

Aus der Klinik für Innere Medizin II - Gastroenterologie und Endokrinologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Leitung: Univ.-Prof. Dr. Frank Lammert

**Zirkulierende tumorassoziierte Mikropartikel: Ein möglicher neuer
Ansatz in der Diagnose und Therapieüberwachung des Kolorektalen
Karzinoms und anderer epithelialer Neoplasien**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Clara Müller

geb. am: 22.05.1993 in Köln

Für meine Familie

„Mühsam nährt sich das Eichhörnchen“

Dr. Miroslaw Kornek

Erstgutachter/in: Junior Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Veronika Lukacs-Kornek

Zweitgutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Abstract.....	2
2. Einleitung.....	4
2.1 Malignome gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen.....	4
2.1.1 Das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom.....	5
2.1.2 Das Kolorektale Karzinom.....	7
2.1.3 Das Pankreaskarzinom.....	9
2.2 Diagnostische Verfahren zur Früherkennung des NSCLC, des CrC und des PaCa.....	11
2.2.1 Verfahren zur Früherkennung des Lungenkarzinoms.....	11
2.2.2 Verfahren zur Früherkennung des Kolorektalen Karzinoms.....	12
2.2.3 Verfahren zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms.....	12
2.3 Extrazelluläre Vesikel und ihr Stand in der Forschung.....	13
2.3.1 Stand der Mikropartikel in der Tumorforschung.....	15
2.4 Potenzielle Marker für die Forschung mit tumorassoziierten Mikropartikeln.....	16
2.5 Ziele der Arbeit.....	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Gewinnung humaner Serumproben.....	19
3.1.1 Untersuchungskollektiv.....	19
3.1.2 Vorbereitung der humanen Serumproben.....	19
3.2 Die Isolierung von zellabstammenden Mikropartikeln aus humanem Serum... ..	21
3.2.1 Dialyse des humanen Serums.....	21
3.2.2 Isolierung der zellabstammenden Mikropartikel mittels Differential-zentrifugation.....	21
3.3 Anfärbung der Mikropartikel mittels Immunfluoreszenz.....	22
3.3.1 Die Inkubation der Mikropartikel mit Fc-Block zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen.....	22
3.3.2 Färbung der Mikropartikel mit dem Oberflächenmarker AnnexinV.....	23
3.3.3 Immunhistochemische Anfärbung der Mikropartikel mit tumorspezifischen Antikörpern.....	23
3.3.4 Charakterisierung der Mikropartikel mittels Durchflusszytometrie... ..	25

3.4 Analyse der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten.....	25
4. Ergebnisse.....	27
4.1. Die Detektion von tumorassoziierten Mikropartikeln mithilfe tumorspezifischer Antikörper.....	27
4.1.1 Vergleich der Ergebnis-Auswertung pro 1000 AnnexinV positiver MP mit der Ergebnis-Auswertung pro 1 ml Serum.....	37
4.2 Der Einfluss des Geschlechts auf die Expression tumorassoziiertes Mikropartikel im Serum von Patienten mit CrC, NSCLC, PaCa und Struma.....	40
4.3. Das Verhalten der tumorassoziierten Mikropartikel bei Patienten mit CrC nach chirurgischer Resektion.....	45
4.4. Die Korrelation zwischen der Anzahl tumorassoziiertes Mikropartikel im Serum und dem Tumolvolumen von Patienten mit CrC und NSCLC.....	47
4.5. CEA und CA19-9 im Vergleich mit den tumorassoziierten Mikropartikeln als diagnostische Tumormarker für CrC und NSCLC.....	52
4.6. Der Unterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Phänotypen des CRC.....	55
5. Diskussion.....	58
5.1 Die Isolierung von taMP aus humanem Serum und die Detektion mittels Durchflusszytometrie stellen ein mögliches neues Verfahren zur Früherkennung von Tumorerkrankungen dar.....	58
5.1.1 AnnexinV ⁺ EpCAM ⁺ und AnnexinV ⁺ EpCAM ⁺ CD147 ⁺ taMP sind potente Pan-Tumormarker für das CrC, das NSCLC und das PaCa.....	59
5.2 Klinisches Potenzial der Messung tumorassoziiertes Mikropartikel.....	62
5.2.1 Tumorassoziierte Mikropartikel in der Therapieüberwachung und Rezidivfrüherkennung.....	62
5.2.2 Tumorassoziierte Mikropartikel in der Diagnostik und Vorsorge von Tumorerkrankungen.....	65
5.3 Potenzial und Grenzen des Verfahrens.....	69
6. Literaturverzeichnis.....	73
7. Abkürzungsverzeichnis.....	89
8. Danksagung.....	91

1. Zusammenfassung

Malignome gehören mit ungefähr 8 Millionen Todesfällen pro Jahr zu den häufigsten natürlichen Todesursachen weltweit. Viele Tumorerkrankungen, wie das Pankreaskarzinom und das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, zeigen erst spät Symptome und werden deswegen oft nicht rechtzeitig erkannt. Eine frühe Diagnostik ist jedoch ausschlaggebend für den Erfolg der Therapie und das Überleben der Patienten. Effiziente diagnostische Verfahren zur Vorsorge und Früherkennung von malignen Neoplasien werden daher dringend gebraucht. Einen neuen Ansatz stellt die Isolation tumorassoziierter Mikropartikel (taMP) dar, welcher in dieser Studie vorgestellt wird. Mikropartikel sind von der Zellmembran abgeschnürte Vesikel, die während Stress der Zelle, Apoptose oder bei einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle entstehen und in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Sie haben einen Durchmesser von ca. 50-1000 nm und können, da sie im Blut zirkulieren, aus humanen Serumproben isoliert und mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenproteine definiert und untersucht werden.

Die Isolierung der taMP aus dem Serum von Patienten mit Kolorektalem Karzinom (CrC, n=55), Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC, n=43) und Pankreaskarzinom (PaCa, n=9) sowie von Patienten mit Struma (n=40) als negative Kontrolle und gesunden Kontrollpersonen (n=55) erfolgte mittels Zentrifugation, gefolgt von der Anfärbung der Mikropartikel mit tumorassozierten Antikörpern.

Auf diesem Wege konnte gezeigt werden, dass AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP und AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP im Serum der Tumorpatienten erhöht sind im Vergleich zu gesunden Probanden. Die diagnostische Leistung wird durch die AUROC-Werte unterstützt, die für die Messung der AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP von 0,7965 (NSCLC), über 0,8059 (CrC), bis 0,8675 (PaCa) reichen. Die Kombination der Antikörper EpCAM und CD147 kann zudem erfolgreich die Tumorpatienten von Patienten mit anderen Erkrankungen, in diesem Fall Struma, abgrenzen, und mit AUROC-Werten von 0,8672 (NSCLC), 0,8628 (CrC) und 0,9111 (PaCa) noch bessere diagnostische Akkuratessse vorweisen. Weiterführende Untersuchungen zeigen, dass AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP mit der Tumorlast der Patienten mit CrC korrelieren ($r=0.7461$) und dass die Anzahl der EpCAM⁺ taMP im Serum von Patienten mit CrC nach einer Resektion des Tumors absinkt ($p=0,0052$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Isolierung AnnexinV⁺EpCAM⁺ und AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP aus humanem Serum sich als neues, minimal invasives und kostengünstiges diagnostisches Mittel in der Vorsorge, Diagnose und eventuell der Therapieüberwachung von malignen Tumoren durchsetzen könnte.

1.1 Abstract

Circulating tumor-associated microparticles: a new approach in diagnosis and therapy monitoring of the colorectal carcinoma and other epithelial neoplasia

Cancer is one of the major causes of death in the world with approximately 8 million cancer-related deaths per year. Many cancer entities, such as non-small cell lung cancer or carcinomas of the pancreas, are often first diagnosed at a late stage. This is because the patients do not show typical symptoms in the early stages. However early diagnosis is crucial for successful treatment and survival. Hence there is an urgent need for diagnostic tools that can detect cancer at an early stage.

This study presents tumor-associated microparticles (taMP) as a new approach for early cancer diagnosis. Microparticles are cell derived extracellular vesicles that are formed by the outward budding of the cell membrane during stress, early apoptosis or Ca²⁺ increase in the cell. They are 50-1000 nm in diameter and released into the extracellular space. Therefore they can be isolated from human serum samples and characterised based on their surface proteins by flow cytometry.

The isolation of the taMP from the serum of cancer patients with colorectal carcinomas (CrC, n=55), non-small cell lung cancer (NSCLC, n=43) and pancreatic carcinomas (PaCa, n=9), as well as patients with struma (n=40) as a negative control group and a control group of healthy persons (n=55) was effected by means of centrifugation followed by staining the microparticles with tumor-associated antibodies.

With this method it is possible to show that AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP and AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP levels are increased in the serum of cancer patients compared to in that of healthy subjects. The diagnostic accuracy is supported by the AUROC-values. The values for AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP are 0.7965 for the patients with NSCLC, 0.8059 for those with CrC and 0.8675 for the group with PaCa. The combination of EpCAM and CD147 also successfully distinguishes patients with cancer from those with struma. This combination shows an even better diagnostic performance with values of

0.8672 (NSCLC), 0.8628 (CrC) and 0.9111 (PaCa). Further analyses show that AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP levels correlate with the tumor burdens of the patients with CrC ($r=0.7461$) and that the AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP level in the serum of patients with CrC decreases after tumor resection ($p= 0.0052$).

In conclusion it can be said that the isolation of AnnexinV⁺EpCAM⁺ and AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP from human serum could prove to be a new, minimally invasive, cost effective diagnostic tool for screening, early cancer diagnosis and therapy monitoring.

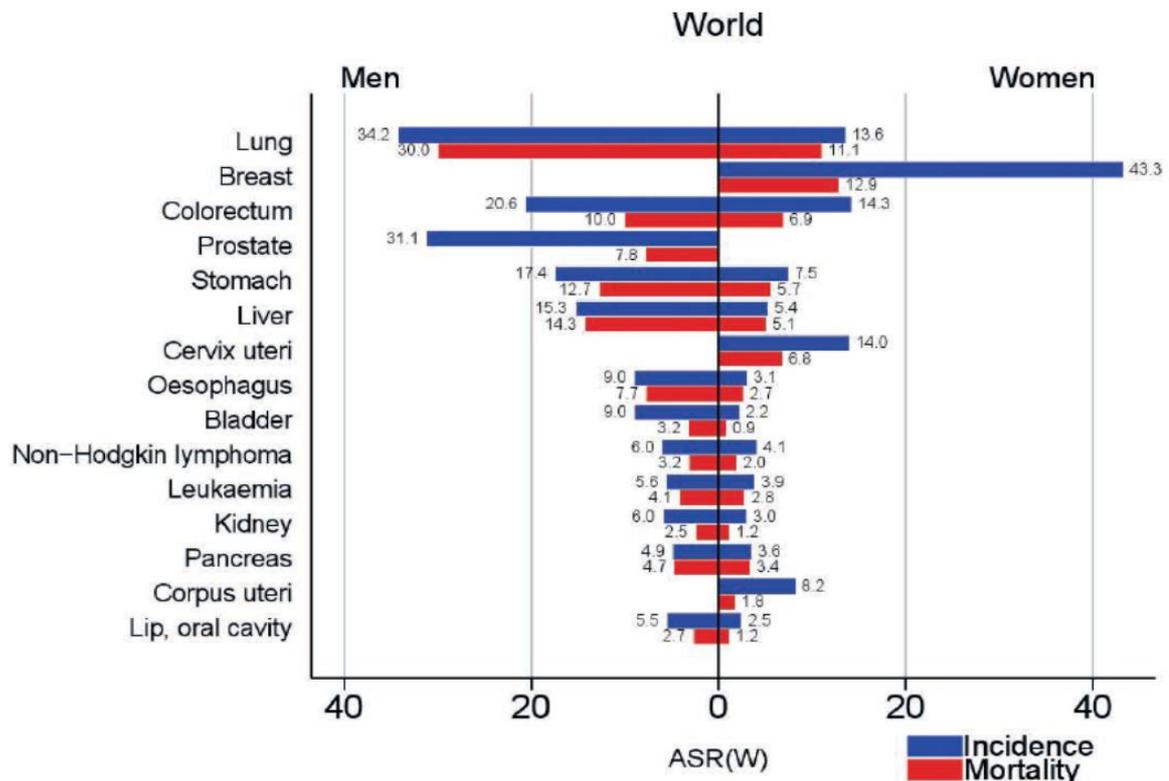
2. Einleitung

2.1 Malignome gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen

Maligne Tumorerkrankungen gehören neben kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus, chronischen Lungenkrankheiten und bestimmten Infektionen zu den häufigsten natürlichen Todesursachen weltweit [112]. Den Studien von GLOBOCAN, einem Projekt der Internationalen Agentur für Krebsforschung, zufolge wurden im Jahr 2012 bei rund 4,1 Millionen Menschen weltweit maligne Neoplasien diagnostiziert und geschätzt 8,2 Millionen Menschen starben an Malignomen [130]. Tumore, mit ihrer großen Spannweite von Typen und Subtypen, gehen zurück auf Mutationen proliferationsrelevanter Gene [71]. Diese Mutationen bewirken die Entstehung von defekten proliferationshemmenden oder -fördernden Proteinen [71], deren Wirken in der Zelle zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zellsterben führt. Daraus folgend kommt es zum unkontrollierten Zellwachstum mit zunehmender Entdifferenzierung [71]. Auf welche Weise die Mutationen hervorgerufen werden ist genauso vielfältig wie die Lokalisationen, an denen sie entstehen können. Wichtig ist hierbei das Zusammenspiel zwischen den genetischen Voraussetzungen eines Menschen und externen Faktoren der Tumorentstehung, die physikalischer, chemischer oder biologischer Natur sein können [135]. Die Häufigkeit bestimmter Arten maligner Neoplasien und deren Mutationen variieren innerhalb der Weltbevölkerung [89]. So ist zum Beispiel in Europa die Inzidenz von Prostata- und Brustkrebs zusammen mit malignen Neoplasien in der Lungen und den Kolorektalen Karzinomen am höchsten, während in Sub-Sahara Afrika die Inzidenz von Cervixkarzinomen bei Frauen gleichauf ist mit der Inzidenz von Brustkrebs und bei Männern die Inzidenz von malignen Lebertumoren neben der des Prostatakarzinoms am höchsten ist [130]. Oft sind diese Unterschiede bedingt durch Lebens- und Ernährungsgewohnheiten sowie Umwelteinflüsse und nicht nur durch Genetik [89].

