

4.3 Plattenepithelkarzinom

Die höchsten CTC-Zahlen sowohl in Hinblick auf Anwendungen, bei denen CTC isoliert werden konnten als auch beim Mittelwert und den Basiswerten ≥ 5 CTC zeigten sich bei den Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom (SCC) (siehe Tabelle 4.2). Dieser Zusammenhang wurde mit dem Fisher's Exact Test untersucht und mit einem p-Wert von 0.00905 als statistisch signifikant eingeschätzt und damit hinweisend auf höhere CTC-Anzahlen bei den Basiswerten von Plattenepithelkarzinomen im Gegensatz zu anderen Lungenkrebs-Entitäten. Darüber hinaus fanden sich beim Plattenepithelkarzinom auch die höchsten CTC-Anzahlen. Sowohl Mittelwert als auch Median waren mit 10 CTC bzw. 4 CTC am höchsten. Ebenso ließ sich in der SCC-Gruppe der stärkste Abfall der Zellen zum Zeitpunkt des Restagings verzeichnen (im arithmetischen Mittel eine Abnahme von 13 CTC). Bei der größten Gruppe, der Patienten mit einem Adenokarzinom, ließ sich eine leichte Abnahme der CTC-Zahlen nach Chemotherapie und Restaging verzeichnen.

Tabelle 4.2.: CTC-Zahlen in Abhängigkeit vom histologischen Typ				
	NSCLC		SCLC	NSCLC + SCLC
	Adenokarzinom	SCC		
Anzahl Patienten	9	5	3	17
Anzahl der Drahtanwendungen	39	22	15	76
Mittelwert der CTC-Anzahl	9	10	4	8
Median ± Standardabweichung der CTC-Anzahl	2 ± 19	4 ± 15	2 ± 8,	2 ± 17
Maximalwert der CTC-Anzahl	92	56	32	92
Minimalwert der CTC-Anzahl	0	0	0	0
Anteil der Anwendungen CTC-Zahl ≥ 1	20/39 (51,3%)	16/22 (72,7 %)	8/15 (53,5 %)	45/76 (59,2 %)
Anteil der Patienten mit einem Basiswert CTC (V1) ≥ 5	2/9 (22,2 %)	5/5 (100 %)	1/3 (33,3 %)	8/17 (47,1 %)
Mittlere CTC-Differenz: V1 zu V5 (positiver Wert=Zunahme)	1	-13	0	-4

SCC=Plattenepithelkarzinom, SCLC=Kleinzelliges Lungenkarzinom. Basiswert = das Ergebnis der jeweiligen ersten Drahtanwendung.

Tabelle 4.3.: Ergebnisse der einzelnen Visits													
Patient	Histo- logie	Staging				CTC-Anzahl in-vivo (ex-vivo)					Resultat Restag- ing	Überleben ab ED [Monate] Stand Dez. 2016	
		T	N	M	UICC	V1	V2	V3	V4	V5			
001	SCLC	4	2	1b	IV	n.a.	n.a.	0	2	16	PR	43	
002	SCLC	4	2	1b	IV	n.a.	n.a.	1	1	45	PR	16	
										5x2,2x3 CTC- Cluster			
003	Ad.-C	1b	3	1b	IV	n.a.	3	10	6	54	PD	30	
								1 x 2 CTC- Cluster	1 x >3 CTC- Cluster	1 x 2 CTC- Cluster			
004	Ad.-C	3	3	0	IIIb	0	25	6	25	21	PR	26	
									2 x 2 CTC- Cluster	2 x 2 CTC- Cluster			
005	Ad.-C	k. A.	k. A.	1b	IV	2	11	92	17	0	PR	8	
									1 x 2 CTC- Cluster				
006	SCLC	4	3	1b	IV	0					Exitus letalis	1	
007	SCC	4	3	1b	IV	32	37	1			PD	6	
						4 x 2 CTC- Cluster	3 x 2 CTC- Cluster						
008	SCLC	3	3	1c	IV	13	32				Therapy dis- continue d	1	
						1 x 5 CTC- Cluster	3 x 2 CTC- Cluster						
009	SCC	4	3	1b	IV	6	19	7	0		PR	alive	

Tabelle 4.3.: Ergebnisse der einzelnen Visits												
Patient	Histo- logie	Staging				CTC-Anzahl in-vivo (ex-vivo)					Resultat Restag- ing	Überleben ab ED [Monate] Stand Dez. 2016
							1 x 2 CTC- Cluster					
010	SCC	1b	X	0	IA2- IIIb	28	56	4	3	0	PD	9
						1 x 2 CTC- Cluster	7 x 2-3 CTC- Cluster					
011	Ad.-C	4	3	1a	IV	35	0				PD	alive
						6 x 2 CTC- Cluster						
012	Ad.-C	4	2	0	IIIb	0	0	0	0		PD	4
013	SCLC	2a	X	1b	IV	0	6				Change of Residen ce	2
014	SCC	1	1	1b	IV	8	0	0	0	2	PD	10
015	Ad.-C	2	2	1b	IV	0	0	0			Exitus letalis	2
016	SCLC	4	3	1b	IV	0	0	0	0	2	PD	8
017	Ad.-C	4	2	1	IV	4	0	0	5	4	PD	19
018	SCC	4	3	1a	IV	6	0	2	4	14	PR	17
019	Ad.-C	2	2	1b	IV	0	0	6	7	1	PD	6
020	Ad.-C	4	2	1b	IV	0	79	0	2	0	PR	16
021	Ad.-C	4	3	1b	IV	5	5	0			PD	9

Tabelle 4.3.: Ergebnisse der einzelnen Visits												
Patient	Histo- logie	Staging				CTC-Anzahl in-vivo (ex-vivo)					Resultat Restag- ing	Überleben ab ED [Monate] Stand Dez. 2016
		1a	2	0	IIIa	9	15	0	2			
022	Ad.-C	1a	2	0	IIIa	9	15	0	2		SD	alive
023	SCLC	4	3	0	IIIb	2	4	9	0	4	CR	alive
024	SCLC	2	2	Ib	IV	8	0	32	0	3	PD	9

Tabelle 4.3: PD=Progressive Disease, SD=Stable Disease, PR=Partial Remission, CR=Complete Remission. Ad.-C.=Adenokarzinom, SCC=Plattenepithelkarzinom, SCLC=Kleinzelliges Lungenkarzinom. Grau hinterlegt: Patienten, die in die statistische Betrachtung nicht eingeflossen sind (Pat.001-003: kein Anfangswert, Pat.006,008,011,013 kein Endpunkt bzw. kein Restaging nach ca. 3 Monaten erfolgt).

4.4 Repräsentative Verläufe

In den Abbildungen 4.1 – 4.3 sind Verläufe von Patienten dargestellt, bei denen die vermutete Korrelation der CTC-Zahlen mit dem Krankheitsverlauf ersichtlich war, d.i. bei Progressive Disease (PD) eine Zunahme und bei Partial Remission (PR) und Complete Remission (CR) eine Abnahme. Zu beachten ist, dass sich nicht bei allen Patienten eine einheitliche Zahl an Anwendungen realisieren ließ. Die letzte Anwendung fand immer zum Zeitpunkt des Restagings statt (im Falle von Pat. 006 und Pat. 018 nach 5 Anwendungen bzw. im Falle von Pat. 010 nach 4 Anwendungen).

Pat. 005 (siehe Abbildung 4.1): Partial Remission, Adenokarzinom, Alter bei Diagnosestellung: 57 Jahre: Nach einem anfänglichen Anstieg der CTC-Anzahl, liegt diese beim Restaging bei 0.

