

► Zellkonzentration

Tumorzell-Analyse mit kombinierter Magnetanreicherung, Laser-Scanning-Zytometrie und visueller Kontrolle

KATHARINA PACHMANN^{1,2}, SVEN LYCHATZ³, GRIT OBLONCZEK³, BABETTE WILLEN²

¹KLINIK FÜR INNERE MEDIZIN II DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA, ²LABOR FÜR SPEZIELLE IMMUNHÄMATOLOGIE UND GENDIAGNOSTIK, BAYREUTH, UND ³LABSOFT DIAGNOSTICS AG, HALLE

Solide Tumoren, wie Bronchial- und Kolonkarzinome und bei Frauen das Mammakarzinom, sind nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in den Ländern der westlichen Welt. Initialtherapie der Wahl ist die chirurgische Entfernung des Primärtumors, um möglichst viele Tumorzellen aus dem Körper zu entfernen. In der Praxis kann damit jedoch nur selten eine Heilung erzielt werden. Letztlich lebensbedrohlich sind hämatogene Absiedelungen in verschiedene Organe, die schließ-

lich zum Versagen dieser Organe und zum Tod führen. Ausgang für diese Metastasen sind disseminierte Tumorzellen, die aus dem Tumor ausgeschwemmt worden sind.

Deswegen wurde – in erster Linie beim Mammakarzinom – die adjuvante Chemotherapie etabliert. Ziel dieser Chemotherapie ist es, bereits zirkulierende Tumorzellen zu eliminieren, bevor sie sich als Metastasen absiedeln können. Jedoch gab es bislang kein Verfahren, um das Ansprechen der zirkulierenden Tumorzellen auf diese Therapie direkt zu überprüfen. Nur eine verringerte Rezidivrate, die beim Mammakarzinom erst nach mehreren Jahren objektivierbar ist, konnte bisher als statistisches Maß für den Therapieerfolg herangezogen werden. Für die einzelne Patientin gibt es keine Möglichkeit zeitnah zu kontrollieren, ob bei ihr die entsprechende Therapie erfolgreich eingesetzt wird.

Über die Zahl und die Eigenschaften zirkulierender Tumorzellen ist bisher sehr wenig bekannt. Schon vor über 100 Jahren ging man davon aus, daß solche Zellen vorhanden sein müßten, durch ihre geringe Zahl entzogen sie sich aber einem sicheren Nachweis.

Fortschritte wurden durch den Einsatz immunologischer Nachweisverfahren erzielt¹. So konnte in den letzten Jahren vor allem gezeigt werden, daß eine Korrelation besteht zwischen den im Knochenmark nachgewiesenen Zellen mit epithelialen Oberflächenmarkern und der Metastasierungsrate². Diese Methoden sind aber sehr zeitaufwendig, da große Zahlen normaler Blut- oder Knochenmarkszellen gescreent werden müssen, um einzelne nicht dem Blutkompartiment zugehörige Zellen aufzufinden. Ein weiterer Ansatz, zirkulierende Tumorzellen nachzuweisen, ist die Anwendung der Durchflußzytometrie. Diese Methode erlaubt es, in kürzester Zeit zehntausende von Zellen durchzumessen. Die Sensitivität der Durchflußzytometrie liegt aber ohne zusätzliche Sortierschritte im Bereich von einer Tumorzelle pro 1.000 normalen Blutzellen.

Durch den Einsatz von immunmagnetischen Anreicherungsverfahren und Immunmikrofluorimetrie konnte die Nachweisempfindlichkeit für im Blut zirkulierende epitheliale Zellen erhöht und dahingehend weiterentwickelt werden, daß ein qualitativer und

Tabelle 1: Vorteile der Methode

Anreicherung der gewünschten Zellen bis zur Nachweisbarkeit
Minimaler Zellverlust
nur lebende Zellen gehen in die Analyse ein
Auswertung automatisch (beobachterunabhängig)
quantitativ (Zahl und Intensität werden bestimmt)
Relokalisation: Visualisierung, Reanalyse

quantitativer Nachweis tumorverdächtiger Zellen möglich wird³.