Die Inzidenz von Tumoren, vor allem von malignen epithelialen Tumoren, steigt zudem mit zunehmendem Alter an [89].

Dem World Cancer Report 2014 zufolge sind die fünf malignen Neoplasien mit der höchsten Inzidenz weltweit die Tumore der Lunge, der Brust, des Kolons und des Rektums, der Prostata und des Magens. Die höchste Mortalität haben Malignome der Lungen, der Leber, des Magens, der Brust und das Kolorektale Karzinom [130].



Figur 1: Inzidenz- und Mortalitätsraten von malignen Tumorerkrankungen pro 100.000 Personen für Männer und Frauen weltweit. Dargestellt sind die Inzidenz (blau) und die Mortalität (rot) der häufigsten Malignomarten für Frauen (rechts) und Männer (links)[130].

Durch viele Jahre der Forschung ist es heute möglich einige Tumorerkrankungen früher zu erkennen und besser zu behandeln, wie zum Beispiel das Kolorektale Karzinom, dessen Inzidenz und Mortalität durch die Endoskopie und die Entfernung von präkanzerösem Gewebe zurückgegangen sind [94][133]. Betrachtet man die trotz stetiger Forschung noch hohe Inzidenz der malignen Neoplasien und besonders die hohe Mortalität von Arten wie dem Pankreaskarzinom [69], so wird die Notwendigkeit weitergehender Forschungen, vor allem im Bereich der Vorsorge und Früherkennung, deutlich.

2.1.1 Das Nicht-kleinzellig Lungenkarzinom

Die Lunge ist ein paariges Organ im Thorax und für die Atmung zuständig. Sie liegt nach kaudal dem Diaphragma auf und überragt kranial die Claviculae um ca. 1-2 cm. Sie ist aufgeteilt in zwei Lungenflügel mit rechts drei und links zwei Lappen. Jeder Lappen entspricht dem Abschnitt, der von einem Lappenbronchus mit Luft versorgt wird. Die linken Lungenlappen sind weiterhin in 9 Segmente unterteilt, von denen jedes von einem Segmentbronchus versorgt wird. Die rechten Lungenlappen teilen sich in 10 Segmente auf. Die Segmentbronchien teilen sich weiter auf in Subsegmentbronchien, diese

wiederum in die Bronchioli terminalis und diese dann in die Bronchioli respiratorii. Hier beginnt der gasaustauschende Abschnitt der Lunge. Die Alveolen, welche die Ductus alveolares umgeben, in welche die Bronchioli respiratorii münden, stellen die Barriere für den Austausch von Kohlenstoffdioxid aus dem Blut und Sauerstoff ins Blut dar [104].

Maligne Tumore in der Lunge, in der Trachea und in den Bronchien stellen die fünfthäufigste Todesursache weltweit dar [112]. Unter Männern ist es die zweithäufigste Malignomentität in Deutschland und bei den Frauen die dritthäufigste [40]. Zudem sind sie die häufigste Todesursache durch maligne Neoplasien bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen [69].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Lungenkarzinoms gehören Rauchen (passiv [43] oder aktiv [86]), Strahlen- und Radonexposition [17] sowie berufliche Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen wie zum Beispiel Asbest [40]. Typische erste Symptome sind Hämoptysen, Dyspnoe und chronischer Husten [101]. Symptome, die durch die Verdrängung von Gewebe durch die Tumorzellen entstehen wie Heiserkeit (Parese des Nervus recurrens), Schluckbeschwerden (Verdrängung der Speiseröhre) oder die obere Einflusstauung (durch das Abdrücken der Vena cava superior), treten meist erst auf, wenn die Tumorerkrankung schon weit fortgeschritten ist [48][101]. Bei einem Verdacht auf ein Lungenkarzinom wird eine Basisdiagnostik empfohlen, die neben einer ausführlichen Anamnese, Laboruntersuchung und einer körperlichen Untersuchung vor allem radiologische Verfahren wie ein Röntgen des Thorax, ein CT des Thorax [72] und des oberen Abdomens sowie die Sonographie des Abdomens enthält [40]. Zur Diagnosesicherung ist eine histologische Beurteilung von Biopsiegewebe notwendig [40] [101]. Dieses wird hauptsächlich mittels Bronchoskopie mit transbronchialer Nadelaspiration gewonnen, eine zweite Möglichkeit stellt die perkutane Nadelaspiration dar [48].

Die Einteilung der Patienten in eines der vier Stadien nach UICC (Union for International Cancer Control) erfolgt anhand der TNM-Klassifikation maligner Tumore.

Pathologisch unterteilt wird das Lungenkarzinom in die Gruppe der kleinzelligen Lungenkarzinome, die etwa 15% der Lungenkarzinome ausmachen und in die Gruppe der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, die etwa 85% ausmachen. Zudem gibt es Sonderformen wie den Pancoast-Tumor, die Lymphangiosis carcinomatosa oder das bronchioloalveoläre Karzinom [48].

Das kleinzellige Lungenkarzinom zeichnet sich histopathologisch durch das Vorhandensein kleiner Tumorzellen mit wenig Zytoplasma aus [89]. Es liegt meist zentral

und hat die schlechteste Prognose unter den Lungenkarzinomen. Dies wird auf das schnelle Tumorwachstum zurückgeführt [48].

Das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom ist unterteilt in die Adenokarzinome, die meist peripher liegen und den häufigsten Typ bei Nichtrauchern darstellen [126][110], die Plattenepithelkarzinome, welche häufiger zentral liegen und von solider Konsistenz sind, sowie die großzelligen Karzinome, die jedoch nur ca. 10% der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome ausmachen [48].

Die Therapie ist komplex und dem jeweiligen durch die Diagnostik gesicherten Stadium angepasst. In den frühen Stadien steht ein kurativer Ansatz im Vordergrund, während in UICC- Stadium 4 nur noch eine palliative Therapie möglich ist. Im Allgemeinen umfassen die Therapieoptionen nicht-operative Verfahren wie die Chemotherapie, die Radiatio und in bestimmten Fällen die Behandlung mit Biologicals wie Gefitinib, ein EGFR-Kinase Inhibitor, welcher besonders bei NSCLC-Patienten mit bestimmten EGFR-Mutationen Wirkung zu zeigen scheint [128][81], sowie operative Verfahren, von denen die Lobektomie mit Lymphknotenresektion im Vordergrund steht [48].

Die schlechte Prognose mit hoher Mortalität, die Häufigkeit und die oftmals lange Verzögerung der Diagnosestellung, auch wegen des späten Auftretens von Symptomen [40], zeigen, dass neue, frühe diagnostische Verfahren für das Lungenkarzinom, und besonders das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom als häufigste Form, dringend gebraucht werden.

2.1.2 Das Kolorektale Karzinom

Caecum, Colon und Rektum bilden zusammen den Dickdarm des Menschen. Das Caecum ist hierbei am weitesten oral gelegen und schließt sich mit der Ileocaecalklappe dem letzten Abschnitt des Dünndarms, dem Ileum, an. Es kann intraperitoneal liegen oder mit der Rumpfwand verwachsen sein (sekundär retroperitoneale Lage) und ist durchschnittlich 5-7 cm lang. Das Caecum geht über in den ersten Abschnitt des Colons, bildet caudal jedoch ebenfalls einen kleinen Abschnitt, den Appendix vermiformis [104][11]. Der erste anatomische Abschnitt des Colons wird als Colon ascendens bezeichnet. Es ist ca. 12-20 cm lang, liegt sekundär retroperitoneal und stellt den aufsteigenden Teil des Darms vom rechten Unterbauch bis zur Flexura coli dextra dar. Dort geht es über in den quer verlaufenden Teil des Colons, der bis zur Flexura coli sinistra reicht und als Colon transversum bezeichnet wird. Mit ca. 45 cm stellt es den längsten Teil des Dickdarms dar

und liegt intraperitoneal. An der Flexura coli sinistra beginnt das Colon descendens, der absteigende Anteil des Colons, der wie das Colon ascendens sekundär retroperitoneal liegt und ca. 22-30 cm misst. Den letzten Abschnitt des Colons bildet das Colon sigmoideum, das sich intraperitoneal ansiform bis ca. zum dritten Sakralwirbelkörper zieht. Morphologisch zeichnen sich Caecum und Colon durch das Vorhandensein von Tännien, Appendices epiploicae, Plicae semilunares und den durch sie ausgebildeten Haustren aus. Die Funktion von Caecum und Colon besteht insbesondere in der Eindickung des Chymus durch Wasserresorption aus dem Darm und der Produktion von Mucus, der die Gleitfähigkeit des entstandenen Chymus verbessert [104][11].

Das Colon sigmoideum geht über in das Rektum, welches ca. 12-18 cm lang ist und viele Krümmungen aufweist. Durch die Krümmungen entstehen abgrenzbare Falten und unter der mittleren dieser Falten liegt die Ampulla recti. Kaudal geht das Rektum in den 3-4 cm langen Analkanal über, welcher sich im oralen Bereich durch viele Schleimhautfalten und im aboralen Bereich durch die Zona alba auszeichnet. Durch ein spezielles muskuläres Sphinktersystem in Rektum und Analkanal werden Kontinenz und Defäkation gesteuert [104][11].

Das kolorektale Karzinom hat neben Brust-, Prostata- und Lungentumoren die höchste Inzidenz in Europa [130]. Weltweit ist es das dritthäufigste Karzinom des Mannes und das zweithäufigste Karzinom der Frau [130]. Obwohl in Deutschland die Mortalität rückläufig und die Inzidenz in den Altersgruppen über 55 in den letzten 13 Jahren gesunken ist [102], ist das CrC noch immer die zweithäufigste Todesursache durch Tumorerkrankungen in Deutschland [20].

Das Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. empfehlen in ihrer 2014 herausgegebenen Leitlinie für das Kolorektale Karzinom körperliche Tätigkeit, Gewichtsreduktion bei Übergewichtigen, Verzicht auf Tabakkonsum, ballaststoffreiche Ernährung, niedrigen Alkoholkonsum und den eingeschränkten Verzehr von rotem Fleisch als evidenzbasierte Maßnahmen zur Prävention des Kolorektalen Karzinoms [75]

Ebenso werden regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen (Koloskopie als vorrangiges Diagnosemittel) ab dem 50. Lebensjahr bei asymptomatischen Individuen empfohlen [75], bei Risikopatienten sollte bis zum 45. Lebensjahr die erste Koloskopie erfolgt sein [75]. Als prädisponiert gelten Menschen mit familiären Polyposis-Syndromen oder hereditärem nicht-polypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) [82], mit kolorektalen Karzinomen in

der Familie [48] oder gastrointestinalen chronischen Vorerkrankungen wie beispielsweise Morbus Crohn [56] und Colitis ulcerosa, wobei hier die Dauer der Erkrankung entscheidend ist, da mit längerer Krankheitsdauer das Risiko ein Kolorektales Karzinom zu entwickeln steigt [29].

Wie die malignen Tumore der Lunge bleibt das Kolorektale Karzinom lange symptomlos. Oft entstehen Symptome erst, wenn der Tumor blutet oder er so groß ist, dass er das Darmlumen einengt. Dann kann es zu Veränderungen der Defäkation kommen wie zum Beispiel Obstipationen oder Hämatochezie [48]. Andere mögliche Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß sowie Müdigkeit und Abgeschlagenheit sind unspezifische Anzeichen maligner Erkrankungen.