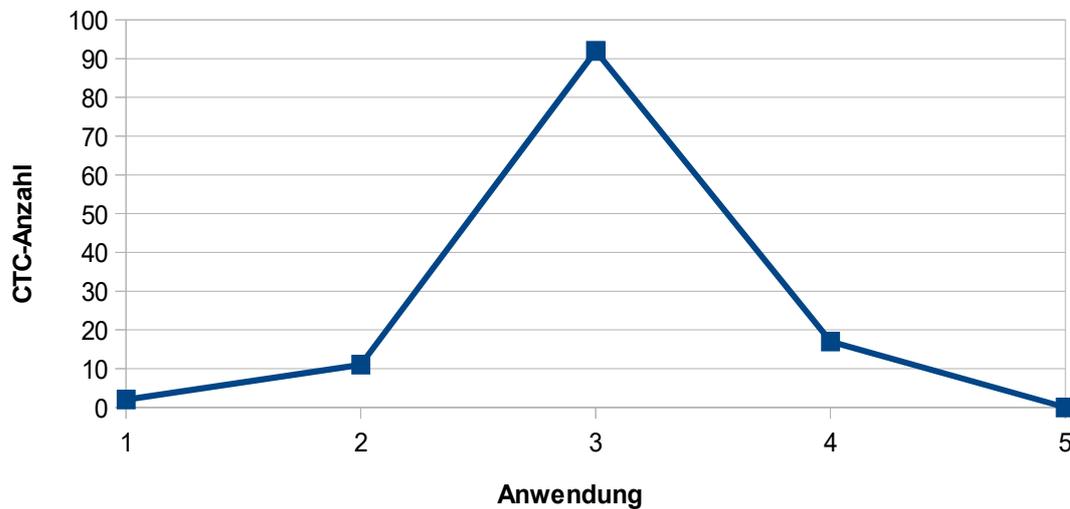


Diagramm 4.1: Pat. 005, Partial Remission

Pat. 009 (siehe Abbildung 4.2): Partial Remission, Plattenepithelkarzinom, Alter bei Diagnosestellung: 61 Jahre: : Auch hier zeigt sich nach einem anfänglichen Anstieg ein Absinken der CTC-Anzahl auf 0.

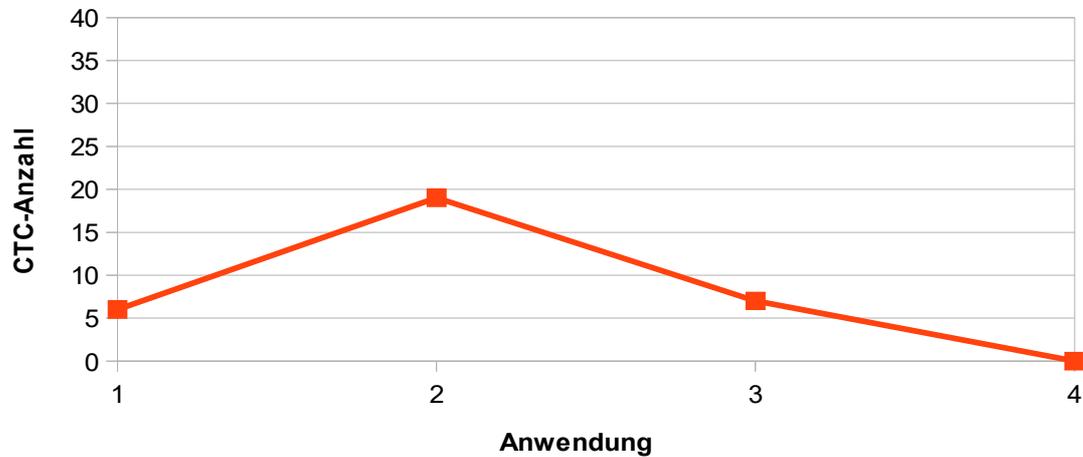


Diagramm 4.2: Pat. 009 Partial Remission

Pat 017: Progressive Disease (siehe Abbildung 4.3), Adenokarzinom, Alter bei Diagnosestellung: 62 Jahre: Nach einer anfänglichen Reduktion der Werte auf 0, ergibt sich zum Zeitpunkt des Restagings ein erneuter Anstieg.

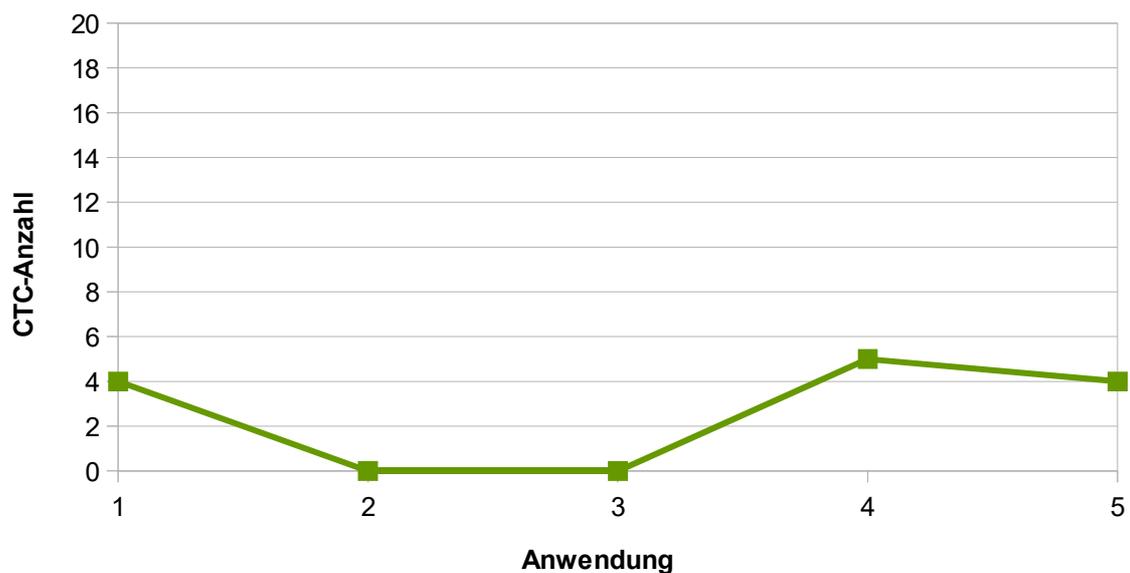


Abbildung 4.3.: Pat. 017 Progressive Disease

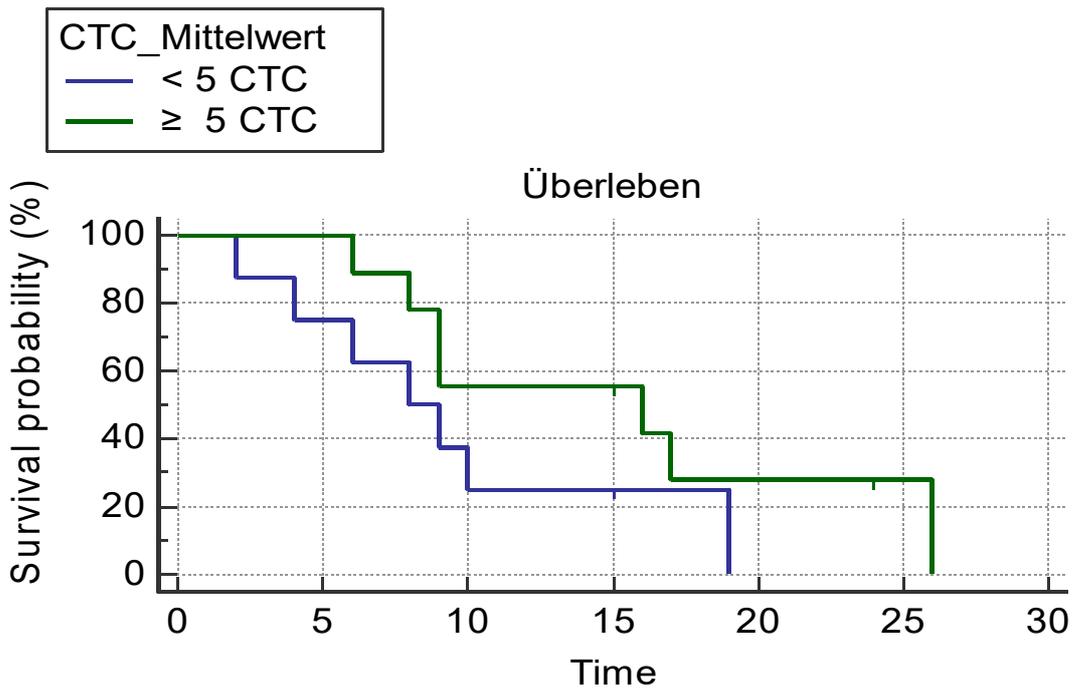


Diagramm 4.4.: Kaplan-Meyer-Kurve zum Zusammenhang des CTC-Mittelwertes und der Überlebenszeit. Eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht.