Die tumorverdächtigen Zellen werden automatisch und vom Untersuchenden unabhängig erfaßt. Sie können einzeln wiederaufgesucht, visuell verifiziert und, falls erforderlich, mit weiteren Analyseverfahren bearbeitet werden.

Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen

Die Anreicherung der disseminierten Tumorzellen – bei soliden Tumoren meist Zellen epithelialen Ursprungs – erfolgte über funktionalisierte Magnet-Partikel (Labsoft Diagnostics AG Halle) mit Hilfe von Antikörpern, die gegen epitheliale Antigene (vor allem gegen ein Epitop des EpCAM-Moleküls auf der Zelloberfläche) gerichtet sind.

Für die Untersuchung werden 20 ml antikoaguliertes Blut benötigt (Abb. 1), bei der Untersuchung des Knochenmarkes etwa 5 ml Aspirat in Ringer-Lösung verdünnt. Alle Proben sollten spätestens 36 Stunden nach Entnahme analysiert werden. Die Erythrozyten wurden lysiert und die weißen Blutzellen einschließlich der Tumorzellen durch Zentrifugieren sedimentiert. Die Viabilität der Zellen zu diesem Zeitpunkt lag zwischen 95 und 100%. Die Zellsuspension wurde mit den entsprechenden Magnetpartikeln und einem spezifischen fluorchrommarkierten Antikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen, an die sich die Magnetpartikel gebunden hatten, mit einem Magneten an die Wand des Röhrchens gezogen, so daß die übrige von epithelialen Zellen depletierte Zellsuspension entweder abgegossen oder abpipettiert werden kann (Abb. 2). Um möglichst wenige spezifisch markierte Zellen zu verlieren, wurde der Anreicherungsprozess nur einmal durchgeführt. Eine wiederholte Anreicherung würde zwar zu einer höheren Reinheit, zugleich aber auch zu Zellverlust führen.

Nachweis der tumorverdächtigen Zellen

Der Nachweis der Zellen erfolgte über den fluorchrommarkierten Antikörper an

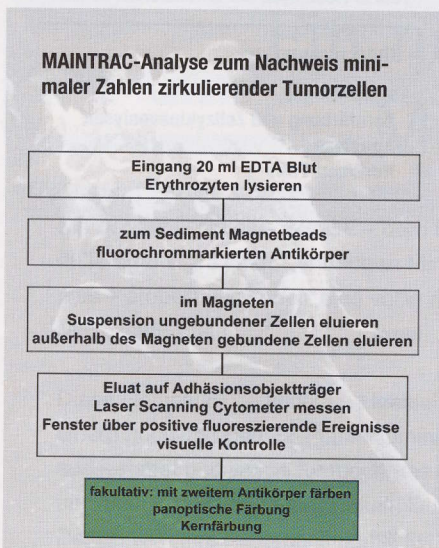


Abb. 1: Flußdiagramm zur Anreicherung und Analyse zirkulierender Epithelantigen-positiver Zellen



Abb. 2: Schematische Darstellung der magnetischen Anreicherung

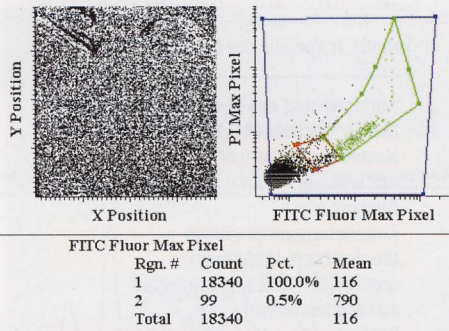


Abb. 3: A. Verteilung der Zellen nach Anreicherung und Aufbringen, links: mit den x- und y-Koordinaten auf einem Objektträger, rechts: deren maximale Fluoreszenzintensität in der Grünfluoreszenz. Das blaue Fenster umfaßt alle Zellen (Region 1), das rote Fenster Zellen mit intermediärer Fluoreszenz, die nicht sichtbar ist, und das grüne Fenster die eindeutig positiven Zellen (Region 2).