Bei Symptomen, auffälligen digital-rektalen Untersuchungen oder positiven fäkalen Occultbluttest sollte eine weiterführende Diagnostik erfolgen. Goldstandard ist hier die komplette Koloskopie sowie die Abtragung von Polypen mittels Schlingenektomie (Polypen >5 mm) oder Zangenektomie (Polypen <5 mm) um eine eindeutige histologische Zuordnung zu erhalten [75]. Sollte sich in der Histologie ein Tumor bestätigen, werden weitere diagnostische Maßnahmen in Form der abdominalen Sonographie, der Untersuchung des Tumormarkers CEA und ein Röntgen des Thorax empfohlen, beim Rektumkarzinom zusätzlich eine starre Rektoskopie sowie ein MRT des Beckens [75]. Als Rektumkarzinom gelten maligne Tumore mit Abstand zur Anokutanlinie von 16 cm, alle malignen Tumore, die 16 cm oder mehr Abstand zur Anokutanlinie aufweisen gelten als Colonkarzinome [48]. Die Einteilung des Kolorektalen Karzinoms in ein Stadium nach UICC erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. Histopathologisch handelt es sich in 95% der Fälle um Adenokarzinome [16].

Die Therapie unterscheidet sich nach Stadium und Lokalisation des Tumors. Allgemein steht die chirurgische Entfernung des Tumors im Vordergrund [100]. Eine weitere wichtige Therapieoption stellt die zytostatische Chemotherapie dar [48].

Wegen seiner hohen Inzidenz stellt das Kolorektale Karzinom immer noch eine der häufigsten Krebstodesursachen dar. Durch neue frühe Diagnoseverfahren könnte es möglich sein, die Mortalität des Kolorektalen Karzinoms weiter zu senken.

2.1.3 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas ist ein längliches, horizontal im Oberbauch retroperitoneal liegendes Drüsenorgan. Es ist unterteilt in das Caput pancreatis, welcher in der C-förmigen

Krümmung des Duodenum liegt, den Corpus pancreatis, der topographisch über die Lumbalwirbel 1 und 2 zieht, und die Cauda pancreatis [11]. Der exokrine Teil des Pankreas spielt eine Rolle in der Digestion und ist eine rein seröse Drüse, durch die Enzyme, Elektrolyte und sekundär Wasser über den Ductus pancreaticus, welcher das Pankreas durchzieht, in den Dünndarm gebracht werden. Die Langerhans'schen Inseln, welche den endokrinen Anteil des Pankreas darstellen, bestehen aus verschiedenen Arten von Zellen, den A-, B-, D- und PP-Zellen, die unterschiedliche Hormone produzieren. Die wichtigsten sind Insulin und Glukagon, über die der Blutzuckerspiegel gesteuert wird. Die Hormone gelangen durch Exocytose ins Interstitium [80].

Das Pankreaskarzinom hatte 2013 in Deutschland eine Inzidenz bei Männern von 14,3/100.000 Einwohnern und bei Frauen von 9,9/100.000 Einwohnern, wobei die Häufigkeit mit dem Alter zunimmt [39]. Männer und Frauen sind also weitgehend gleichmäßig betroffen. Es ist in Deutschland die vierthäufigste Todesursache durch maligne Neoplasien [20]. Die Mortalität ist fast genauso hoch wie die jährliche Inzidenz und lag bei den Männern im Jahr 2013 bei 13,4/100.000 Einwohnern und bei den Frauen bei 9,7/ 100.000 Einwohnern [39]. Weltweit rangiert das Pankreaskarzinom auf Platz 13 der häufigsten malignen Neoplasien [130].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören Rauchen [69], weshalb der Verzicht auf Tabak auch in den aktuellen Leitlinien empfohlen wird [74], Alkoholabusus [74][140], Diabetes mellitus Typ 2 [5], Adipositas [74] und chronische Pankreatitis [22]. Ebenso spielen genetische Prädisposition und familiäre Belastung eine Rolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms [48].

Symptome treten meist erst im sehr späten Verlauf der Krankheit auf. Diese können neben der allgemeinen Symptomatik bei malignen Erkrankungen, wie Gewichtsverlust und Schwäche, in Form eines schmerzlosen Ikterus, Oberbauch- und/oder Rückenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen auftreten. Ebenfalls Symptom eines Pankreaskarzinoms können eine prall-elastische, schmerzlose Gallenblase mit Ikterus sein, das sogenannte Courvoisier-Zeichen, oder ein paraneoplastisches Syndrom in Form einer Thrombophlebitis migrans oder rezidivierenden Thrombosen [48].

Bei neu auftretenden Symptomen sollte eine Diagnostik, und bei Verdachtsbestätigung eine präoperative erweiterte Diagnostik, erfolgen. Mittel der ersten Wahl sind die Sonographie des Oberbauchs, die Endosonographie, CT oder MRT/Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatikographie [74]. Wird durch diese Diagnostik eine Neoplasie im Pankreas nachgewiesen, ist eine Blutuntersuchung auf den Tumormarker CA19-9

empfohlen [74]. Auch hier erfolgt das Staging nach der TNM-Klassifikation für maligne Tumore. 60-70% der Pankreaskarzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert, und der Großteil der Tumore sind duktale Adenokarzinome [89].

Die Resektion des Tumors ist bei Patienten ohne Fernmetastasen die effektivste Therapie [125][25]. Neoadjuvante Strahlentherapie wird nicht empfohlen [74], aber nach der Resektion sollte eine adjuvante Chemotherapie erfolgen, da dies das Auftreten von Rezidiven verzögern kann [95]. In der palliativen Behandlung sollte ebenfalls eine Chemotherapie, möglicherweise in der Kombination mit „targeted agents“, erfolgen [74].

Das Pankreaskarzinom hat eine sehr schlechte Prognose, auch nach einer operativen Resektion liegt die 5-Jahresüberlebensrate nur bei ca. 40 % [48]. Inzidenz und Mortalität sind ähnlich hoch [130] und durch das späte Auftreten von Symptomen werden viele Malignome spät erkannt. Ein effektives Verfahren zur Früherkennung gibt es derzeit noch nicht.

2.2 Diagnostische Verfahren zur Früherkennung des NSCLC, des CrC und des PaCa

2.2.1 Verfahren zur Früherkennung des Lungenkarzinoms

Das NSCLC hat in Deutschland eine 5-Jahresüberlebensrate von 13% für Männer und 18 % für Frauen [69], sie variiert jedoch je nach Stadium des Tumors bei Erstdiagnose [40]. Eine frühzeitige Erkennung könnte bei risikobehafteten Individuen einem Progress der Erkrankung entgegenwirken [86].

Der begründetem Verdacht auf ein Lungenkarzinom ergibt sich aus dem Zusammenspiel von klinischen Erscheinungsbild des Patienten und einer auffälligen Röntgenuntersuchung des Thorax [40]. Weiterführende bildgebende Verfahren sind das CT (Methode der ersten Wahl) und das MRT [21]. Zur Diagnosesicherung werden je nach Lage des Tumors die Bronchoskopie mit Biopsieentnahme oder eine Transthorakale Nadelaspiration mit oder ohne Navigationshilfen empfohlen [40]. Zudem kann eine zytologische Diagnostik zur Bestätigung eines NSCLC eingesetzt werden [40].

In einer Metaanalyse der Cochrane Collaboration, die 2013 veröffentlicht wurde, wurden mehrere Studien zu Lungenkrebs-Voruntersuchungen analysiert. Hier lag der Fokus auf der Frage, ob CT-Untersuchungen, Röntgenuntersuchungen oder Sputumuntersuchungen die Mortalität des Lungenkarzinoms senken können. Zusammenfassend kamen sie zu dem Ergebnis, dass eine Vorsorgeuntersuchung mittels Röntgen oder Sputumzytologie die

Mortalität nicht senkt und dass niedrig dosierte CT-Untersuchungen zwar die Mortalität des Lungenkarzinoms senken können, dies aber nur für Individuen mit sehr hohem Risiko gilt [83]. In den aktuellen Leitlinien werden CT-Untersuchung, Röntgenuntersuchungen und Sputumuntersuchungen aufgrund der Studienlage bei asymptomatischen Patienten, aber auch bei Risikopatienten, nicht empfohlen [40]. Ebenso wenig empfohlen werden die Bronchoskopie aufgrund ihrer Invasivität und die Tumormarkeruntersuchung aufgrund der Gefahr von vermehrten falsch positiven Ergebnissen [40].

2.2.2 Verfahren zur Früherkennung des Kolorektalen Karzinoms

Um die Sterblichkeit des Kolorektalen Karzinoms zu senken scheint die Koloskopie die effizienteste Methode zu sein [32]. Sie hat sich, in Zusammenspiel mit der digital-rektalen Untersuchung, als Standardmethode in der Früherkennung des Kolorektalen Karzinoms durchgesetzt, unter anderem, da man durch sie auch gutartige Tumore identifizieren kann [75]. Bei der asymptomatischen Bevölkerung werden Vorsorgeuntersuchungen ab dem 50. Lebensjahr alle 10 Jahre empfohlen, bei Individuen mit erhöhtem Risiko ist je nach Art des Risikos eine andere Zeitspanne für die Vorsorgeuntersuchungen empfohlen [75]. Eine Sigmoidoskopie ist auch möglich, vor allem bei Patienten, bei denen eine Koloskopie nicht möglich ist. Dass die Vorsorgeuntersuchung mit einer Sigmoidoskopie die Mortalität senkt, ist in Studien bewiesen worden [51]. Bei der Sigmoidoskopie als Untersuchungsmethode wird jedoch zusätzlich die Durchführung eines fäkalen occulten Bluttests empfohlen [75]. Auch bei diesem Früherkennungstest ist die Senkung der Mortalität in Studien belegt [49]. Er wird jedoch nur empfohlen wenn ein Risiko besteht und die Koloskopie abgelehnt wird [75]. Bei einem positiven Ergebnis im fäkalen occulten Bluttest ist eine komplette Untersuchung des Dickdarms obligat [75]. Obwohl es bereits vielversprechende genetische Stuhluntersuchungen für das Kolorektale Karzinom gibt [26] [111], sollten diese aufgrund der hohen Kosten und der unzureichenden Studienlage noch nicht im Klinikalltag angewendet werden [75]. Zur Zeit werden einige Biomarker als mögliche Tumormarker für das Kolorektale Karzinom untersucht, doch bis auf CEA, das prätherapeutisch bestimmt wird und als Prognosefaktor bei Metastasen und Rezidiven gilt [73], haben sich noch keine Marker im klinischen Alltag durchgesetzt.

2.2.3 Verfahren zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom weist mit einer relativen 5-Jahresüberlebensrate von 10% für

Frauen und 9% für Männer in Deutschland die niedrigste Überlebensrate unter allen Malignomen auf [69]. Dies ist mitbegründet dadurch, dass das Pankreaskarzinom oft erst in fortgeschrittenen Stadien Symptome verursacht [69]. Für lokale Neoplasien ohne Fernmetastasierung ist die Resektion die effektivste Therapieoption [125], jedoch haben bei der Erstdiagnose bereits viele Patienten Fernmetastasen.

Vorsorgeuntersuchungen mittels Bestimmung von CA19-9, molekularbiologischer Verfahren oder bildgebender Methoden werden für die asymptomatische Bevölkerung nicht empfohlen, da bisher keine wissenschaftliche Evidenz vorliegt [74]. Auch den Menschen mit Risikofaktoren wird außer den auch für die Normalbevölkerung geltenden Primärpräventionsmaßnahmen keine weitere Vorsorgeuntersuchung empfohlen [74].

Die bildgebenden Verfahren haben sich aufgrund der hohen Kosten und der hohen Falsch-positiv-Rate nicht in der Vorsorge durchsetzen können [99].

Es gibt bereits eine Vielzahl potenzieller Biomarker für das Pankreaskarzinom [47], jedoch kommen klinisch bisher nur CA19-9 und CEA zum Einsatz.

CA19-9 kann als Prognosemarker dienen [114], ist jedoch aufgrund eines zu niedrigen positiven prädiktiven Wertes zur Früherkennung bei asymptomatischen Menschen nicht geeignet [63], genauso wenig wie CEA, ein Marker, der bei gastrointestinalen Krankheiten zum Einsatz kommt [99].

2.3 Extrazelluläre Vesikel und ihr Stand in der Forschung

Extrazelluläre Partikel oder extrazelluläre Vesikel (EP/EV), zu denen auch die Mikropartikel (MP) gehören [121], sind Membranpartikel, die in den letzten Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen haben, da sie sowohl bei pathologischen als auch bei physiologischen Vorgängen eine Rolle in der interzellulären Kommunikation spielen [118]. Diese Vesikel werden von vielen Zelltypen in die Umgebung abgegeben [15] und lassen sich in vielen Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Pleuraflüssigkeit [88], Urin [97][98] oder Blut [88] nachweisen.

Die Gruppe der extrazellulären Vesikel ist sehr heterogen, und die drei wichtigsten Typen sind die Exosome, die Mikropartikel/Mikrovesikel, die zwar aufgrund ihrer Heterogenität von der Größe nicht immer sicher von den Exosomen abgegrenzt werden können [121], jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen Genese klar von Exosomen zu unterscheiden sind [92], und die apoptotischen Körperchen.

Exosome entstehen klassischerweise durch die Fusion von multivesikulären Endosomen

mit der Plasmamembran und der damit verbundenen Freisetzung intraluminärer Vesikel in den extrazellulären Raum [121]. Sie sind ca. 50-100 nm im Durchmesser groß und von einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben [42]. Sie enthalten unter anderem mRNA, miRNA, zytoplasmatische und Membranproteine und MHC-Moleküle [30].