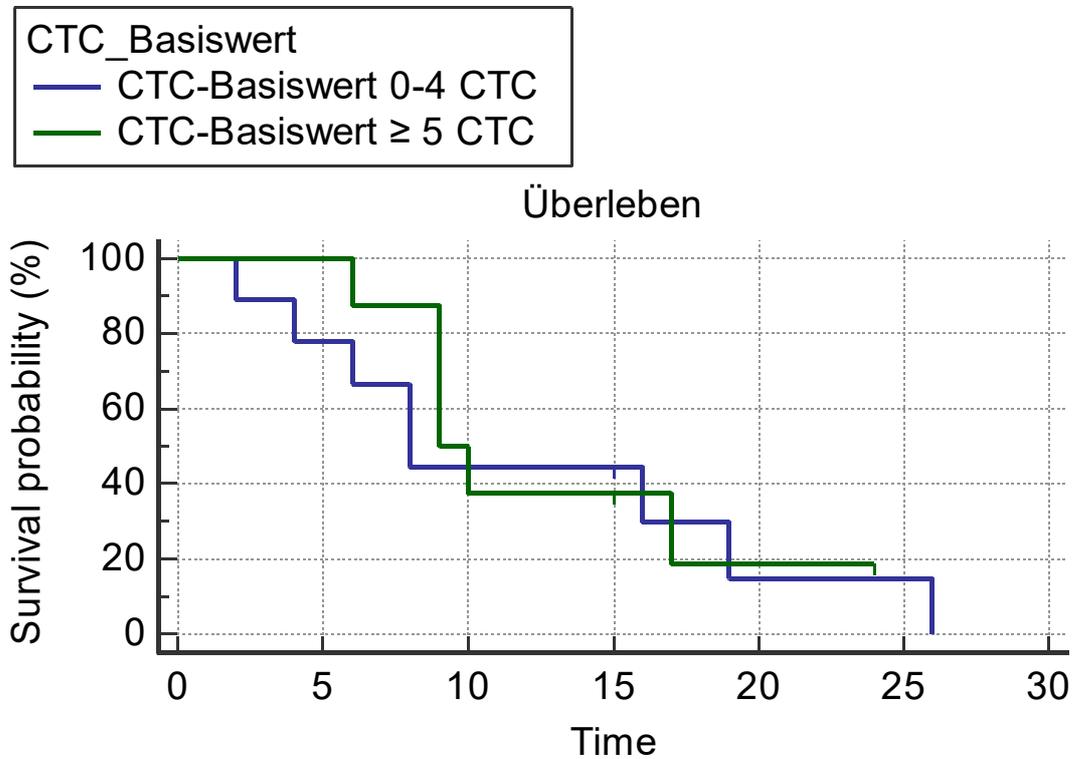


Diagramm 4.5.: Zusammenhang zwischen der Höhe des Basiswertes CTC und der Überlebenszeit: Eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht

In Abbildung 4.1. finden sich repräsentative Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen mit Erläuterungen.

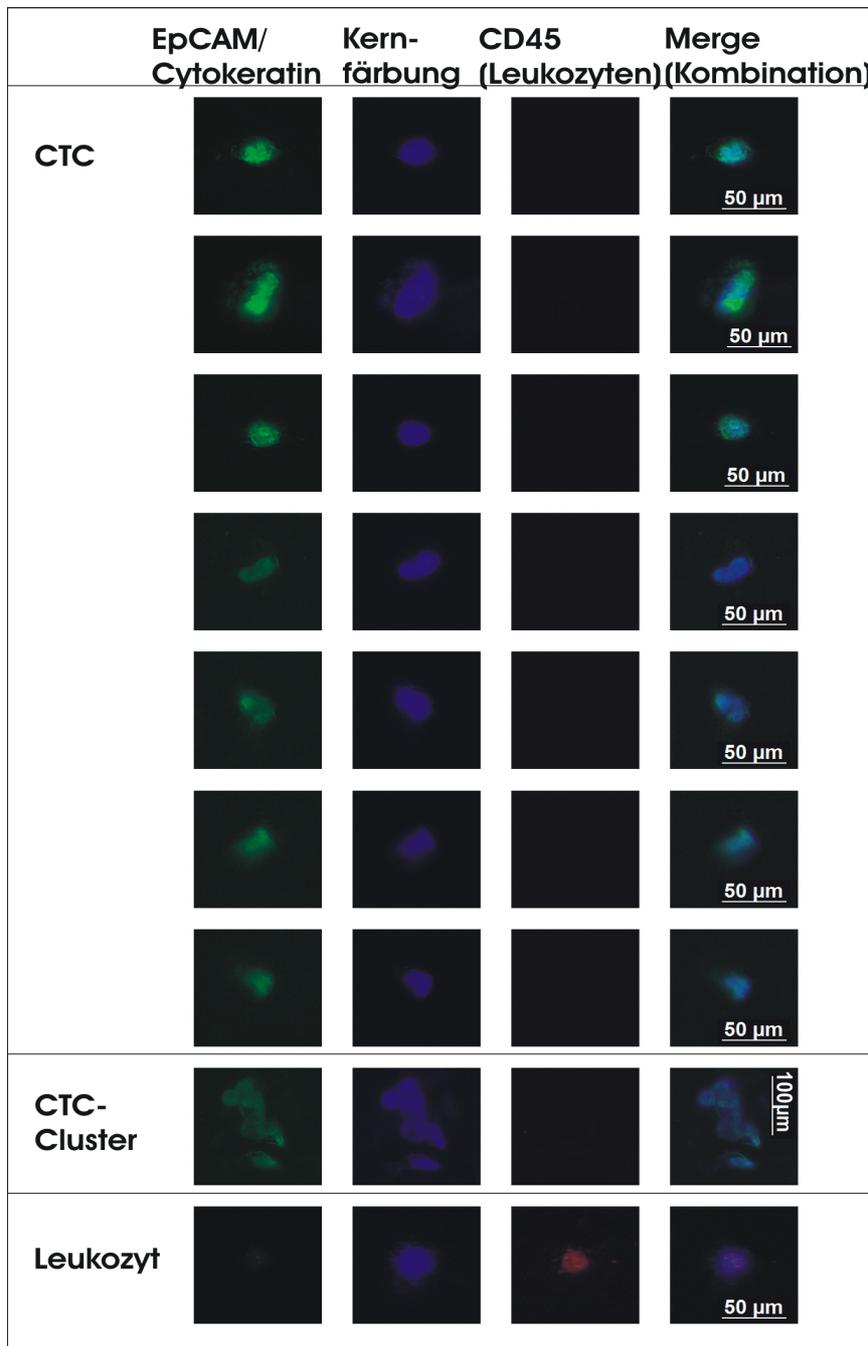


Abbildung 4.1.: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von CTC, CTC-Clustern und Leukozyten. Man beachte die unterschiedliche Anfärbbarkeit in den einzelnen Farbkanälen

5 Diskussion:

In der vorliegenden Arbeit konnten gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen bei Lungenkrebspatienten isoliert werden können und begleitend zur Chemotherapie mit mehreren Anwendungen eine kinetische Beobachtung möglich ist.

Es ließen sich mit dieser In-vivo-Methode bei dem überwiegenden Teil der Patienten Zellen isolieren, die nach Anfärbung mittels verschiedener Fluoreszenz-markierter Antikörper und unter Berücksichtigung zytologischer Malignitätshinweise am wahrscheinlichsten zirkulierende Tumorzellen sind. Weiterhin lassen der Mechanismus der Detektion, die Grunderkrankung sowie die Ergebnisse vergleichbarer Studien mit Negativ-Proben und einem vergleichbaren System (Allard et al. 2004) die Annahme zu, dass es sich um zirkulierende Tumorzellen handelt. Zwar können bei Patienten mit benignen Dickdarm- und Brusterkrankungen CK-positive Zirkulierende Zellen detektiert werden, doch treten diese in geringerer Anzahl auf und die histopathologischen Eigenschaften lassen in den meisten Fällen keine malignen Kriterien erkennen. Diese Studien wurden mit dem prinzipiell vergleichbaren System CellSearch durchgeführt. Es wird vermutet, dass Entzündungsreaktionen mittels inflammatorischer Zytokine zu einer Migration von epithelialen Zellen führen (Pantel et al. 2012, Allard et al. 2004).

Die Menge der detektierten Zellen pro Anwendung und Detektionshäufigkeit von zirkulierenden Tumorzellen ähnelt den Ergebnissen vorangegangener Studien mit der Verwendung desselben Systems bei Lungenkrebs-, Prostatakazinom-, und Dünndarmkarzinoidpatienten (Gorges et al. 2016; Theil et al. 2016; Mandair et al. 2016).