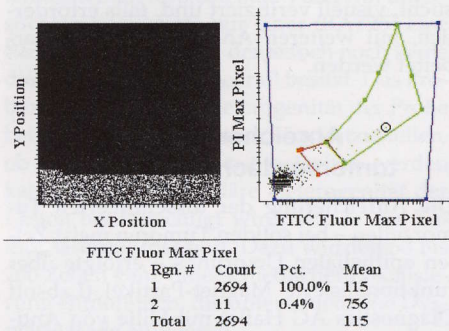


Abb. 3 B. Relokalisierung einzelner Zellen. Der Scanningtisch fährt nacheinander die einzelnen Ereignisse im gewählten Fenster an. Die Position jeder Zelle auf der x- und y-Achse wird im linken Diagramm angezeigt, die Intensität jeder Zelle in der Punktwolke wird durch einen Kreis angegeben.

nichtfixierten, lebenden Zellen. Dies vermindert unspezifische Bindungen, wie sie beim Nachweis intrazellulärer Antigene nicht selten sind, und stellt gleichzeitig sicher, daß nur die relevanten, lebenden Zellen in die Analyse einbezogen werden. Die spezifisch gesuchten Zellen sind nun zwar höher konzentriert, jedoch immer noch in nur in einem Anteil von 1 bis 0,1% vorhanden. Bei diesen niedrigen Zahlen ist es wichtig, daß jede einzelne Zelle verifiziert wird. Dies geschieht durch automatisierte Auswertung im Laser-Scanning-Cytometer (LSC®) (CompuCyte, Cambridge, Mass.). Die Vorteile dieses Vor-

gehens sind in Tabelle 1 aufgelistet. Ein Laserstrahl tastet das Präparat ab und erkennt über Vorwärtsstreulicht die Zellen. Über jede Zelle wird punktförmig über Areale von 0,5µm die Intensität gemessen und als Pixel gespeichert (ca. 200 Messungen pro Zelle). Beispielfhaft sind die Ergebnisse einer solchen Auswertung in Abbildung 3a dargestellt. Jeder weiße Punkt im x-y-Koordinatensystem repräsentiert eine Zelle. Die Intensitätsverteilung ist in der rechten Punktwolke dargestellt. Die Intensitätswerte können als maximale Intensität oder als Integral der über die Zelle gemessenen Intensität aufgelistet werden. Dies ermöglicht eine vom Untersucher unabhängige objektive Auswertung. Jede Zelle mit einem bestimmten Intensitätswert (beispielsweise die Zellen im grünen Fenster) kann nun wiederaufgesucht werden, so daß die Spezifität der Markierung und die Morphologie der Zelle beurteilt werden können. In Abbildung 3b ist gezeigt, wie der Scanningtisch des LSC® bis zu der Stelle vorrückt, an der die eingekreiste Zelle im Präparat liegt. Die in Abbildung 3b eingekreiste Zelle ist in Abbildung 4 rechts einmal in der Fluoreszenzfärbung mit der typischen kappenförmigen Markierung abgebildet. Das Präparat kann anschließend mit einer panoptischen Färbung nachgefärbt werden und dieselbe Zelle wiederaufgesucht werden (Abb. 4 links).

Klinischer Einsatz der Methode

Längsschnittanalysen der Zahlen zirkulierender Epithelantigen-positiver Zellen bei Brustkrebspatientinnen haben gezeigt, daß damit unter adjuvanter Chemotherapie sehr gut nachvollzogen werden kann, wie diese Zellen mit einer Reduktion um zum Teil mehrere Dekaden auf die Chemotherapie ansprechen (Abb. 5). Bei einem nachgewiesenen soliden Tumor ist davon auszugehen, daß die Mehrzahl der zirkulierenden Epithelantigen-positiven Zellen vom Tumor herrühren. Damit scheint sich dieses Vorgehen für eine zeitnahe Kontrolle des Therapieansprechens zu eignen.