Apoptosekörperchen sind ca. 1-5 µm im Durchschnitt und entstehen während des Zelltodes. Ihr Hauptunterscheidungsmerkmal zu den anderen Typen ist die Größe [121]. Zudem besitzen sie einen hohen Anteil an Phosphatidylserin in der äußeren Membran [30].

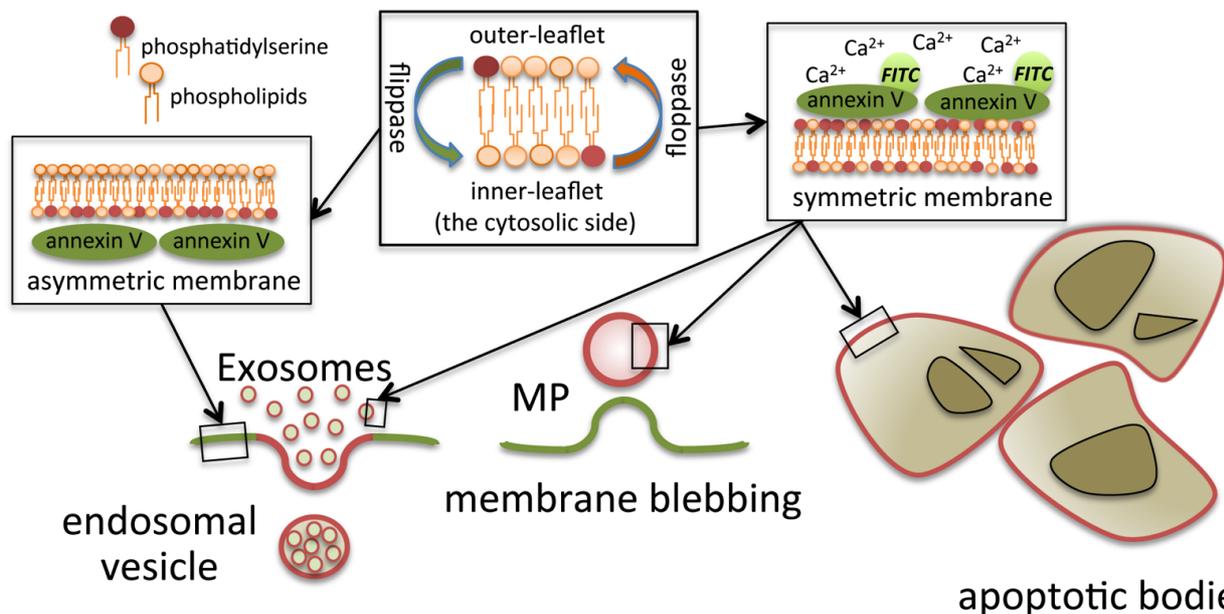
Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das in der Zellmembran von Eukaryoten vorkommt. Es zeichnet sich durch zwei Fettsäuren aus, die über Esterbindungen mit dem ersten und zweiten Kohlenstoffatom des Glycerols verbunden sind, und eine Serin-Gruppe, die über einen Phosphodiester an das dritte Kohlenstoffatom gebunden ist [77]. Da Serin neutral geladen ist, ist Phosphatidylserin im Vergleich mit anderen in der Zellmembran vorkommenden Lipiden anionisch [77]. Es befindet sich zum größten Teil in der inneren Zellmembran und wird nur unter bestimmten Umständen nach extrazellulär transportiert. Damit trägt es zur Asymmetrie der Zellmembran bei. Aufrechterhalten wird diese Asymmetrie durch die Transportproteine Flippasen, Floppasen und Scramblasen. Flippasen befördern die Phospholipide von der extrazellulären Schicht zur zytosolischen Schicht, Floppasen arbeiten gegenteilig [77]. Scramblasen können die Phospholipide in beide Richtungen befördern und stellen so einen Ausgleich zwischen Flippasen und Floppasen dar. Jeder dieser Lipidtransporter arbeitet ATP-abhängig [77]. Neben seiner Funktion in der Gerinnungskaskade spielt Phosphatidylserin eine wichtige Rolle in der Erkennung und Beseitigung von apoptotischen Zellen [77]. Wird eine Zelle aktiviert oder tritt in die Apoptose ein, wird Phosphatidylserin durch die Aktivierung von Scramblasen und der vermutlichen Inaktivierung der Flippasen vermehrt in die extrazelluläre Schicht befördert und dient dort zum Beispiel als Target für natürliche Killerzellen [77].

Aufgrund seines Vorkommens auf aktivierten und apoptotischen Zellen eignet sich Phosphatidylserin, beziehungsweise AnnexinV, welches an Phosphatidylserin bindet [64], auch als Marker für Extrazelluläre Vesikel, die als Abschnürungen der Zellmembran Phosphatidylserin in ihrer äußeren Membran aufweisen [68].

So auch die meisten Subtypen der Mikropartikel oder Mikrovesikel, wie sie zum Teil bezeichnet werden [14]. Sie entstehen durch Ausknospung der Zellmembran in den extrazellulären Raum bei Stress der Zelle, Apoptose oder bei einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle [42]. Sie haben einen Durchmesser von ca. 50-1.000 nm,

obwohl vor allem die untere Größengrenze noch umstritten ist, weswegen eine sichere Abgrenzung von Exosomen trotz unterschiedlicher Entstehungsmechanismen möglicherweise nicht immer umsetzbar ist [121].

Da Exosome Ausknospungen der Zellmembran sind, tragen sie die selben Oberflächenmerkmale wie die Zelle, von der sie stammen. Sie enthalten mRNA, miRNA, zytoplasmatische Proteine sowie Membranproteine [30].



Figur 2: Charakteristik der Zellmembran von Exosomen, Mikropartikel und apoptotischen Körperchen. Phosphatidylserin kommt in der Zellmembran von Eukaryoten vor und befindet sich dort größtenteils in der inneren Membran, was eine Asymmetrie der Membran zur Folge hat. Aufrechterhalten wird diese Asymmetrie durch Enzyme wie die Flippase und Floppase. Bei den Exosomen, Mikropartikeln und apoptotischen Körperchen stellt sich aufgrund der Inaktivierung der Flippase eine Symmetrie der Membran ein, wodurch Phosphatidylserin vermehrt in der äußeren Membran vorkommt und Ca^{2+} -abhängig an AnnexinV bindet [68].

2.3.1 Stand der Mikropartikel in der Tumorforschung

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Mikropartikel sowohl an physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen im Körper beteiligt sind. Sie dienen unter anderem der Zell-zu-Zell Kommunikation und können Rezeptoren, Proteine und RNAs an andere Zellen weitergeben [54]. Sie können von verschiedensten Zellen abstammen und finden sich in Körperflüssigkeiten wie Blut [105][88] und Urin [98]. Vor allem das macht sie interessant in der Erforschung minimalinvasiver Verfahren zur Erkennung von Krankheiten.

So finden sich beispielsweise erhöhte Mikropartikelwerte im Blut bei Patienten mit

instabiler Angina pectoris und Myokardinfarkt [6], Diabetes mellitus Typ 2 [96], inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatische Arthritis [24], multipler Sklerose [24] und Hepatitis C [67], aber auch bei Tumorpatienten. Ihnen wird eine Rolle in der Angiogenese von Tumoren und der Metastasierung zugesprochen, sowie Beteiligung beim Überleben der Tumorzellen und der Abwehr gegen Immunzellen [92][123]

Dass Mikropartikel die selben Oberflächenproteine tragen wie die Zelle, von der sie stammen, lässt die Überlegung zu, ob man durch die Isolierung von Mikropartikeln aus dem Blut von Patienten und den Nachweis von Oberflächenantigenen spezifisch Krankheiten nachweisen kann. So wurde unter anderem schon gezeigt, dass Patienten mit chronischer Hepatitis C oder Nicht-alkoholischer Steatohepatitis vermutlich krankheitsspezifische Mikropartikel-Signaturen haben [66], oder dass EpCAM⁺ Mikropartikel in Pleuraflüssigkeit vorhanden sind [103][88].

Aufgrund ihrer Funktion in der Biologie von Tumorerkrankungen lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Detektion tumorassozierten Mikropartikel ein neues, nicht invasives, günstiges Verfahren in der Früherkennung und Verlaufskontrolle von Malignomen werden könnte.

2.4 Potenzielle Marker für die Forschung mit tumorassozierten Mikropartikeln

Es gibt eine große Bandbreite von Proteinen, die mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Einige, wie CA19-9, CA125 oder CEA, finden bereits in der klinischen Diagnostik und Verlaufskontrolle Anwendung. Aber auch Oberflächenproteine wie das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) oder Basigin (Synonym: extracellular matrix metalloproteinase inducer:EMMPRIN, CD147) wurden schon bei Tumorerkrankungen nachgewiesen.

EpCAM gehört, wie der Name schon sagt, zu den Zelladhäsionsmolekülen, lässt sich strukturell aber keiner der vier Superfamilien (Cadherine, Integrine, Selektine und Immunglobulin-CAM) zuordnen [116]. Es ist ein membranständiges Glykoprotein, bestehend aus 314 Aminosäuren, und hat eine Größe von ca. 40 kDa. Es wurde erstmals 1979 als tumorassoziertes Antigen beim Kolorektalen Karzinom beschrieben [65]. Es wird nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert, sondern findet sich auch in gesundem Gewebe [107]. Hier ist es jedoch nur auf das einfache Epithel beschränkt, was einen weiteren Unterschied zu den anderen Zelladhäsionsmolekülen darstellt, welche von

nahezu allen Zellen exprimiert werden [116]

EpCAM ist typischerweise in schwankender Ausprägung bei epithelialen Tumoren überexprimiert, aber auch bei Entzündungen. Es wird nicht von Tumoren mesodermaler oder ektodermaler Herkunft exprimiert [87]. Während es in normalem Epithel größtenteils auf der basalen oder basolateralen Zellmembran exprimiert wird, ist es in Tumorzellen unterschiedlich verteilt [136]. Die Überexprimierung kann sowohl mit einer schlechteren Überlebensrate einhergehen, als auch mit einer besseren. Dies ist vermutlich abhängig von der Mikroumgebung [120].

Die Funktion von EpCAM ist vielfältig und unterscheidet sich in einigen Bereichen von denen der anderen CAMs, die vor allem für den Zusammenhalt von Geweben verantwortlich sind und die Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen [12]. Es scheint, dass EpCAM in normalem Epithel, ebenso wie die anderen CAMs, die Zelladhäsion unterstützt, in Tumorzellen jedoch sowohl die Zelladhäsion lockern als auch stärken und je nachdem die Migration und Metastasierung fördern oder unterdrücken kann [116]. Es spielt daneben unter anderem eine Rolle in der Signaltransduktion, in der Zelldifferenzierung und -proliferation und in der Morphogenese [90][91].

CD147 ist ein Glykoprotein der Zellmembran und gehört zur Familie der Immunglobuline [53]. Es gibt mehrere bekannte Isoformen, die sich in ihren Domänen voneinander unterscheiden. Die extrazelluläre Region des gängigen CD147 enthält zwei C2-Typ-Immunglobulin-Regionen, die Matrix-Metalloproteasen aktivieren [137]. Die transmembrane und die cytosolische Region sind unter anderem zuständig für die Lokalisierung von Monocarboxylat-Transportern [57]. In der cytosolischen Region befinden sich zudem noch zwei Hypoxie-induzierende-Faktor Bindestellen [137].

CD147 wird von gesundem und pathologischem Gewebe exprimiert. Es spielt unter anderem eine Rolle im Ok-Blutgruppensystem [10] und im physiologischen Gewebeumbau [137], sowie im Transport von Laktat und anderen Monocarbonsäuren [132].

In pathologischem Gewebe, wie zum Beispiel in Tumorzellen, unterstützt CD147 unter anderem die Invasion, den Wachstum und die Metastasierung indem es die Matrix-Metalloproteasen hochreguliert und mit anderen Proteinen interagiert [137][57].

Obwohl CD147 auch in anderen pathologischen Prozessen eine Rolle spielt, so zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen, würde es sich als Tumormarker eignen, da es von vielen Tumorarten überexprimiert wird [79], darunter auch von Kolorektalen Karzinomen [9], Lungenkarzinomen [139] und Pankreaskarzinomen [62].

Weiter in dieser Studie verwendete potenzielle Tumormarker sind das Hermesantigen oder

CD44, dessen abweichende Isoform , das CD44v, vor allem von Tumorzellen und während Entzündungen exprimiert wird [138] und das Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CD66c), ein Oberflächenprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie, welches zum Beispiel ein Potenzial als Prognosemarker für das Kolorektale Karzinom oder maligne Pleuraergüsse aufweist [3][106].

2.5 Ziele der Arbeit

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Detektion von Extrazellulären Vesikeln, insbesondere Exosome und Mikropartikel, ein vielversprechendes, günstiges und minimalinvasives Verfahren in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Krankheiten, darunter auch Tumorerkrankungen, darstellen könnte. So wurde unter anderem bereits gezeigt, dass Glypican1-positive Exosome einen potenziellen Marker für die Detektion des Pankreaskarzinoms darstellen [84], oder dass im Blut zirkulierende Mikropartikel bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Nicht-alkoholischer Steatohepatitis ansteigen und spezifische Charakteristiken aufweisen [66].