Teile dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu vorher publizierten Ergebnissen. Gegensätzlich zu den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen mit derselben (Gorges et al. 2016) und vergleichbaren Methoden (Hou et al 2012, Krebs et al. 2011) konnte kein Zusammenhang hergestellt werden, der eine direkte Proportionalität zwischen Zunahme der Krankheitsbefunde und Anzahl der CTCs bei Restaging nahelegt. Die Differenzen zwischen der jeweils ersten und letzten Anwendung waren in den Gruppen rückläufige/komplett remittierte Erkrankung und progrediente Erkrankung nicht signifikant verschieden ($P=2,2$). Es zeigte sich sogar ein gegensätzlicher Trend: Die Progressive-Disease-Patienten zeigten (als einzige) einen Abfall der CTC-Anzahl im durchschnittlichen Verlauf der Messungen. Zu diskutieren ist bei diesen Patienten ein größerer Verlust der EpCAM-Expression im Rahmen der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Diese wird als wichtiger früher Schritt in der Entstehung von CTC und Metastasen angesehen, indem nämlich die Mobilisierung aus einem Zellverband initiiert wird (Bonnomet et al. 2010; Gunasinghe et al. 2012). Weiterhin ist ein Ansprechen der Chemotherapie auf weniger undifferenzierte, für die Krankheitsprogredienz weniger entscheidende Zelltypen denkbar, wohingegen solche Zellen, die bei einem Teil der Progressive-Disease-Patienten zu einer Vergrößerung der Metastasen geführt haben, nicht ausreichend detektierbar und gleichzeitig weniger Chemotherapie-responsibel sein könnten.

Die Anteile von Patienten mit Basiswerten ≥ 5 CTC waren in den Gruppen Partial-Remission/Complete-Remission/Stable-Disease und Progressive disease vergleichbar. Weiterhin fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium zum Zeitpunkt der ersten Anwendung und der korrespondierenden CTC-Anzahl. Zu letzterem Ergebnis ist eine Arbeitsgruppe in einer vorangegangenen Studie ebenfalls gekommen (Chudak et al 2016). Ein sich früh abzeichnender Trend, der prognostische Aussagen durch den Basiswert zulässt, konnte nicht nachgewiesen werden. Da keine statistische Signifikanz erreicht wurde, sind weiterführende Studien notwendig, die diese Fragestellung untersuchen.

Im Gegensatz zu vorigen Studienergebnissen (Gorges et al. 2016) zeigten sich keine höheren CTC-Zahlen bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) (Sowohl in Hinblick auf den Basis-, Durchschnitts- und Endwert der CTC-Anzahl; die Ursache könnten große intra- und interindividuelle den zahlreichen Einflussfaktoren der Methode geschuldete Schwankungen der CTC-Anzahl sein). Vielmehr war dies bei den Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom (SCC) der Fall. Auffallend war der hohe Anteil von Anwendungen, bei denen mehr als eine CTC detektiert wurde, und dass bei allen Patienten der erste Wert der Visits ≥ 5 CTCs betrug. Ebenso fand sich in der SCC-Gruppe die gravierendste Abnahme der CTCs begleitend zu den Messungen und der Chemotherapie (Median -13 CTCs). Einschränkend ist zu erwähnen, dass dieser Histotyp nur auf 5 Patienten zutraf und verschiedene Resultate beim Restaging erzielt wurden (siehe Tabelle 3.2.). Für den Zusammenhang zwischen dem CTC-Basiswert ≥ 5 CTC und der Tumorentität wurde eine statistische Signifikanz errechnet (Fisher's Exact Test).

Die Therapieformen bei diesen Patienten waren sowohl initiale alleinige Operation mit Chemotherapie nach der Feststellung einer Progressive Disease als auch unmittelbare Chemotherapie. Die nachweislich hohe Expression von EpCAM bei Zellen eines Plattenepithelkarzinoms könnte eine Erklärung für die vergleichsweise hohen CTC-Basiswerte und hohe Chemotherapie-Responsivität sein (Pak et.al. 2012)

Hinsichtlich der Resultate können mehrere Einflussfaktoren diskutiert werden: Zum einen war die Studienpopulation mit 24 eingeschlossenen Patienten und schließlich 17 Patienten in der statistischen Auswertung vergleichsweise klein.

Die Methode der CTC-Isolierung ist hohen intra- und interindividuellen Schwankungen des Testablaufs unterworfen und bisher nicht standardisierbar: Eine Venenverweilkanüle wird vor jedem Versuch neu eingebracht. Das in Kontakt tretende Blutvolumen schwankt vermutlich in Abhängigkeit von dem punktierten Blutgefäß, der Kompression durch das umliegende Gewebe und der Anatomie des venösen Gefäßes z.Bsp Venenklappen. Weiterhin sind die Flussgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser und die lokale Gefäßstruktur als Einflussfaktoren anzunehmen. In manchen Fällen, namentlich wenn die Punktion einer Kubitalvene erfolglos war, wurde auf eine Vene am Unterarm ausgewichen. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit nicht genauer untersucht.

Es wurde bislang nicht untersucht, ob zirkulierende Tumorzellen in allen Abschnitten des arteriellen und venösen Blutgefäßsystems in gleichmäßiger Verteilung anzutreffen sind. Methodische Optimierungen des

Drahtes sind notwendig. Mit dem Ziel, die Nachteile der peripheren Zirkulation zu umgehen, existieren mehrere Studien, bei denen zumeist im Rahmen von Operationen Pulmonalvenenblut gewonnen wurde (Phil et al. 2016; Okamura et al. 2009; Sawabata et al. 2016). Nach wie vor ist die Menge an zirkulierenden Tumorzellen und wie oft diese den Kreislauf passieren können nicht genau geklärt. Bei Phil et al. und Okamura et al. wird zwar das ebenfalls EpCAM-basierte Cellsearch-System verwendet, dennoch wurden hier im Pulmonalvenenblut deutlich höhere CTC-Anzahlen bestimmt als im parallel gewonnenen peripheren venösen Blut. Dies stellt den Versuch dar, einen „Goldstandard“ zu etablieren, an dem Methoden, an peripheren Blutgefäßen CTCs zu isolieren, gemessen werden könnten. Bei Funaki et al. 2010 zeigten sich, wenn auch mit einer anderen Methode, im Pulmonalvenenblut höhere Anteile an CTC-Clustern als in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnten. Einschränkend ist hier zu erwähnen, dass in den meisten Studien vor und nach chirurgischer Intervention CTC bestimmt wurden und nach der Intervention im Regelfall deutlich höhere Zahlen vorlagen, was die Mutmaßung nahelegt, dass jede Art von Manipulation im Bereich der Lunge Zellen mobilisieren und diese unabhängig vom Tumorstadium etc. den gewonnenen Blutproben zuführen könnte.

Unabhängig von methodischen Faktoren wird vermutet, dass die Expression von EpCAM in zirkulierenden Tumorzellen sowohl inter- als intraindividuell entlang der Zeitachse schwankt (Went et al. 2004), zumal maligne Zellen eine erhöhte Mutagenität aufweisen und die Expression von EpCAM verlorengehen kann, was zumindest die Abnahme der CTC-Anzahl im Verlauf von Patienten mit Progressive Disease erklärt (dies traf in einigen Fällen zu). Eingedenk dieser Tatsache ist es sinnvoll, den Anspruch an EpCAM-positive CTC als dominierende Größe in der Entstehung von Metastasen zu relativieren. Ohne Zweifel besteht ein Zusammenhang zwischen deren Auftreten und dem Voranschreiten einer Krebserkrankung doch ebenso die Möglichkeit, dass sie in dem komplexen System der Metastasierung als Surrogat-Parameter fungieren (Joosse, Pantel 2012). Dennoch gibt es Hinweise, dass nicht allein die entdifferenzierte Zelle mit eher mesenchymalem Charakter als Hauptkriterium zur Metastasenbildung beiträgt, sondern dass ein gegenläufiger Prozess der Mesenchymal-epithelialen-Transition (MET) deren Einwanderung in das Gewebe ermöglicht. Vielmehr ist für die Metastasierung eine „wandelbare Zelle“ notwendig, die eher in der Lage ist, solche Transitionen zu durchlaufen als eine Zelle im „steady-state“ (Joosse, Pantel 2012).