Die Anreicherung und Reanalyse tumorverdächtiger Zellen eröffnet neben der morphologischen Begutachtung weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung dieser Zellen, von denen die bei den Autoren bereits etablierten in Tabelle 2 aufgelistet sind:

1. So können nach Färbung der Kerne mit einem fluoreszierenden Kernfarbstoff (z.B. Propidiumiodid) Zellzyklusanalysen selektiv an den Epithelantigen-positiven Zellen durchgeführt werden und damit das Wachstumsverhalten dieser Zellen analysiert werden.
2. Durch die Chemotherapie kommt es zur Induktion von Apoptosewegen in den Zellen. Es kann der Anteil der in Apoptose befindlichen Zellen an den zirkulierenden Zellen bestimmt werden und damit bereits

vor dem kompletten Absterben und Abräumen der tumorverdächtigen Zellen der Erfolg der Therapie *in vivo* frühzeitig festgestellt werden.

3. Die körpereigene Immunantwort auf die Tumorzellen kann in zweierlei Hinsicht analysiert werden. Einerseits kann über die Immunglobulinbeladung der Tumorzellen die Effektivität und Stärke der B-Zellantwort getestet werden. Des weiteren sind bei den Patienten nicht selten Tumorzellen mit rosettenförmig adhärierenden T-Zellen zu finden. Inwieweit dies prognostisch von Bedeutung ist, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.
4. Für die Planung des therapeutischen Vorgehens ist der Nachweis der Her2/neu-Überexpression in den Tumorzellen von zunehmender Bedeutung. Diese wird bisher noch am ursprünglichen Tumorgewebe untersucht. Zielzellen der Therapie mit dem Antikörper Herceptin werden aber vor allem die zirkulierenden Tumorzellen sein. Es kann bereits routinemäßig die Am-

Tab. 2: Reanalyse der lokalisierten Zellen

Untersuchung von:

Morphologie

Kernfärbung und Zellzyklusanalysen

Apoptose

Her2/neu-FISH

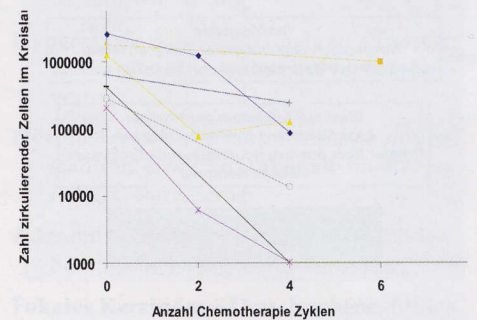


Abb. 5: Reduktion der Zahl zirkulierender tumorverdächtiger Zellen bei sieben Patientinnen unter adjuvanter Chemotherapie zum Teil um mehr als zwei Dekaden.

plifikation des Her2/neu-Gens, das verantwortlich für die Überexpression ist, an den angereicherten Epithelantigen-positiven Zellen durch FISH-Analyse (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) nachgewiesen werden. Ein Beispiel für eine solche Analyse ist in Abbildung 6 dargestellt. Links ist mit Grünfilter die kappenförmige Grünfluoreszenz für das Epithelantigen darge-

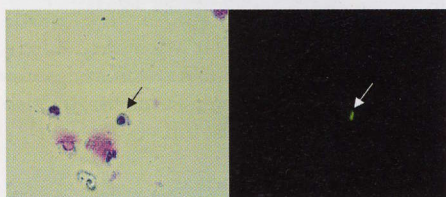


Abb. 4: Morphologie (links) und im Fluoreszenzbild (rechts) die kappenförmige Oberflächenmarkierung der in der Abbildung 3 angefahrenen Zelle