Da auch viele Malignomerkrankungen erst spät zu Symptomen führen und damit meist erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt werden können, sowie die hohe Inzidenz und Mortalität von bestimmten Neoplasien, rücken Extrazelluläre Vesikel als mögliches Mittel der minimalinvasiven Vorsorgeuntersuchung weiter in den Fokus der Aufmerksamkeit.

Die Ziele dieser Arbeit sind zum einen die Erstellung eines Isolationsprotokolls für Mikropartikel aus humanem Serum und die Zusammenstellung einer Tumormarker-Kombination, die als Pan-Tumormarker für tumorassoziierte Mikropartikel dienen kann, sowie zum anderen die Erfassung der Möglichkeiten dieser markerpositiven tumorassoziierten Mikropartikel in der Früherkennung und der Verlaufskontrolle bei den untersuchten Tumorpatienten.

3. Material und Methoden

3.1 Gewinnung humaner Serumproben

3.1.1 Untersuchungskollektiv

Die Durchführung der in dieser Arbeit dargestellten Studie wurde von der Ethikkommission bei der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Bearbeitungsnummer: 837.151.13 (8836-F)). Alle Probanden wurden hinreichend informiert und haben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben.

Es wurden 55 Patienten mit Kolorektalem Karzinom (CRC), 43 Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), 9 Patienten mit Pankreaskarzinom (PaCa) sowie 55 Proben gesunder Kontrollpersonen in die Studie aufgenommen. Bei einem Teil der Patienten wurde das Blut auf die Tumormarker Carcinoembryonales Antigen (CEA) und Carbohydrate 19-9 (CA19-9) getestet und das Tumolvolumen bestimmt. Diese Daten, sowie Geschlecht, Alter, das UICC-Stadium und Angaben zu vorgenommenen Operationen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Patienten sind nach ihrer Tumorentität in Gruppen unterteilt. Zudem wurden, mit der freundlichen Genehmigung von Leutnant Niklas Klein, der die Versuche für diese Gruppe durchgeführt und die Daten analysiert hat, als Negativ-Kontrollgruppe 40 Patienten mit Struma der Studie hinzugefügt. Alle Patienten wurden im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz behandelt und erhielten die Blutentnahme als Teil der Standardversorgung.

3.1.2 Vorbereitung der humanen Serumproben

Die Blutentnahmen erfolgten im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz unter der Leitung von Dr. Arnulf Willms. Es wurden Blutproben von Patienten mit Kolorektalem Karzinom, Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom sowie von Patienten mit Struma gesammelt.

Von allen teilnehmenden Patienten wurde Blut vor einer möglichen Operation entnommen und wenn möglich an Tag 2, Tag 7 und Tag 10 postoperativ.

Das venöse Blut wurde in Standard S-Monovetten 7,5 ml, Serum Gel mit Gerinnungsaktivatoren (Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland) gesammelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um die Gerinnung zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Blutproben für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4000 g zentrifugiert, um

das Serum von den zellulären Anteilen des Blutes zu trennen.

Tabelle 1: Zusammenfassung bevölkerungsstatistischer, biochemischer und histologischer Merkmale der in die Studie eingeschlossenen Patienten. Für die Populationen Kolorektales Karzinom (CrC), Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), Pankreaskarzinom (PaCa), Struma, sowie für die Kontrollgruppe wurden die absolute Anzahl(#) der Patienten mit Alter und Geschlecht angegeben.

*Sowie vorhanden wurden zudem Tumor Volumen, das UICC Stadium, die durchschnittlichen Werte der Tumormarker CEA und CA19-9, operative Behandlung und eventuelle Neoadjuvante Vorbehandlung angegeben.

	CRC	NSCLC	PaCa	Struma	Kontroll- gruppe
Patienten [#]	55	43	9	40	55
Weiblich [#]	18	10	6	32	17
Männlich [#]	37	33	3	8	38
Alter [Jahre]	66,91	62,51	68,75	55,10	27,49
*Tumor Volumen [cm³]	28,86	24,94	26,56	n.v.	0,00
*CEA [ng/mL]	8,190	7,029	2,234	n.v.	0,4975
*CA19-9 [ng/mL]	24,18	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
*UICC I	10	15	1	0	0
*UICC II	15	9	3	0	0
*UICC III	12	5	2	0	0
*UICC IV	11	7	1	0	0
*Kurativ onkologische OP					
Ja	42	28	6	0	0
Nein	10	9	3	43	55
*R0 Resektion	33	24	2	0	0
*Neoadjuvante Radio-/Chemo- therapie	16	5	0	0	0

Bemerkung: #= absolute Zahl der Patienten in jeder Gruppe; Alter, Tumolvolumen, CEA- und CA19-9-Werte als Mittelwert angegeben. CEA- und CA19-9-Werte in ng/ml angegeben; n.v. = nicht verfügbar; *= falls verfügbar

Das Serum wurde in 2 ml Reagenzgefäße überführt und bis zur weiterführenden Mikropartikelisolierung bei -80°C gelagert.

3.2 Die Isolierung von zellabstammenden Mikropartikeln aus humanem Serum

3.2.1 Dialyse des humanen Serums

Das Serum wurde über Nacht gegen 45 ml AnnexinV 1xBindepuffer, welchem Bovinem Serum Albumin (BSA) mit einer Endkonzentration von 0,05% hinzugefügt wurde, in Dialyseröhrchen (Slide-A-Lyser® MINI Dialysis Devices, 3,5k MWCO, 2 ml, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) dialysiert. Die Zusammensetzung des AnnexinV 1xBindepuffers und der Dialyselösung ist im Folgenden erläutert. Das verwendete BSA (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurde zuvor für 1 Stunde bei 20.000 g zentrifugiert, um Artefaktbildung durch Aggregation vorzubeugen, und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

•AnnexinV 1xBindepuffer

Reagenz	Bestand	Einsatz	Hersteller
PBS	1000 ml	9975 ml	Sigma, Steinheim, Deutschland
20x AnnexinV Bindepuffer	25 ml	25 ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

•Zusammensetzung der Dialyselösung

- 45 ml AnnexinV 1xBindepuffer
- 2,5 ml BSA (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

3.2.2 Isolierung der zellabstammenden Mikropartikel mittels Differential-zentrifugation

Die Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann jeweils 1 ml in neue Reagenzgefäße überführt. Diese wurden im ersten Schritt bei 2000 g für 30 Minuten zentrifugiert um größere Partikel, wie zelluläre Rückstände und apoptotische Körperchen, zu separieren. Diese setzten sich in Pellets ab, welche verworfen wurden, nachdem der

Überstand in weitere Reagenzgefäße überführt wurde. Der Überstand wurde daraufhin ein weiteres Mal bei 20.000 g für eine Stunde zentrifugiert. Dies entspricht Methoden, die bereits von anderen Gruppen etabliert wurden [67][66][134]. Die Zentrifugation bei 20.000 g erlaubt eine Isolation von Mikropartikeln, welche bei dieser Beschleunigung pelletieren. Die kleineren Exosome verbleiben im Gegensatz dazu im Überstand [134]. Der besagte Überstand wurde verworfen und das entstandene Mikropartikel-Pellet in 300 µl AnnexinV 1xBindpuffer mit BSA resuspendiert. Die Zusammensetzung der Lösung wurde im vorigen Abschnitt erläutert. Die Mikropartikel-Suspension wurde in einem weiteren Schritt gefiltert. Hierzu wurde ein 100 µm Filter verwendet.

3.3 Anfärbung der Mikropartikel mittels Immunfluoreszenz

3.3.1 Die Inkubation der Mikropartikel mit Fc-Block zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen

Um unspezifische Bindung zu verhindern, wurden die zellabstammenden Mikropartikel vor der Färbung mit Fc-Block inkubiert. Der Fc-Block wurde wie im Folgenden beschrieben verdünnt und die Mikropartikelsuspension für eine Stunde bei 4°C mit der Lösung inkubiert.

- Zur Herstellung der Fc-Block-Verdünnung verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Hu-FcR Bindungs-Inhibitor, gereinigt	eBioscience, San Diego, CA, USA
PBS	Sigma, Steinheim, Deutschland
20x AnnexinV Bindpuffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
BSA	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

- Protokoll zur Herstellung des Fc-Blocks für 50 µl Mikropartikelsuspension

11,5 µl PBS

1 µl BSA

2,5 µl Hu-FcR Bindungs-Inhibitor

3.3.2 Färbung der Mikropartikel mit dem Oberflächenmarker AnnexinV

Die inkubierte Mikropartikelsuspension wurde im weiteren Verlauf mit AnnexinV gefärbt. Der unten angegeben Ansatz wurde der zuvor mit Fc-Block behandelten Mikropartikelsuspension hinzugefügt und für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert.

•Auflistung der verwendeten Reagenzien für die AnnexinV-Färbung

Reagenz	Hersteller
AnnexinV-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
AnnexinV-PE-Cy7	eBioScience, San Diego, CA, USA
10x AnnexinV Bindungs Buffer	eBioScience, San Diego, CA, USA

•AnnexinV-Färbung Ansatz

AnnexinV	5 µl
10xAnnexinV Bindungs Buffer	5 µl

3.3.3 Immunhistochemische Anfärbung der Mikropartikel mit tumorspezifischen Antikörpern

Alle verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2: Zur Oberflächenfärbung mittels FACS verwendete Antikörper. Überblick über die in dieser Studie verwendeten Antikörper, ihre Konjugate sowie die Klone, Wirte und Isotypen. Weiterhin wurden die Bestandskonzentrationen, die in dieser Studie verwendete Verdünnungen und der Hersteller aufgelistet.

Antikörper	Konjugat	Klon	Wirt, Isotyp	Bestands- konzentration (µg/µl)	Verdünnungen	Hersteller
CD326	VioBlue	HEA-125	Maus, IgG1	0,0825	1:1000	Miltenyi
CD147	APC	8D12	Maus, IgG1, k	0,1	1:2000	eBioScience
CD66c	APC- Vio770	REA414	Rekombinant, Mensch, IgG1/REA Control(S)	0,055	1:2000	Miltenyi
CD44	eFluor450	IM7	Ratte, IgG2b	0,2	1:2000	ebioScience

Für diese Studie wurden verschiedene Antikörper-Färbungen etabliert. Alle korrespondierende Oberflächenproteine wurden in bereits veröffentlichten Studien als Tumormarker verwendet und auf Extrazellulären Vesikeln nachgewiesen. Zu Beginn der Studie wurden in den Versuchen zusätzlich als Negativkontrolle die Antikörper durch ihre passenden Isotypen ersetzt. Die Verdünnungen der Isotyp-Kontrollen wurden ihren korrespondierenden Antikörpern angepasst. Auf diesem Wege ist es möglich, zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung zu differenzieren.

Es wurden verschiedene Einzel-Färbungen und später Doppel-Färbung getestet, um passende Antikörper für einen Pan-Tumormarker zu finden. Die Antikörper wurden vor Gebrauch zentrifugiert und in PBS (Sigma, Steinheim, Deutschland) und AnnexinV 1xBindepuffer (Herstellung siehe Kapitel 3.2.1.) verdünnt. Für das Protokoll wurde ein Antikörper-Ansatz von 25 µl verwendet. Alle im Folgenden angegebenen Antikörper-Ansätze wurden der zuvor mit AnnexinV gefärbten Mikropartikelsuspension hinzugefügt und für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert.

•Antikörper-Verdünnung

Antikörper	1 µl
PBS	9 µl

•CD66c- , CD44- , CD147- , EpCAM-Einzelfärbungen

Antikörper	1 µl
1xAnnexin V Bindepuffer	25 µl

•EpCAM/CD66c Doppel-Färbung

EpCAM	1 µl
CD66c	1 µl
1xAnnexin V Bindepuffer	25 µl

•EpCAM/CD147 Doppel-Färbung

EpCAM	1 µl
CD147	1 µl
1xAnnexinV Bindepuffer	25 µl

Nach der Inkubation wurde bei den Proben 100 µl PBS (Sigma, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt, sodass ein totales Volumen von 200 µl entstand, von dem 150 µl eingemessen wurden.

3.3.4 Charakterisierung der Mikropartikel mittels Durchflusszytometrie

Die gefärbten Mikropartikel wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden der MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das eine Analyse einzelner Zellen mit Hilfe von Lasern erlaubt. Die Zellen bzw. in diesem Fall die Mikropartikel erzeugen abhängig von Größe, Struktur oder Färbung mit Antikörper-Konjugaten eine Emission optischer Signale, die der Laser detektiert und auswertet. Durch eine Küvette, deren Inneres einen Mikrokanal bildet, fließen alle Zellen bzw. Mikropartikel in einem Flüssigkeitsstrom separiert am Laser vorbei. Dabei werden die Zellen bzw. Mikropartikel nach ihren physikalischen Eigenschaften wie Größe (gemessen mittels Vorwärtsstreulicht, FSC) und innere Zusammensetzung (gemessen mittels Seitwärtsstreulicht, SSC) aufgetragen.