Ein weiterer limitierender Faktor, einen proportionalen numerischen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und CTC-Anzahl herzustellen, ist die Erkenntnis, dass „Metastasierung ein sehr ineffizienter Prozess ist (Cameron et al. 2000)“. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass erst 1 aus 40 injizierten Krebszellen eine Mikrometastase und unter 100 dieser wiederum eine in der Lage ist, eine Makrometastase zu bilden (Cameron et al. 2000). Legt man die eingangs formulierte Annahme zu Grunde, dass Primärtumoren, CTCs und die Zellen einer Metastase molekularbiologisch/histologisch hochgradig inhomogen sind (Hou et al. 2011) ergibt sich daraus, dass die reine Menge an CTCs nicht die einzige Einflussgröße ist, um den Grad und Aggressivität der Metastasierung zu beschreiben. Weiterführende Studien mit größeren Studienpopulationen sind nötig, um diese vielversprechenden Fragestellungen vertiefend zu untersuchen.

Obwohl das Vorhandensein zellfreier Nukleinsäuren in menschlichem Blut bereits 1948 beschrieben wurde (Mandel & Métais 1948), gewann das Gebiet der Erforschung zirkulierender freier DNA (cfDNA) bzw. zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA), RNA und Mikro-RNAs (im Folgenden zusammenfassend als zirkulierende Nukleinsäuren bezeichnet) erst in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung. Das ist insbesondere dadurch zu erklären, dass ausreichend sensitive und spezifische Workflows zur Isolation und molekulargenetischen Analytik wie z.Bsp. BEAMing (beads, emulsion, amplification, magnetics) technology and CAPP-seq (cancer personalized profiling by deep sequencing) erst seit Kurzem verfügbar sind (Xu-Welliver & Carbone 2014).

Lohnenswert ist ein Vergleich mit dem Forschungsgebiet der CTCs, da man in beiden Fällen von morphologischem Substrat ausgeht, das Auskunft über den Primärtumor liefern könnte (Liquid Biopsy) und zu dem zahlreiche Studien existieren, die ähnliche Fragestellungen bearbeiten.

Analog zu CTCs werden zirkulierende Nukleinsäuren in größerer Häufigkeit bei Lungenkrebspatienten im Vergleich zu gesunden Probanden isoliert (Sozzi et al. 2003, Paci et al. 2009). Im Widerspruch zu der vorliegenden aber korrespondierend zu anderen Studien zur CTC-Isolierung liegen Arbeiten vor, die einen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und der Menge zirkulierender Nukleinsäuren gezeigt haben (Gautschi et al. 2004, Nygaard et al. 2014). Derzeit wird davon ausgegangen, dass zur Freisetzung von freien Nukleinsäuren ein passiver und ein aktiver Mechanismus existieren: Passiv durch den Zerfall apoptotischer oder nekrotischer Zellen, aktiv als Sekretion aus dem Primärtumor oder aus Mikrometastasen im Sinne disseminierter Tumorzellen. Letztere These lässt sich in gewisser Weise durch die folgende Beobachtung erhärten: Bei mehr als 70 % der metastasierten Melanome kann in zirkulierender DNA die BRAF-Mutation V600E nachgewiesen werden. Das Verfahren eignet sich somit zur Verlaufsbeobachtung der Erkrankung (Shinozaki et al. 2007, Schwarzenbach et al. 2011).

Einer weiteren gängigen Hypothese folgend könnten diese freigesetzten Nukleinsäuren Veränderungen an entfernten Zielzellen bewirken (Ilie et al. 2014). Als dritte Variante wären als Ursprung von cfDNA CTCs denkbar (Ilie et al. 2014). Diese könnten Nukleinsäuren entweder aktiv sezernieren oder durch Zerfall freisetzen. Wenn man beide Substrate folglich als Phänomen desselben Prozesses versteht, würde dies erklären, warum sowohl CTCs als auch freie Nukleinsäuren positiv mit dem Tumorstadium, Gesamtüberleben und Auftreten von Metastasen zumindest in einigen Studien (s.o.) korreliert sind.

Von Tumoren abstammende genomische DNA (gDNA) sind häufig als Mono- oder Oligonukleosomen oder gebunden an die Oberfläche von Blutzellen mittels Proteinen, die spezielle DNA-bindende Eigenschaften aufweisen, zu finden (Laktionov et al. 2004). Unter physiologischen Bedingungen werden diese Komplexe in apoptotischen Partikeln abgelegt oder phagozytiert. Kommt es jedoch bei schnell proliferierenden Tumoren oder nach Chemotherapie zu einem vermehrten Zelluntergang, sind die Mechanismen der apoptotischen Zellbeseitigung überbeansprucht. Dies führt zu einem Anstieg des Nukleosomen-Titers im Blut (Ward et al. 2008).

Der Fokus der freien-Nukleinsäure-Forschung liegt maßgeblich auf dem Vergleich von Mutationen und Onkogenen wie EGFR (Lee et al. 2018, Garcia et al. 2016, Tanaka et al. 2007) oder KRAS (Freidin et al.

2015). Der klinische Nutzen wird in einer vorteilhaften Sensibilität des Tumors auf Targeted therapies gesehen (z.Bsp. XPO1-Inhibitoren bei KRAS-positivem NSCLC [Kim et al., 2014] oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Osimertinib bei EGFR-positiven NSCLC [Garcia 2018]), sollte die entsprechende Mutation festgestellt werden. Das Onkogen KRAS konnte in einer britischen Studie in etwas höherer Menge in zirkulierender DNA als in CTCs, die durch ein Filtersystem gewonnen wurden, bei Lungenkrebspatienten nachgewiesen werden (Freidin et. al. 2015). Ein schlechteres Ansprechen auf Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigte sich bei Patienten mit KRAS-positiven zirkulierenden Nukleinsäuren (und korrelierend dazu KRAS-positivem Primärtumor (Wang et al. 2010). Ebenso ist das durch Methylierung inaktivierte Tumor-Suppressorgen p16 sowohl im Primärtumor als auch im Plasma gefunden worden und mit einem kürzeren Gesamtüberleben und tumorfreiem Intervall assoziiert (Ng et al. 2002).

Wie eingangs erwähnt sind auch zirkulierende RNAs Gegenstand vielversprechender Forschung. Nachdem in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen Telomerase-Reverse-Transkriptase-RNA (TERT-cfRNA) und klinischen Parametern bei Krebspatienten nicht gezeigt werden konnte, (Fleischhacker & Schmidt 2007), konnte bei Miura et al. 2006 ein mit der Tumorgroße, dem Auftreten von Metastasen, Krankheitsrezidiven und Rauchen korrelierter Spiegel an TERT-mRNA im Blut von Lungenkrebspatienten gezeigt werden. In der selben Studie waren ein Anstieg der EGFR-Konzentration mit einem Fortschreiten des Krankheitsstadiums assoziiert und ein Abfall der EGFR- und TERT-Spiegel nach Operation ersichtlich.

Ein entscheidender Nachteil der zirkulierenden Nukleinsäuren liegt darin, dass sie nicht für Untersuchungen wie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder für Immunhistochemie insbesondere zur vergleichsweise einfachen Bestimmung der Onkogene ALK, ROS1 und c-MET in Frage kommen (Ilie et al. 2014). Stattdessen werden, so die Nukleinsäuren zunächst isoliert worden sind, verschiedene PCR-Methoden wie zum Beispiel Digital Droplet PCR (ddPCR) verwendet und auch als geeignete Methode für die Routinediagnostik diskutiert (Lee et al. 2018, Garcia et al. 2014). Die Präanalytik, Weiterverarbeitung und Bewertung der Ergebnisse stellen in vielerlei Hinsicht auf dem Forschungsgebiet der freien Nukleinsäuren wie auch CTCs eine Herausforderung dar. Das Nukleinsäuren-Filtersystem QIAamp (Qiagen, Valencia CA, USA) findet unter anderen weitreichende Anwendung (Garcia et al. 2014).

In einer erst kürzlich erschienenen Studie wurde ein neues System vorgestellt, mit dem sich nach jeweiliger Modifikation CTC und freie Nukleinsäuren nachweisen lassen (Lee 2018). Dabei handelt es sich um Antikörper- bzw. Polyethyleniminbeschichtete magnetische Nanopartikel. In dieser Proof-of-principle-Studie wurden bei 14 bioptisch EGFR-positiven NSCLC-Patienten in allen Fällen die Mutation auch in der zirkulierenden DNA, aber nur in 10/14 Fällen die Mutation in den CTC nachgewiesen. CTC wurden jedoch in allen Fällen isoliert (4-18 Zellen). Ein Vorteil von CTCs in diesem Kontext besteht in der „Isolation reiner, intakter und qualitativ hochwertiger DNA“ (Lee 2018, S. 513). Der hohe Anteil an erfolgreich isolierten Biomarkern und die relativ hohe Übereinstimmungsrate der Ergebnisse bei gleichzeitig eher geringen Kosten legt eine komplementäre Betrachtung der freien Nukleinsäure und CTCs nahe, um die Aussagekraft und folglich therapiebestimmende Entscheidungen zu stärken.