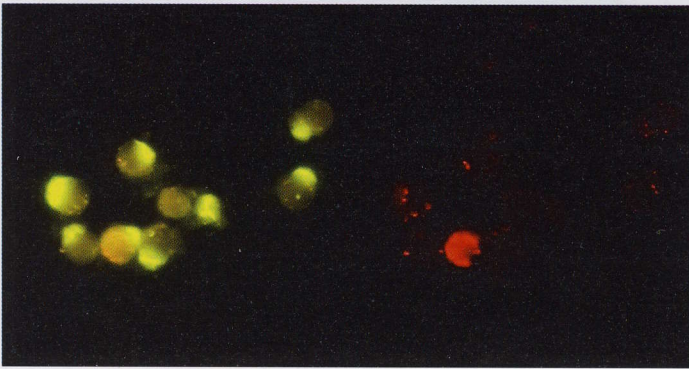


Abb. 6: Eine Gruppe von Epithelantigen-positiven Zellen mit sehr starker kappenförmiger Fluoreszenzmarkierung. Dieselbe Zellgruppe nach Hybridisierung mit einer rotfluoreszierenden Sonde für das Her2/neu-Gen zeigt pro Zelle zwischen 3 und über 20 Signale als Zeichen einer Amplifikation des Her2/neu-Gens.

stellt, dieselben Zellen zeigen mit Rotfilter (rechts) zwischen drei und mehr als zwanzig FISH-Signale für das Her2/neu-Gen und damit eine Überexpression in fast allen diesen Zellen.

Ausblick

Erst mit einer Anreicherung seltener Zellen in den Nachweisbereich hinein und einem anschließenden quantitativen Nachweisverfahren kann die biologische Relevanz unterschiedlicher Mengen zirkulierender Tumorzellen differenziert analysiert werden. Die quantitative Analyse erlaubt es, festzustellen, ob sich die Zahl zirkulierender Tumorzellen unter dem Einsatz von Zytostatika ändert und ermöglicht damit erstmals eine zeitnahe Erfolgskontrolle der Chemotherapie in der adjuvanten Situation, in der es sonst keine andere Möglichkeit gibt, das Therapieansprechen zu kontrollieren. Im Rahmen der neoadjuvanten Chemotherapie kann überprüft werden, ob die zirkulierenden Zellen im gleichen Umfang wie der Primärtumor ansprechen. Damit bietet sich diese Methode als Werkzeug für die Überwachung bei adjuvanten und neoadjuvanten Chemotherapiestudien an. In Zukunft soll diese Analyse dem Patienten unnötige oder in-effektive Chemotherapien ersparen helfen.

Zusätzlich können die zirkulierenden Tumorzellen selektiv auf ihr Wachstumsverhalten mit Hilfe von Zellzyklusanalysen untersucht werden, ihre Absterberate

ist mit Apoptoseanalysen und ihre Überexpression von Wachstums genen mit Hilfe von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung analysierbar. Dies erlaubt es, Tumorzellsubpopulationen zu analysieren, die unterschiedlich auf die Cytostase ansprechen, und damit frühzeitig eine klonale Selektion resistenter Zellen zu erkennen und dieser therapeutisch gegenzusteuern.

Danksagung

Für die kompetente technische Hilfe sei Frau Dana Hüttig besonderer Dank gesagt

Literatur

1. Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother* 1994; 3:315-322
2. Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K. Tumour antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer* 1999; 84:1-5
3. Pachmann K, Heiß P, Demel U, Tilz G: Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using Laser Scanning Cytometer (LSC®). *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:811-7

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Katharina Pachmann
Abteilung für experimentelle
Hämatologie und Onkologie
Klinik für Innere Medizin II
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Erlanger Allee 101, 07747 Jena
eMail: katharina.pachmann@med.uni-jena.de