Die Färbung mit verschiedenen Konjugaten, die an spezielle Antikörper gebunden sind und dadurch an Oberflächenproteine der Mikropartikel binden können, erlaubt eine Unterteilung der Partikel in verschiedene Populationen. Der MACSQuant® Analyzer 10 kann zusätzlich zum Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zwischen acht verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen unterscheiden.

3.4 Analyse der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten

Die erhobenen Daten wurden mittels FlowJo 10.0.7® (Ashland, USA) ausgewertet. Die Berechnungen und die Erstellung der Graphen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) und Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Redmond, USA) durchgeführt.

Alle Werte wurden angegeben pro 1000 AnnexinV positive Mikropartikel und teilweise pro ml Serum. Unterschiede zwischen unabhängigen Versuchsgruppen wurden durch einen One-way ANOVA Test und dazugehörigen Post-hoc-Tests ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Graphen als p-Wert angegeben (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,0005$, n.s.= nicht signifikant). Die diagnostische Genauigkeit der Ergebnisse wurde mittels Grenzwertoptimierungskurve (Receiver-Operating-Characteristic-Kurve, ROC) zu erörtern versucht. Den Index der Genauigkeit stellt die Fläche unter der Kurve dar (area under

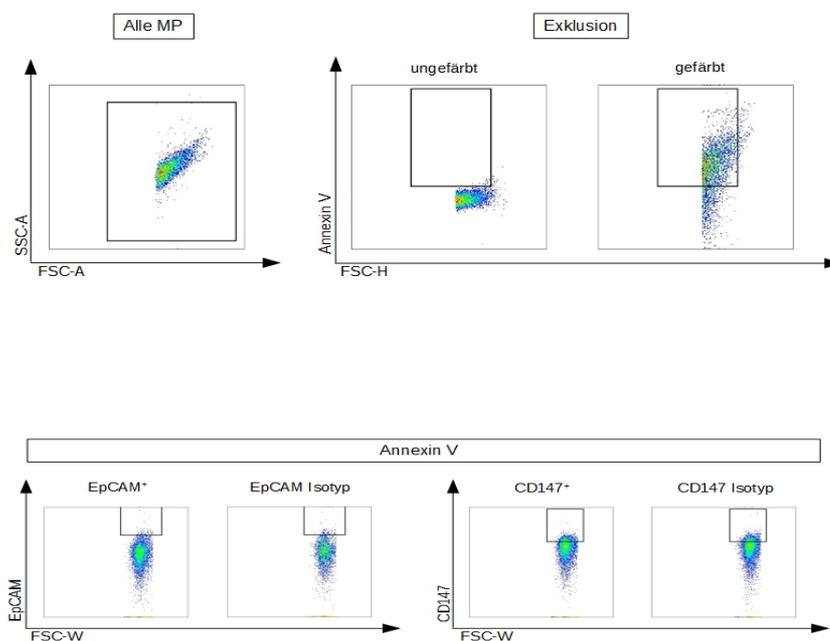
ROC curve, AUROC). Mit Hilfe der AUROC-Werte wurden die Cut-Off-Werte für die tumorassoziierten Mikropartikelpopulationen berechnet. AUROC-Werte, die gegen 1.0 streben, zeigen eine hohe diagnostische Genauigkeit [7]. Als weitere Tests zum Vergleich der Mittelwerte wurden verschiedene Varianten des t-Tests verwendet.

Die Korrelationen wurden nach Spearman berechnet und mit ihrer linearen Regression dargestellt. Der Korrelationskoeffizient gibt den Wert der Korrelation an, wobei ein Wert von 1 eine absolute Korrelation bedeutet und ein Wert von 0, dass kein Zusammenhang zwischen den verglichenen Werten besteht.

4. Ergebnisse

4.1. Die Detektion von tumorassoziierten Mikropartikeln mithilfe tumorspezifischer Antikörper

Die Isolierung von Mikropartikeln aus humanem Serum beinhaltete zwei Zentrifugationsschritte. In der ersten Zentrifugation wurden größere Zellreste wie apoptotische Körperchen aus der Probe entfernt und in der zweiten Zentrifugation die Mikropartikel pelletiert. In einem weiteren Schritt war es möglich, diese mit an Farbstoffe gekoppelte Antikörpern anzufärben und mittels FACS zu messen, um ihre Abstammung zu bestimmen.



Figur 3: Allgemeine Gatingstrategie für jede der folgenden Mikropartikel-Isolierungen. Zuerst werden mittels eines Gates alle Zellreste und Artefakte ausgeschlossen und dann die AnnexinV⁺ MP-Population definiert. Im nächsten Schritt werden Gates für die markerpositiven Mikropartikel gezogen. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben und mit FlowJo 10.0.7® (Ashland, USA) dargestellt.

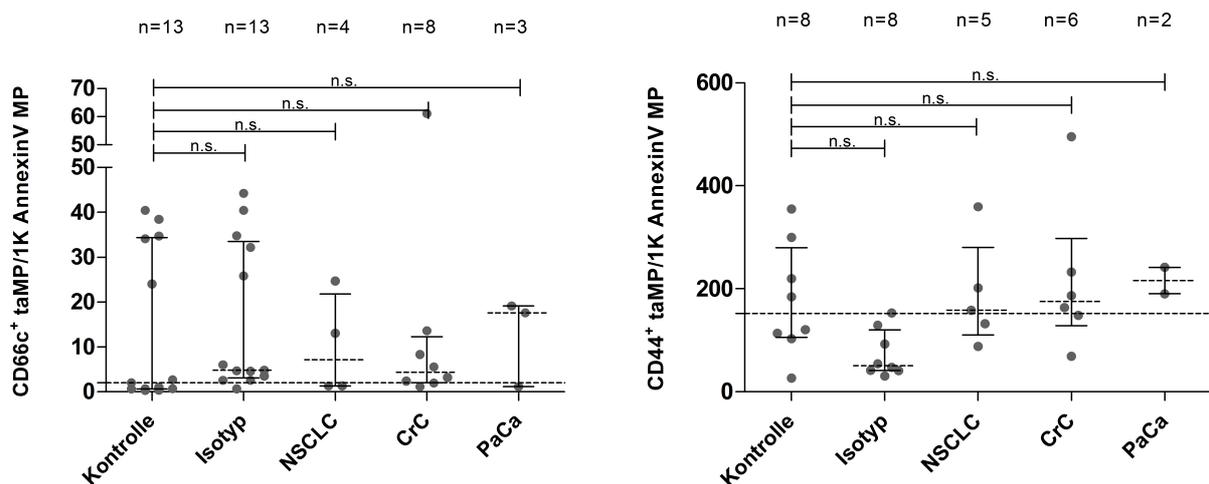
In dieser Studie lag der Fokus auf Mikropartikeln, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von Tumorzellen stammen. Dazu wurden Antikörper getestet, deren Antigene nachweislich von Tumorzellen exprimiert werden.

Alle Proben wurden vor der spezifischen Antikörper-Färbung mit AnnexinV gefärbt. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, welches in der äußeren Membran der Mikropartikel exprimiert wird. Für die Analyse wurde ein für alle Färbungen gültiges Gating-Muster verwendet. Zu Beginn wurde ein Gate gezogen, welches alle positiven Events einbezieht, um dann mittels Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht Zellreste und andere Artefakte auszuschließen. In den nächsten Schritten wurden alle AnnexinV positiven Events weiter analysiert. Eine Kontrollprobe ohne AnnexinV-Färbung diente der Darstellung der negativen Events, um die AnnexinV positiven Mikropartikel zu definieren. Zu den als erste getesteten Oberflächenantikörpern gehörten CD66c und CD44, deren Assoziation mit Tumorerkrankungen bereits gut belegt ist [138][3]. Mit CD66c gefärbte Mikropartikel aus dem Serum von Tumorpatienten zeigen keine signifikante Anreicherung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Die Abbildung zeigt die Anzahl tumorassoziierter Mikropartikel pro 10^3 AnnexinV positive Mikropartikel für vier Patienten mit NSCLC, acht Patienten mit CrC und drei Patienten mit PaCa im Vergleich zu der Kontrollgruppe, für welche auch die Isotypkontrollen dargestellt sind (n=13). Ebenfalls für jede Gruppe angegeben sind der Interquartilabstand und der Median, welcher für die Kontrollgruppe bei 1,985 CD66c⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP, für die Patienten mit NSCLC bei 7,186 CD66c⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP, für die Patienten mit CrC bei 4,377 CD66c⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP und für diejenigen mit PaCa bei 7,62 CD66c⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP, liegt. Zwar liegt damit der Median bei den Patienten mit PaCa deutlich über dem der Kontrollgruppe, deren Werte umfassen jedoch eine so große Bandbreite (Minimum: 0,3141; Maximum: 40,38), dass bei einem Vergleich mittels Dunnets Test bei einer Probenzahl von n=3 für das PaCa keine Signifikanz besteht. Wegen der großen Bandbreite schon bei der Kontrollgruppe ist der Marker CD66c nicht weiter als potenzieller allgemeinen Tumormarker in dieser Studie berücksichtigt worden.

Ein weiterer untersuchter Marker, der ausgeschlossen wurde, ist CD44. Hier zeigen sich zwischen den Patienten mit NSCLC (n=5), CrC (n=6) und PaCa (n=2) und der Kontrollgruppe (n=8) kaum Unterschiede in der Anzahl der markerpositiven Mikropartikel pro 10^3 AnnexinV positiven Mikropartikeln. Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 152,4 CD44⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP, der der Patienten mit NSCLC bei 58,3 CD44⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP und bei Patienten mit CrC bei 175,1 CD44⁺ taMP/ 10^3 AnnexinV⁺ MP. Die Tumorpatienten zeigen also eine ähnlich hohe Expression CD44 positiver Mikropartikel im Serum wie gesunde Probanden. Daher eignet sich den Ergebnissen dieser Studie zufolge auch dieser Antikörper nicht als Marker für tumorassozierte Mikropartikel. Für alle

Färbungen wurden die Antikörper in den Experimenten zu Beginn gegen ihre passenden Isotypen ausgetauscht. Isotypen sind Antikörper, die zur selben Immunglobulin-Klasse gehören wie der verwendete spezifische Antikörper, binden aber im Gegensatz zu ihm nicht an das gewünschte Antigen, sondern haben entweder eine unbekannte Bindungsstelle oder binden an ein Antigen, das voraussichtlich nicht auf den in der Studie verwendeten Zellen vorkommt [52]. Sie stellen also eine Kontrolle für Hintergrundsignale durch unspezifische Bindungen dar.

Eine weitere Färbung mit dem Antikörper gegen CD147, der neben seiner zentralen Rolle in der Progression vieler Tumorarten auch eine wichtige physiologische Rolle in einigen Organsystemen spielt [137], zeigt eine hohe Anzahl positiver Mikropartikel im Serum aller in der Studie untersuchten Tumorentitäten. Wie bei der Färbung mit CD44 findet sich auch hier eine relativ hohe Anzahl CD147 positiver Mikropartikel im Serum von gesunden Probanden (n=49).



Figur 4: Nachweis von CD66c⁺ und CD44⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP in humanem Serum. Es wurden MP aus dem Serum isoliert von Tumorpatienten (NSCLC, CrC, PaCa) und von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle). Um die positiven Mikropartikelpopulationen zu isolieren wurden Isotypen der verwendeten Antikörper verwendet. Die Anzahl der taMP wird pro 10³ AnnexinV⁺ MP angegeben. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, und die Auswertung und Berechnungen (OneWayANOVA mit Dunnets multiplum Vergleichstest) wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

Nur bei Patienten mit NSCLC (n=40) ist eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollpersonen bei der Durchführung eines OneWayAnova Tests mit Dunnets post Test

zu erkennen.