Ein weiterer Nachteil liegt in dem relativ hohen Anteil an zirkulierenden Nukleinsäuren bei Gesunden oder

Patienten mit non-malignen Erkrankungen (z.Bsp. Entzündliche Erkrankungen oder Gewebeverletzungen) (Fleischhacker M & Schmidt B 2007). Sind dem Autoren keine Studien bekannt, die einen direkten Vergleich in dieser Hinsicht mit CTCs herstellen, so gibt es dennoch Ergebnisse, die eine deutlich geringere CTC-Anzahl und -Häufigkeit bei benignen Erkrankungen und Gesunden suggeriert. So fanden zum Beispiel Cristofanilli et al. 2004 bei 145 Gesunden Probanden bzw. bei 200 an benignen Brustkrankungen leidenden Patienten je nur in einem Fall CTCs in geringen Mengen (2-3). Dies könnte darin begründet sein, dass bei einer Vielzahl an Prozessen, bei denen Apoptose und Nekrose stattfindet, längere DNA-Ketten und Fragmente freigesetzt werden (so auch bei nekrotischen oder schnell metabolisierenden Tumoren). Intakte CTCs, die mit den gängigen Methoden (wie im vorliegenden Fall mittels der epithelialen Eigenschaften) detektiert werden, sind hingegen weniger gut als Folge eines diffusen Prozess von Zellzerfall vorzustellen, was die bisherige Studienlage auch zu stützen scheint. Somit liegt es nahe zirkulierende Nukleinsäuren und Nukleosomen neben der Detektion von molekularen Mutationen als Anzahl mehr für den Verlauf einer bekannten Tumorerkrankung als für die Unterscheidung einer malignen von einer benignen Erkrankung einzusetzen.

Das Forschungsgebiet der zirkulierenden Nukleinsäuren ist vielversprechend und zeigt in vielerlei Hinsicht Parallelen zu dem der CTCs. Wie zuvor beschrieben liegen einzelne Studien vor, die durch insbesondere molekulare Diagnostik therapeutisch relevante Informationen liefern. Doch besteht auch hier ein Bedarf, die Vermutungen zahlreicher kleiner in größeren Studien zu stützen. Diese Tendenz scheint sich derzeit abzuzeichnen (Cree et al. 2017), „es ist wahrscheinlich, dass Mutations- und Methylierungsanalysen von ctDNA die Spezifität für die Krebs-Diagnostik verbessern werden (Cree et al. 2017).

Das Vorhandensein von CTC-Clustern zeigte sich in der vorliegenden Arbeit als möglicher ungünstiger prognostischer Faktor. Das ist übereinstimmend mit Ergebnissen vorangegangener Studien (Aceto et al. 2014, Sawabata et al. 2016).

CTC-Cluster von mehr als 4 Zellen fanden sich ausschließlich bei Patienten mit Progressive-Disease. Hier muss postuliert werden, dass Cluster von zirkulierenden Tumorzellen förderlich bzw. ursächlich für die Entstehung von Metastasen oder Ausdruck eines besonders starken Tumorwachstums sind. In diesem Zusammenhang spielt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine Rolle. Nach dieser Theorie verlieren Tumorzellen durch diesen Vorgang ihren epithelialen Charakter und würden weniger epitheliale Proteine wie EpCAM exprimieren (O'Flaherty et al. 2012). Da letzteres eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt, stünde das im Widerspruch zu der Tendenz zur Progressive Disease im Zusammenhang mit CTC-Clustern. Eine Möglichkeit der Erklärung wäre, dass die EMT kein homogener Prozess ist (O'Flaherty et al. 2012) und vielfältige Mutationen in CTCs vorhanden sein könnten, die sowohl die Invasivität als auch den Zellzusammenhalt fördern oder zumindest unbeeinträchtigt lassen. Letztlich ist seit langem bekannt, dass Metastasierung ein komplexer Prozess

ist und für die Entstehung einer Fernmetastase viele Schritte einer Kaskade notwendig sind (Pantel, Brakenhoff 2004). Somit ist der Gedanke naheliegend, dass für das Auftreten von Metastasen und Tumorwachstum eine pleiotrope Tumorzell-Population begünstigend ist. Darüber hinaus konnte durch Maus-Modelle gezeigt werden, dass injizierte Cluster von Tumorzellen ein höheres Potential haben, eine solitäre Metastase zu bilden als singuläre Zellen (Fidler 1970; Liotta et al. 1976).

6 Zusammenfassung

Die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen ist ein vielversprechendes Verfahren, mit dem in Zukunft Aussagen über den Primärtumor, die Tendenz zur Metastasierung und Responsivität von Chemotherapeutika erzielt werden könnten.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Isolation grundsätzlich möglich ist. Hinsichtlich einiger vermuteter Tendenzen (z.Bsp. Einfluss von CTC-Clustern, hohe CTC-Anzahl bei Plattenepithelkarzinomen, Aussagekraft bei Basiswert ≥ 5 CTCs) werden weiterführende Studien benötigt, die diese vertiefenden Fragestellung genauer untersuchen.

Untersuchungen zur molekularen Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten CTCs erbrachte erste Ergebnisse von nachgewiesenen k-ras-Mutationen. Auch hier schließen sich zahlreiche interessante Fragestellungen an, die auf die Differenzierung von Krebs-typischen Mutationen in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Primärtumors und dem Krankheitsverlauf abzielen.

Mit konventionellen Biopsien wären engmaschige Kontrollen zur Kinetik der Befunde eines Lungenkarzinoms nicht möglich. Mit der Sammlung von CTC-Daten begleitend zur Chemotherapie wurden Schritte in eine Richtung gemacht, deren Ziel es ist, Patienten mit der Untersuchung der einfach und schonend gewonnenen zirkulierenden Tumorzellen engmaschig zu untersuchen und dem Ziel der „Liquid Biopsy“ näher zu kommen.

Literatur

- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, Brannigan BW, Kapur R, Stott SL, Shioda T, Ramaswamy S, Ting DT, Lin CP, Toner M, Haber DA, Maheswaran S (2014) Circulating Tumor Cell Clusters are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* 158:1110–1122.
- Aebi S (2016) Onkopedia Leitlinien Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nslc/@@view/html/index.html>.
- Allard WJ, Matera J, Miller MC (2004) Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research*:6897–6904.
- Allen LL, Kleinerman J, Saidel GM (1974) Quantitative Relationships of Intravascular Tumor Cells, Tumor Vessels, and Pulmonary Metastases following Tumor Implantation. *Cancer Research*:997–1004.
- Ashworth, TR 1869: A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumors Were Seen in the Blood after Death. *Australasian Medical Journal*, 14, 146-149
- Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. 2010: Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:261–73.
- Brenner DR, Hung RJ, Tsao M, Shepherd FA, Johnston MR, Narod S, Rubenstein W, McLaughlin JR (2010) Lung Cancer Risk in Never-Smokers: a Population-Based Case-Control Study of Epidemiologic Risk Factors. *BMC cancer* 10:285.
- Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC 2000: Temporal Progression of Metastasis in Lung: Cell Survival, Dormancy, and Location Dependence of Metastatic Inefficiency. *Cancer Research*:2541–2546.
- Chan BA, Hughes BGM 2015: Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future, *Transl Lung Cancer Res*, 4(1):36-54
- Chen Q, Ge F, Cui W, Wang F, Yang Z, Guo Y, Li L, Bremner RM, Lin PP (2013) Lung Cancer Circulating Tumor Cells Isolated by the EpCAM-Independent Enrichment Strategy Correlate with Cytokeratin 19-Derived CYFRA21-1 and Pathological Staging. *Clinica Chimica Acta* 419:57–61.
- Chudak C, Herrmann J, Lesser T (2016) Enumeration and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients using the GILUPI CellCollector. *Journal of Thoracic Oncology* 11:104–105.
- Cree IA, Uttley L, Woods HB, Kikuchi H, Reiman A, Harnan S, Shaw J et al. (2017): The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer: a systematic mapping review, Cree et al. *BMC Cancer* (2017) 17:697 DOI 10.1186/s12885-017-3693-7
- Cristofanilli M, Budd TG, Ellis MJ (2004) Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*:781–791.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA (2011) Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in chest medicine* 32:605–644.
- Doll R & Peto R (1981): The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today, *Journal of the National Cancer Institute* 66/6, 1192-1308.