1. Firmenanschrift/Ansprechpartner	BECKMAN COULTER GMBH Life Science Research Siemensstr. 1, 85716 Unterschleißheim Tel : 089-35870-0, Fax: 089-35870-269 eMail: biosresearch.de@beckman.com	BECKMAN COULTER GMBH Life Science Research Siemensstr. 1, 85716 Unterschleißheim Tel : 089-35870-0, Fax: 089-35870-269 eMail: biosresearch.de@beckman.com
2. Gerätebezeichnung/Serie	Tisch-Ultrazentrifuge Typ Optima Max	High-Performance-Zentrifuge Typ Avanti J-20XPI
3. Abmessungen des Systems / Gewicht (Breite x Tiefe x Höhe, cm) / (kg)	73,7cm x 58,4cm x 58,4cm / 98kg	71,1 cm x 87,6cm x 86,5cm / 264kg
4. Einsatzgebiet (Produktion/Forschung)	Tisch-Ultrazentrifuge für biomedizinische Forschung, Routinediagnostik und Produktion im kleinen Maßstab	vielseitige und großvolumige Hochleistungs-Standzentrifuge
5. Kurzbeschreibung des Produktes/Systems und seiner Komponenten	Tisch-Ultrazentrifuge, größter Volumenbereich für Festwinkel-, Near-Vertical- und Ausschwingrotoren, minimierte Trennzeit, maximierte Auflösung, Rotor-Sicherheitssystem, selbstgenerierendes Vakuumsystem	gekühlte Hochleistungs-Standzentrifuge mit verkürzter Beschleunigungs-/Verzögerungszeit für maximalen Probendurchsatz, Einsatzmöglichkeit auch für großvolumige Rotoren und DNA-Rotoren
6. Kühlung/Bereich (°C)	Thermo-elektrisches Kühlsystem ohne Kühlmittel, 0° C - 40° C	-10 °C - 40 °C
7. Drehzahl (rpm) / relative Zentrifugalkraft (g) / k-Faktor	130.000 rpm, 1.019.000 x g, minimaler k-Faktor ist k=7	26.000 rpm, 82.000 x g, minimaler k-Faktor ist k=91
8. Rotoren	insg. 16 verschiedene Festwinkel-, Vertikal-, Near-Vertical- und Ausschwingrotoren	insg. 30 verschiedene Festwinkel-, Ausschwing-, Durchfluß- und Elutriationsrotoren
8.1 Rotortyp(en)	große Anzahl verschiedener Materialien und Adapter verfügbar	große Anzahl verschiedener Materialien und Adapter verfügbar
8.2 Einsätze (Zahl/Vol.)	Festwinkelrotoren von 0,2ml bis 64ml, Ausschwingrotoren von 0,175ml-20ml, Near-Vertical-Rotoren 1,2ml bis 64ml	Rotoren von 1,5ml bis 6 Liter
8.3 Beladung (mlh/max)	10 Anwender-Programme plus 21 Beschleunigungs-/ Verzögerungsprogramme, optional Steuerung über RS-232	30 Anwender-Programme plus 25 Beschleunigungs / Verzögerungsprogramme, Anzahl beliebig erweiterbar durch Steuerung durch PC-Software
9. Programmsteuerung für ...	Information auf Anfrage	GMP/GLP-Software optional erhältlich
10. Datendokumentation	Wärmeabgabe < 0,6kW/Stunde, 220V-Anschluß	Wärmeabgabe < 2kW/Stunde, 220V und 380-Anschluß verfügbar
11. Technische Daten	erste (und einzige!) Zentrifuge mit mehr als 1 Million x g, 10 Jahre Garantie auf Antrieb, wartungsreites Vakuumsystem, Rotor-Sicherheitssystem	Friction-Reduction-System FRS zur Minimierung der Wärmeabgabe, automatische Rotorerkennung, Rotor-Sicherheitsüberprüfung, patentierter Antrieb mit großem Drehmoment, DNA-Rotoren verfügbar
12. Extras/Besonderheiten	auf Anfrage	auf Anfrage
13. Preis (für eine typische Konfiguration)		