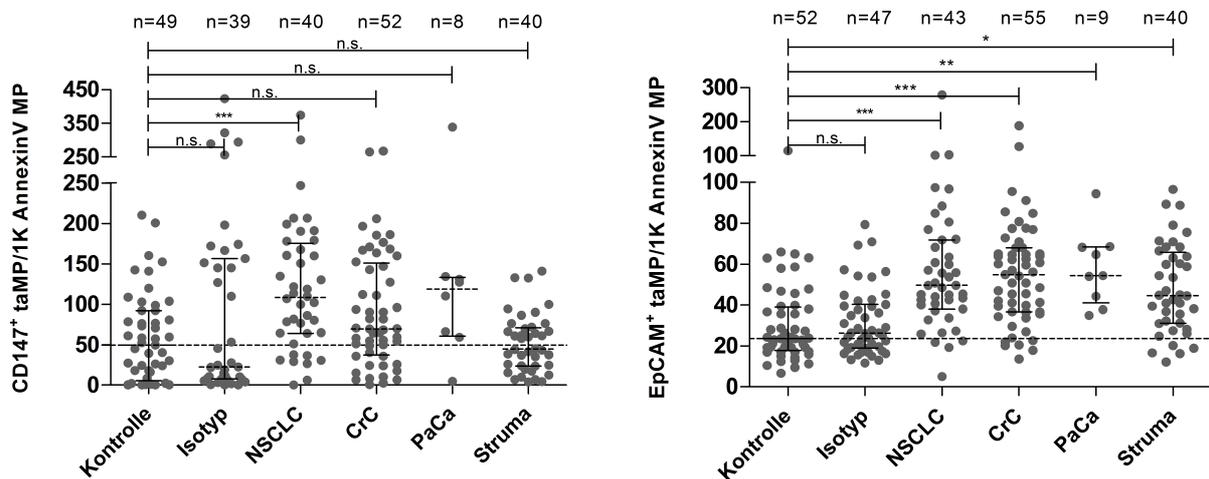
Eine leichte Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollpersonen zeigt sich auch bei den Proben aus dem Serum von Patienten mit CrC (n=52) und PaCa (n=8). Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 49,58 taMP/10³ AnnexinV⁺ MP, während der der Patienten mit CrC bei 69,64 taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und der der Patienten mit PaCa bei 118,7 taMP/10³ AnnexinV⁺ MP liegt. Der Median der Patienten mit PaCa ist mehr als doppelt so hoch wie der der Kontrollgruppe, doch eine Signifikanz ist durch den OneWayAnova Test nicht feststellbar, was durch die niedrige Anzahl der Proben bedingt sein kann. Die Strumapatienten zeigen hingegen eine den Kontrollpersonen ähnliche Anzahl CD147 positiver Mikropartikel im Serum (Median=44,59 taMP/10³ AnnexinV⁺ MP). In der unten dargestellten Tabelle sind die Ergebnisse der ROC-Kurven Berechnung und der damit verbundenen Berechnung der AUROC-Werte aufgelistet. Der AUROC Wert soll Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit geben, ob eine zufällig ausgewählte Patientenprobe ein höheres Testergebnis hat als eine zufällig ausgewählte Kontrollprobe. Für die mit CD147 gefärbten Mikropartikel ergeben sich hier keine ausreichend signifikanten Werte, auch wenn durch die p-Werte gezeigt wird, dass der Test die kranken von den gesunden Proben unterscheiden kann, doch nicht mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, was die niedrigen AUROC-Werte widerspiegeln. Der AUROC-Wert für die Patienten mit Struma strebt gegen 0,5, ein Zeichen dafür, dass hier fast keine Wahrscheinlichkeit besteht, eine gesunde Probe von einer kranken Probe abzugrenzen.

Tabelle 3: Diagnostische Leistung der CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP als Pan-Tumormarker. Angegeben sind die Tumorentitäten und die Anzahl der gemessenen Proben mit ihrem Median, der AUROC-Kurve, der Standardabweichung und dem p-Wert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Anzahl Proben	Median taMP/10³ MP	AUROC	SD	p-Wert
NSCLC	40	108,4	0,7490	0,05150	< 0,0001
CrC	52	69,64	0,6487	0,05438	0,01004
PaCa	8	118,7	0,7398	0,09137	0,03086
Struma	40	44,59	0,5097	0,06187	0,8755
Kontrolle	49	49,58			

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD147 zwar alleine nicht als Pan-Tumormarker verwendet werden kann, aber er zur Diskriminierung zwischen Tumorpatienten und Patienten mit

anderen nicht malignen Erkrankungen nützlich sein könnte. Ein bekannter Tumormarker, dessen Beteiligung an kanzerogenen Prozessen schon von vielen Gruppen bestätigt wurde, ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM/CD326). Es wird zwar auch auf dem Epithel gesunder Menschen exprimiert [120], ist aber vorrangig durch seine Überexpression bei vielen Tumorentitäten bekannt [129].



Figur 5: Nachweis von EpCAM⁺ und CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP in humanem Serum. Es wurden MP aus dem Serum isoliert von Tumorpatienten (NSCLC,CrC,PaCa), von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) sowie von Patienten mit Struma (Struma). Um die positiven Mikropartikelpopulationen zu isolieren, wurden Isotypen der verwendeten Antikörper verwendet. Die Anzahl der taMP wird pro 10³ AnnexinV⁺ MP angegeben. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, und die Auswertung und Berechnungen (OneWayANOVA mit Dunnets multiplem Vergleichstest) wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,0005$, n.s.= nicht signifikant.

Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Anzahl EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei den Tumorerkrankten. Bei Patienten mit CrC sind sie im Vergleich zu denen im Serum gesunder Probanden 2,3-fach erhöht (Median=54,84 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP), bei Patienten mit NSCLC 2,1-fach (Median=49,66 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP). Insgesamt wurden 109 Proben von Patienten mit CrC (n=55), NSCLC (n= 43) und PaCa (n= 8) getestet. Die geringe Anzahl der Patienten mit PaCa könnte eine Erklärung sein, warum hier keine Signifikanz festgestellt werden kann, obwohl der Median mit 54,40 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP deutlich über dem der gesunden Proben (Median=23,54 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP) liegt. Überraschenderweise zeigen auch die Strumapatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe 1,8-fach erhöhte Anzahlen EpCAM⁺

taMP/10³ AnnexinV⁺ MP.

Die diagnostische Relevanz wird auch durch die dazugehörigen AUROC-Kurven verdeutlicht. Tabelle 4 stellt eine Zusammenfassung der berechneten Cut-off-Werte sowie andere AUROC assoziierter Werte dar.

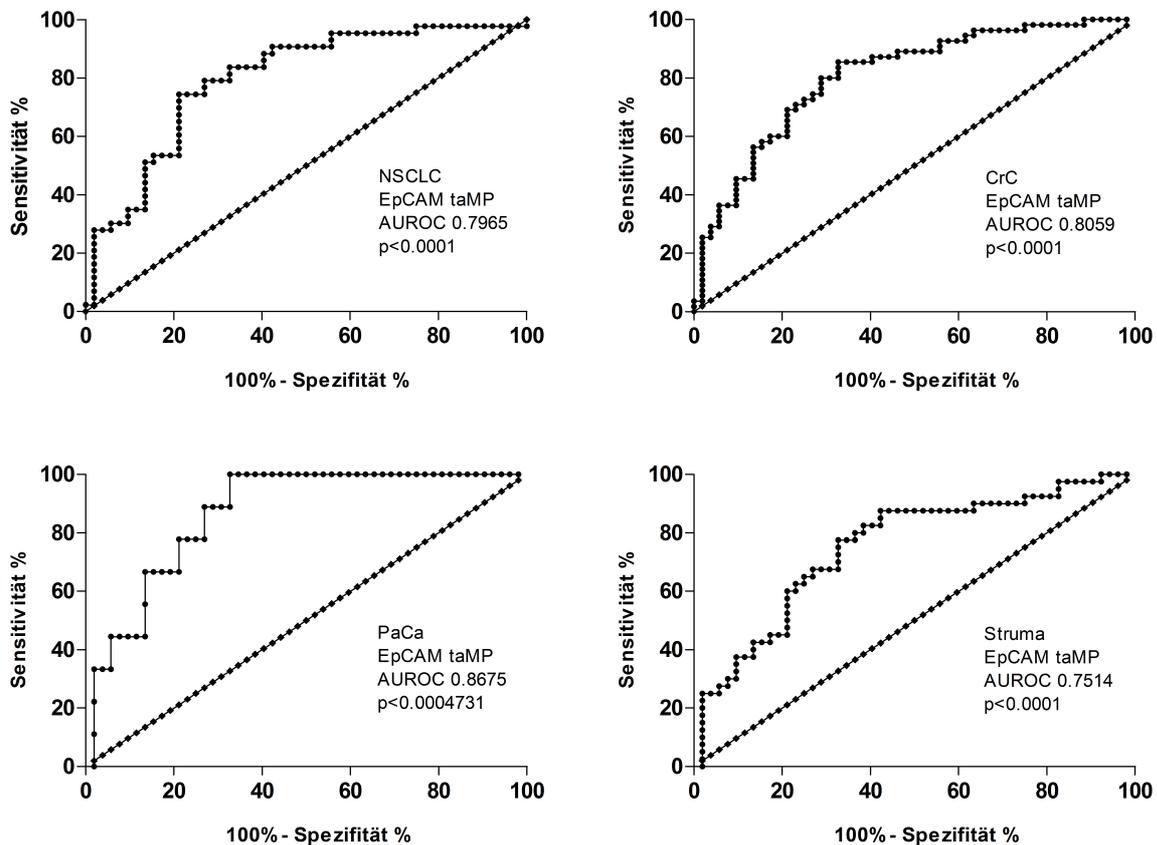
Tabelle 4: Diagnostische Leistung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP als Pan-Tumormarker.

Angegeben sind die Tumorentitäten mit der Anzahl der eingemessenen Proben und Cut-Off-Werten, ihre berechneten Mediane, die AUROC-Kurve mit Standardabweichung und p-Wert sowie die Sensitivität und Spezifität entsprechend der Cut-Off-Werte. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Cut-Off taMP/10 ³ MP	Median taMP/10 ³ MP	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	AUROC	SD	p-Wert
NSCLC	36,19	49,66	79,07	71,15	0,7965	0,04655	< 0,0001
CrC	36,70	54,84	74,55	73,08	0,8059	0,04224	< 0,0001
PaCa	37,20	54,40	88,89	73,08	0,8675	0,04973	0,0004731
Struma	28,01	44,61	80,00	63,46	0,7514	0,05169	< 0,0001
Kontrolle		23,54					

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass EpCAM besonders für Patienten mit CrC eine hohe Wahrscheinlichkeit hat die Erkrankten von den gesunden Kontrollen zu differenzieren. Hier zeigt sich auch für die Gruppe der Patienten mit PaCa ein hoher AUROC-Wert. Daraus lässt sich eine Tendenz ableiten, dass EpCAM für diese Entität ebenfalls als geeigneter Marker fungieren kann, dies aber noch durch eine höhere Fallzahl bestätigt werden muss. Für die Gruppe der NSCLC-Patienten zeigt sich trotz einer signifikanten Erhöhung der Werte im Dunnets Test kein zu dem Ergebnis passender AUROC-Wert. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Patienten mit NSCLC eine im Durchschnitt geringere Erhöhung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP zeigen. Die Tabelle stellt zudem die Sensitivität und Spezifität der Messung dar. Bei einem Cut-off-Wert von 36,19 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP für das NSCLC liegt die Sensitivität bei 79,07% und die Spezifität bei 71,15. Bei einem ähnlichen Cut-off-Wert von 36,70 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP liegen die Sensitivität und Spezifität bei 74,55 % und 73,08% für die Erkennung des CrC. Das PaCa hat einen hohen Cut-Off-Wert (37,20 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP) bei guter Sensitivität (88,89%) und Spezifität (73,08%). Die niedrigen p-Werte lassen zudem die Vermutung zu, dass die Messung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum zwischen Kranken und Gesunden unterscheiden kann.

Interessant ist, dass auch die Gruppe der Strumapatienten eine signifikante Erhöhung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP zeigt. Der AUROC-Wert beträgt hier aber nur 0,7514, sodass man ebenfalls von einer im Durchschnitt nur leichten Erhöhung im Vergleich mit der Kontrollgruppe ausgehen kann.

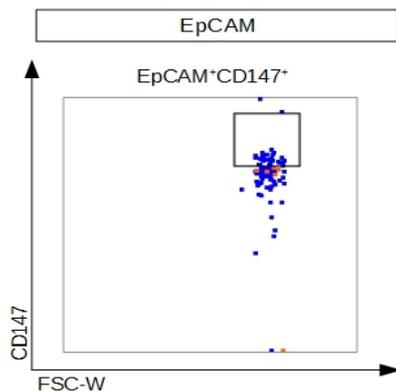


Figur 6: ROC-Kurven für die EpCAM⁺ taMP. Dargestellt sind die ROC Kurven für Patienten mit NSCLC, CrC, PaCa und Struma. Die Winkelhalbierende markiert die Identitätslinie, welche die untere Grenze der diagnostischen Leistung darstellt. Ebenfalls angegeben sind die AUROC-Werte und die zugehörigen p-Werte. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Von den getesteten Oberflächenmarkern eignet sich für diese Studie vor allem EpCAM und unter Einschränkung CD147 als Pan-Tumormarker. Mit CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP kann nicht effizient zwischen Kranken und Gesunden unterschieden werden, und auch bei EpCAM entsteht eine Problematik durch die fehlende Abgrenzbarkeit der Tumorerkrankten von den Strumapatienten, die ebenfalls eine hohe Anzahl EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum aufweisen.

Eine weiterführende Überlegung ist es daher, eine Kombination dieser beiden Marker zu

benutzen. Im Vorfeld wurde eine Kombination von AnnexinV, EpCAM und CD66c getestet, diese ist aber nicht sehr vielversprechend (Figur 8A). Für keine der Tumorentitäten lässt sich ein signifikanter Unterschied zu den gesunden Proben feststellen. Die anschließende Testung der Kombination AnnexinV, EpCAM und CD147 ist dagegen sehr vielversprechend. Das Gatingprotokoll wurde erweitert, um die EpCAM⁺CD147⁺ taMP von den Events abzugrenzen, die nur einen der beiden Marker exprimieren (Figur 7).



Figur 7: Erweiterung der Gatingstrategie für die Detektion doppelt markerpositiver Mikropartikel.