Driscoll T, Nelson DI, Steenland K, Leigh J, Concha-Barrientos M, Fingerhut M, Pruss-Ustun A (2005) The Global Burden of Disease Due to Occupational Carcinogens. *American journal of industrial medicine* 48:419–431.

Fidler IJ (1970) Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine, *J Natl Cancer Inst.* 45(4):773-82

Fidler IJ (2002) The pathogenesis of cancer metastasis the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature*.

Fleischhacker M, Schmidt B (2007): Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer: a survey: *Biochim. Biophys Acta* 1775,181-232.

Freidin MB, Freydina DV, Leung M, Fernandez AM, Nicholson AG, Lim E: Circulating Tumor DNA Outperforms Circulating Tumor Cells for KRAS Mutation Detection in Thoracic Malignancies, *Clinical Chemistry* 61:10 1299–1304 (2015)

Garcia J, Dusserre E, Cheynet V, Bringuier PP, Couraud S et al (2017): Evaluation of pre-analytical conditions and comparison of the performance of several digital PCR assays for the detection of major EGFR mutations in circulating DNA from non-small cell lung cancers: the CIRCAN_0 study, *Oncotarget* Vol 8 (No. 50) pp: 87980-87996.

Gautschi O, Bigosch C, Huegeli B, et al.: Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy (2004) *J Clin Oncol* 2004;22:4157-64.

Gorges TM, Penkalla N, Schalk T, Joosse SA, Riethdorf S, Tucholski J, Lucke K, Wikman H, Jackson S, Brychta N, Ahsen O von, Schumann C, Krahn T, Pantel K (2016) Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clinical Cancer Research* 22:2197–2206.

Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ 2012: Mesenchymalepithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:469–78.

Herold Ge (Hrsg) (2015) *Innere Medizin 2015*. Herold, Gerd, Köln.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, Priest GC, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall FH, Dive C (2012): Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer, *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* 30 S. 525-532

Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall, Dive C 2011: Circulating Tumor Cells as a Window on Metastasis Biology in Lung Cancer, *The American Journal of Pathology*, Vol. 178, No. 3,

Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, Curry DN, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, Lazarus N, Kuhn P, Bruce RH, Nieva J (2006) High Speed Detection of Circulating Tumor Cells. *Biosensors & bioelectronics* 21:1893–1899.

Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, Selva E, Washetine K, Marquette CH, Hofman P (2014): Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med*;2(11):107

Jin C, McFaul SM, Duffy SP, Deng X, Tavassoli P, Black PC, Ma H (2014) Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments. *The Royal Society of Chemistry* 14:32–44.

Jin ZY, Wu M, Han RQ, Zhang XF, Wang XS, Liu AM, Jin YZ, Lu QY, Kim CH, Mu L, Zhang ZF, Zhao JK 2014: Household Ventilation May Reduce Effects of Indoor Air Pollutants for Prevention of Lung Cancer: A Case-Control Study in a Chinese Population July 2014 | Volume 9, S. 4 PlosOne

Joesse SA, Pantel K (2012): Biologic Challenges in the Detection of Circulating Tumor Cells, *Cancer Research*; 73(1)

Katalinic A (2012) Krebs in Deutschland 2009/2010. <http://www.krebsdaten.de>.

Kim J, McMillan E, Kim HS, Venkateswaran N, Makkar G, Rodriguez-Canales J, Villalobos P, Neggers JE, Mendiratta S, Wei S, Landesman Y, Senapedis W, Baloglu E, Chow CB, Frink RE, Gao B, Roth M, Minna JD, Daelemans D, Wistuba II, Posner BA, Scaglioni PP, White MA (2016): XPO1-dependent nuclear export is a druggable vulnerability in KRAS-mutant lung cancer, S. 114-117, *Nature*

Kim JH, Kim HS, Kim BJ (2017), Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: A metaanalysis and review. *Oncotarget*

Krebs, MG; Sloane R; Priest L; Lancashire L; Hou, JM; Greystoke A; Ward TH; Ferraldeschi R; Hughes A; Clack G; Ranson M; Dive C; Blackhal; Fiona H (2011): Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology*, 12, S. 1556–1563

Laktionov P et al (2004): Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients, *Ann. N.Y. Acad. Science*, 221-227.

Liotta LA, Kleinermann J (1976) The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process; *CANCER RESEARCH* 36, 889-894,

Lee HJ, Choi M, Lim J, Jo M, Han JY, Kim TM, Cho Y: Magnetic Nanowire Networks for Dual-Isolation and Detection of Tumor-Associated Circulating Biomarkers (2018), *Theranostics* 8(2), 505-517.

Lubin JH1, Boice JD Jr, Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, Kusiak RA, Morrison HI, Radford EP, Samet JM (1995 Jun 7) Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *J Natl Cancer Inst* 1995;817–827.

Nguyen-Ngoc T, Bouchaab H, Adjei AA, Peters S (2014) BRAF Alterations as Therapeutic Targets in Non-Small-Cell Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology* (10):1396- 403

Mandair D, Vesely C, Ensell L, Lowe H, Spanswick V, Hartley JA, Caplin ME, Meyer T 2016: A comparison of CellCollector with CellSearch in patients with neuroendocrine tumours, *Society for Endocrinology*

Mandel P & Métails P: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme (1948), *C.R. Acad. Sci Paris* 142, 241-243.

Mazières J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, Besse B, Blons H, Mansuet-Lupo A, Urban T, Moro-Sibilot D, Dansin E, Chouaid C, Wislez M, Diebold J, Felip E, Rouquette I,

Milia JD, Gautschi O. 2013: Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *Journal of Clinical Oncology* (16):1997-2003

Millner LM, Linder MW, Valdes Jr. R (2013) Circulating Tumor Cells: A Review of Present Methods and the Need to Identify Heterogeneous Phenotypes. *Annals of Clinical & Laboratory Science*:295–304.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008): Non-Small Cell Lung Cancer: *Epidemiology*,

Risk Factors, Treatment, and Survivorship, *Mayo Clin Proc.* 2008 May ; 83(5): 584–594.

Mu L, Liu L, Niu RG, Zhao BX, Shi JP, Li YL, Scheider W, Su J, Chang SC, Yu SZ, Zhang ZF, 2013: Indoor Air Pollution and Risk of Lung Cancer among Chinese: Female Non-Smokers, *Cancer Causes Control*, S.5

Ng CS, Zhang J, Wan S, Lee TW, Arifi AA, Mok T, Lo DY, Yim AP (2002): Tumor p16M is a possible marker of advanced stage in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol.* Feb;79(2):101-6.

Noblet P, Cutts JH (1967) Separation of Blood Leukocytes by Ficoll Gradient. *Canadian Veterinary Journal*:110–111.

Ntouroupi TG, Ashraf SQ, McGregor SB, Turney BW, Seppo A, Kim Y, Wang X, Kilpatrick MW, Tsipouras P, Tafas T, Bodmer WF (2008) Detection of Circulating Tumour Cells in Peripheral Blood with an Automated Scanning Fluorescence Microscope. *British Journal of Cancer* 99:789–795.

Nygaard AD, Holdgaard PC, Spindler KL, et al. The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC (2014) *Br J Cancer*;110:363-8.

Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto K, Takuwa T, Kondo N, Hasegawa S (2009): Circulating Tumor Cells in Pulmonary Venous Blood of Primary Lung Cancer Patients, *Ann Thorac Surg* 2009;87:1669–75)

O'Flaherty JD, Gray S, Richard D, Fennell D, O'Leary JJ, Blackhall FH, O'Byrne KJ (2012) Circulating Tumour Cells, Their Role in Metastasis and Their Clinical Utility in Lung Cancer. *Lung Cancer* 76:19–25.

Paci M, Maramotti S, Bellesia E, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. (2009) *Lung Cancer*; 64:92-7.

Pantel K, Brakenhoff RH (2004) Dissecting the Metastatic Cascade. *Nature* 4:448–456.

Pantel K, Deneve E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-

Panabieres C (2012): Circulating Epithelial Cells in Patients with Benign Colon Diseases *Clinical Chemistry* 58:5 936–940

Pak MG, Shin DH, Lee CH, Lee MK (2012): Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer. *World Journal of Surgical Oncology.* 10:53

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 55:74–108.

Phil AJ, Crosbie CB, Shah R, Zhou C, Morris K, Tugwood J, Booton R, Blackhall F, Dive C 2016: Circulating Tumor Cells Detected in the Tumor-Draining Pulmonary Vein Are Associated with Disease Recurrence after Surgical Resection of NSCLC, *Journal of Thoracic Oncology*, Nr. 10 S. 1793-1797

Qian T, Wu X, Le Rhun E, Blonski M, Wittwer B, Taillandier L, Carvalho Bittencourt Md, Faure GC (2015) CellSearch® technology applied to the detection and quantification of tumor cells in CSF of patients with lung cancer leptomeningeal metastasis. *Lung Cancer*:1–6.

Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K (2007) Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical cancer*

research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13:920–928.

Rodenhuis S, Slebos RJC (1992) Clinical Significance of ras Oncogene Activation in Human Lung Cancer. *Cancer Research*:2665–2669.

Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR (2002) Comparison of Two Density Gradient Centrifugation Systems for the Enrichment of Disseminated Tumor Cells in Blood. *Cytometry* 49:150–158.

Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM (1993) Detection and Viability of Tumor Cells in Peripheral Blood Stem Cell Collections From Breast Cancer Patients Using Immunocytochemical and Clonogenic Assay Techniques. *Blood*:2605–2610.

Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Tomasi T, Weber E, Dworacki G, Morgenthaler NG, Jansen H, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz W, Zabel M, Kiechle M, Reuning U, Schmitt M, Lucke K (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. *International journal of oncology* 41:1241–1250.

Sawabata N, Funaki S, Hyakutake T, Shintani Y, Fujiwara A, Okumura M (2016): Perioperative circulating tumor cells in surgical patients with non-small cell lung cancer: does surgical manipulation dislodge cancer cells thus allowing them to pass into the peripheral blood? *Surg Today* 46:1402–1409

Scheffler M, Bos M, Gardizi M, König K, Michels S, Fassunke J, Heydt C, Künstlinger H, Ihle M, Ueckerth F, Albus K, Serke M, Gerigk U, Schulte W, Töpelt K, Nogova L, Zander T, Engel-Riedel W, Stoelben E, Ko Y, Randerath W, Kaminsky B, Panse J, Becker C, Hellmich M, Merkelbach-Bruse S, Heukamp LC, Büttner R, Wolf J 2014, PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies, *Oncotarget* 6, 1315-1326.

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients, *Nature Reviews Cancer AOP*, published online 12 May 2011; doi:10.1038/nrc3066

Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, Amersi F, Kuo C, Kim J, Wang HJ, Hoon DS (2007): Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 13, 2068–2074

Simmons CP, Koinis F, Fallon MT, Fearon KC, Bowden J, Solheim TS, Gronberg BH, McMillan DC, Gioulbasanis I, Laird BJ (2015) Prognosis in Advanced Lung Cancer- A Prospective Study Examining Key Clinicopathological Factors. *Lung Cancer* 88:304–309.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448(7153):561-6

Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. (2003): Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer, *J Clin Oncol.*; 21(21):3902-8. Epub 2003 Sep 24.

Swennenhuis JF, Joke Reumers, Kim Thys, Aerssens, Jeroen, Terstappen LW (2013) Efficiency of Whole Genome Amplification of Single Circulating Tumor Cells Enriched by CellSearch and sorted by FACS. *Genome medicine* 5:1–11.

Talasaz AH, Powell AA, Huber DE, Berbee JG, Roh K, Yu W, Xiao W, Davis MM, Pease RF, Mindrinos MN, Jeffrey SS, Davis RW (2009) Isolating Highly Enriched Populations of Circulating Epithelial Cells and

Other Rare Cells from Blood Using a Magnetic Sweeper Device. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3970–3975.

Talmadge JE, Wolman SR, Fidler IJ (1982) Evidence for the Clonal Origin of Spontaneous Metastases. *Science*:361–363.

Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Hagiwara K et al.: Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-smallcell lung cancers (2007) *Cancer Sci*, vol. 98, no. 2, 246–252

Theil G, Fischer K, Weber E, Medek R, Hoda R, Lucke K, Fornara P (2016) The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes - A Proof-of-Concept Study. *PLoS one* 11:1–14.

Tong X, Yang L, Lang JC, Zborowski M, Chalmers JJ (2007) Application of Immunomagnetic Cell Enrichment in Combination with RT-PCR for the Detection of Rare Circulating Head and Neck tumor Cells in Human >Peripheral Blood. *Clinical Cytometry* 72:310–323.

Vansteenkiste J, Ruyscher D de, Eberhardt WEE, Lim E, Senan S, Felip E, Peters S (2013) Early and Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Annals of Oncology*:89–98.

Vaughan, C; Singh, S; Grossman, SR.; Windle, B; Deb, SP; Deb, S (2017) Gain-of-function p53 activates multiple signaling pathways to induce oncogenicity in lung cancer cells. *Molecular Oncology* 10: 1-18.

Vona G, Sabile A, Louha M (2000) Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells; A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells. *American Journal of Pathology*:57–63.

Wang S, An T, Wang J, Zhao J, Wang ZJ, Zhuo ML, Bai H, Yang L, Wu MN et al (2010): Potential Clinical Significance of a Plasma-Based KRAS Mutation Analysis in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, *Clinical Cancer Research* 10.1158/1078

Ward TH et al (2008): Biomarkers of apoptosis. *Br. Can Journal* 99, 841-846.

Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S (2004) Frequent EpCam Protein Expression in Human Carcinomas. *Human Pathology* 35:122–128.

Wilkerson MD, Schallheim JM, Hayes DN, Roberts PJ, Bastien RRL, Mullins M, Yin X, Miller CR, Thorne LB, Geiersbach KB, Muldrew KL, Funkhouser WK, Fan C, Hayward MC, Bayer S, Perou CM, Bernard PS (2013) Prediction of lung cancer histological types by RT-qPCR gene expression in FFPE specimens. *The Journal of Molecular Diagnostics* 15:485–497.

Xu YH, Zhou J, Pan XF (2015) Detecting circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genetics and Molecular Research* 14:10352–10358.

Xu-Welliver M & Carbone DP (2017) Blood-based biomarkers in lung cancer: prognosis and treatment decisions, *Transl Lung Cancer Res* 2017;6(6):708-712

Yanagita M, Redig AJ, Paweletz CP, Dahlberg SE, O'Connell A, Feeney N, Taibi M, Boucher D, Oxnard GR, Johnson BE, Costa DB, Jackman DM, Jeanne PA (2016): A Prospective Evaluation of Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Erlotinib on a Phase II Trial, *Clin Cancer Research*, S. 6010-6021.

Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor/Direktorin: Prof. Dr. med. Patrick Michl

Thesen der Dissertation

In-vivo-Isolation und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) bei Lungenkrebspatienten mittels des antikörperbeschichteten Drahtes „CANCER01“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.),

für das Fachgebiet
Pneumologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Clemens Oerding

geboren am 16.01.1987 in Halle (Saale)

- 1. Die Anwendung des funktionalisierten Drahtes „Cancer01“ ist ein Verfahren, mit dem in einer Vielzahl der Fälle zirkulierende Tumorzellen bei Lungenkrebspatienten detektiert werden können.**

- 2. An Hand der Ergebnisse lassen sich wertvolle Annahmen über die Kinetik und das Verhalten zirkulierender Tumorzellen begleitend zu einer Chemotherapie ableiten**

- 3. Das Auftreten von CTC-Clustern stellt ein ungünstiges prognostisches Kriterium für den Krankheitsverlauf dar.**

- 4. Für das Plattenepithelkarzinom gibt es Hinweise, dass die Anzahl der detektierten CTCs besonders hoch ist und gleichzeitig eine höhere Responsivität auf Chemotherapie (in Form eines Abfalls) vorliegt. Somit könnte das SCC mit der in-vivo-Anwendung besonders gut zu beobachten sein.**

- 5. Die isolierten Zellen könnten sich für molekularbiologische Untersuchungen eignen (Suche nach Mutationen, Tumormarkern etc.)**

- 6. In weiterführenden Studien könnte ein anzunehmender Zusammenhang zwischen zirkulierenden Tumorzellen und zirkulierenden Nukleinsäuren näher betrachtet bzw. vertieft werden.**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. / I declare that I have not completed or initiated a doctorate procedure at any other university.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben / Declaration concerning the truth of information given

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben. / I declare that all information given is accurate and complete. The thesis has not been used previously at this or any other university in order to achieve an academic degree.

(3) Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

I declare under oath that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I met all regulations of good scientific practice and I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Clemens Oerding

Datum.....