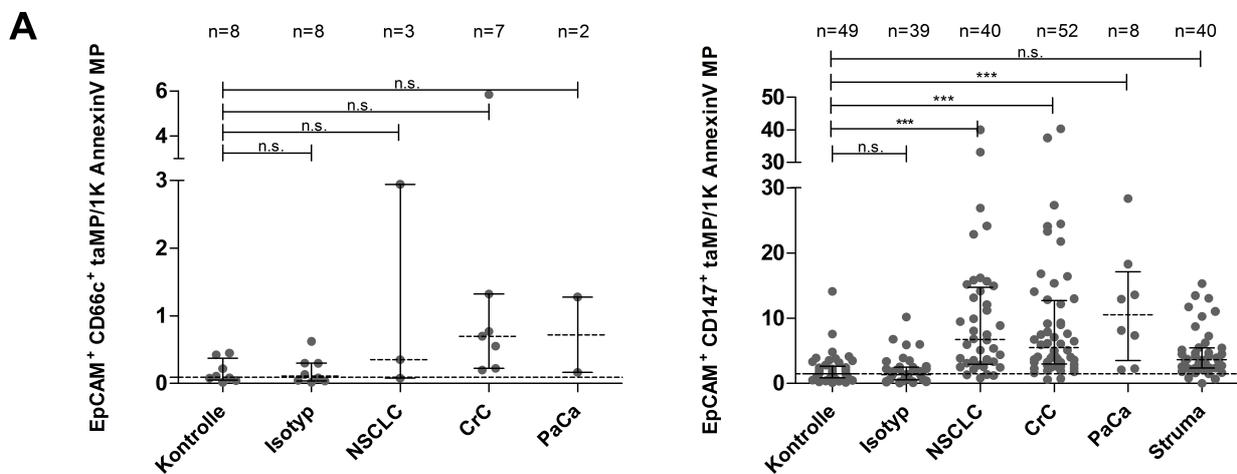
Das in Figur 3 beschriebene Gating wird erweitert, um die EpCAM⁺CD66c⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP-Population zu definieren. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben und mit FlowJo 10.0.7® (Ashland, USA) dargestellt.

Alle drei untersuchten Tumorentitäten zeigen eine deutlich signifikante Erhöhung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum im Vergleich zu den gesunden Proben. Die Kontrollgruppe besitzt einen Median von 1,483 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP, die der Tumorpatienten liegen deutlich höher. Für das NSCLS liegt er bei 6,744 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP, für die Patienten mit CrC bei 5,518 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und für jene mit PaCa bei 10,52 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP. Die Patienten mit CrC zeigen somit 3,7-fach erhöhte Werte, die Patienten mit NSCLC und PaCa 4,5- und 7,1-fach erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Proben. Auch die Berechnung der AUROC-Kurven verdeutlicht die diagnostische Signifikanz. Tabelle 5 zeigt einen Überblick über die gemessenen AUROC-assoziierten Werte sowie die Cut-Off-Werte mit Sensitivität und Spezifität für den Test.

Ein wichtiger Unterschied zu den Ergebnissen aus dem Test, in dem nur EpCAM⁺ tumorassoziierte Mikropartikel gemessen wurden, ist, dass bei der Kombination dieser drei Marker die Strumapatienten keine signifikante Erhöhung der taMP gegenüber der

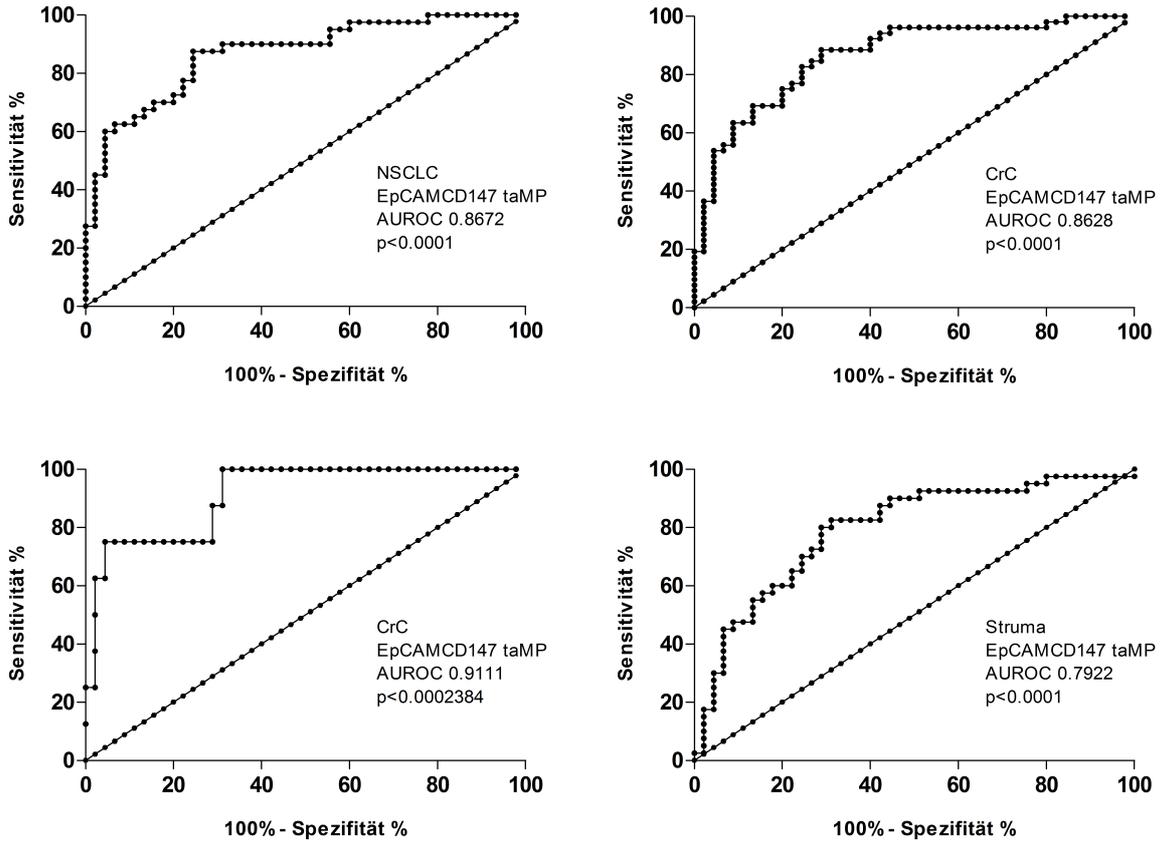
Kontrollgruppe aufweisen. Der Median beträgt 3,650 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP, und der AUROC-Wert von 0,7922 lässt darauf schließen, dass der Test Strumapatienten nicht von Gesunden diskriminieren kann.

Vergleicht man im Dunnets Test die Strumapatienten mit den Tumorpatienten, so lässt sich auch hier ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum feststellen. Damit lassen sich durch die Kombination von AnnexinV, EpCAM und CD147 die Tumorentitäten auch von anderen Krankheiten abgrenzen, was mit AnnexinV und EpCAM sowie mit AnnexinV und CD147 alleine nicht möglich ist.



Figur 8A: Nachweis von EpCAM⁺Cd66c⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP in humanem Serum. Es wurden MP aus dem Serum isoliert von Tumorpatienten (NSCLC, CrC, PaCa), von gesunden Kontrollpersonen (Kontrolle) sowie von Patienten mit Struma (Struma). Um die positiven Mikropartikelpopulationen zu isolieren wurden Isotypen der verwendeten Antikörper getestet. Die Anzahl der taMP wird pro 10³ AnnexinV⁺ MP angegeben. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie und die Auswertung und Berechnungen (OneWayANOVA mit Dunnets multiplem Vergleichstest) wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

B



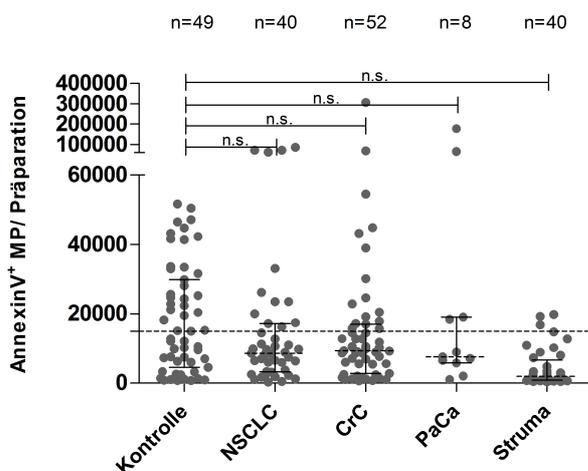
Figur 8B: ROC-Kurven für die EpCAM⁺CD147⁺ taMP. Dargestellt sind die ROC Kurven für Patienten mit NSCLC, CrC, PaCa und Struma. Die Winkelhalbierende markiert die Identitätslinie, welche die untere Grenze der diagnostischen Leistung darstellt. Ebenfalls angegeben sind die AUROC-Werte und die zugehörigen p-Werte.

Tabelle 5: Diagnostische Leistung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP als Pan-Tumormarker. Angegeben sind die Tumorentitäten mit der Anzahl der eingemessenen Proben und Cut-Off-Werten, ihre berechneten Mediane, die AUROC-Kurve mit Standardabweichung und p-Wert sowie die Sensitivität und Spezifität entsprechend der Cut-Off-Werte. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Cut-Off taMP/10 ³ MP	Median taMP/10 ³ MP	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	AUROC	SD	p-Wert
NSCLC	2,780	6,744	77,50	75,56	0,8672	0,03876	< 0,0001
CrC	2,382	5,518	84,62	71,11	0,8628	0,03723	< 0,0001
PaCa	2,242	10,52	87,50	71,11	0,9111	0,05020	0,0002384
Struma	2,023	3,650	82,50	64,44	0,7922	0,04994	< 0,0001
Kontrolle		1,483					

4.1.1 Vergleich der Ergebnis-Auswertung pro 1000 AnnexinV positiver MP mit der Ergebnis-Auswertung pro 1 ml Serum

In den bisher betrachteten Abbildungen wird die Anzahl der tumorassoziierten Mikropartikel pro 1000 AnnexinV positiver Mikropartikel angegeben. Diese Darstellung ist sinnvoll, da jeder Proband eine individuelle Anzahl Mikropartikel im Blut hat. Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 14917 AnnexinV⁺ MP pro Mikropartikelisolation. Damit liegt die Anzahl der Mikropartikel von gesunden Patienten etwas über der Anzahl der Mikropartikel im Serum der Tumorpatienten und der Strumapatienten. Der Median der Patienten mit NSCLC liegt bei 8626 AnnexinV⁺ MP pro Mikropartikelisolation, der der Patienten mit CrC bei 9355 AnnexinV⁺ MP pro Mikropartikelisolation und der der PaCa-Patienten bei 7622 AnnexinV⁺ MP pro Mikropartikelisolation. Die Strumapatienten weisen mit einem Median von 1909 AnnexinV⁺ MP pro Mikropartikelisolation die geringste Anzahl Mikropartikel im Serum auf. Trotz der Unterschiede ist durch die große Spannweite der Mikropartikelanzahl kein signifikanter Unterschied der Anzahl der taMP im Serum der einzelnen Patienten zu der Anzahl der taMP im Serum gesunder Probanden zu erkennen.



Figur 9: Totale Anzahl AnnexinV⁺ MP pro MP-Isolation aus humanen Serumproben. Der dargestellte Scatterplot stellt die gemessenen AnnexinV⁺ MP Anzahlen der Tumorpatienten (NSCLC, CrC, PaCa), gesunder Kontrollpersonen (Kontrolle) sowie Patienten mit Struma (Struma) dar. Die Auswertung und Berechnungen erfolgte mittels Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) (OneWayANOVA mit Dunnets multiplem Vergleichstest). Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

Durch die große Spannweite der Mikropartikel im Serum der einzelnen Probanden bedingt zeigt eine Darstellung der Anzahl tumorassoziiertes Mikropartikel pro 1 ml Serum nicht für alle Tumorentitäten signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Figur 10). Im Unterschied zu der Berechnung pro 1000 AnnexinV positiven MP zeigt sich hier für das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom keine signifikante Erhöhung der EpCAM⁺ taMP im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch bei den Strumapatienten ist keine signifikante

Erhöhung erkennbar, was dem eigentlich zu erwartenden Ergebnis entspricht, da EpCAM nicht als Oberflächenmarker des thyreoidalen Gewebes bekannt ist. Aus den AUROC-Kurven für die signifikant erhöhten Gruppen (CrC und PaCa) ist ersichtlich, dass auch die diagnostische Relevanz im Vergleich zur Darstellung pro 1000 AnnexinV positiven MP sinkt. Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Für die Anzahl EpCAM⁺CD147⁺ taMP pro ml Serum für die jeweiligen Tumorentitäten sowie für die Kontrollgruppe und Strumapatienten zeigt sich ein ähnliches Ergebnis. Die Anzahl der tumorassoziierten Mikropartikel ist bei den Patienten mit CrC und Struma nicht signifikant erhöht. Bei den Patienten mit NSCLC zeigt sich eine weniger signifikante Erhöhung mit einem AUROC-Wert von 0,7950.

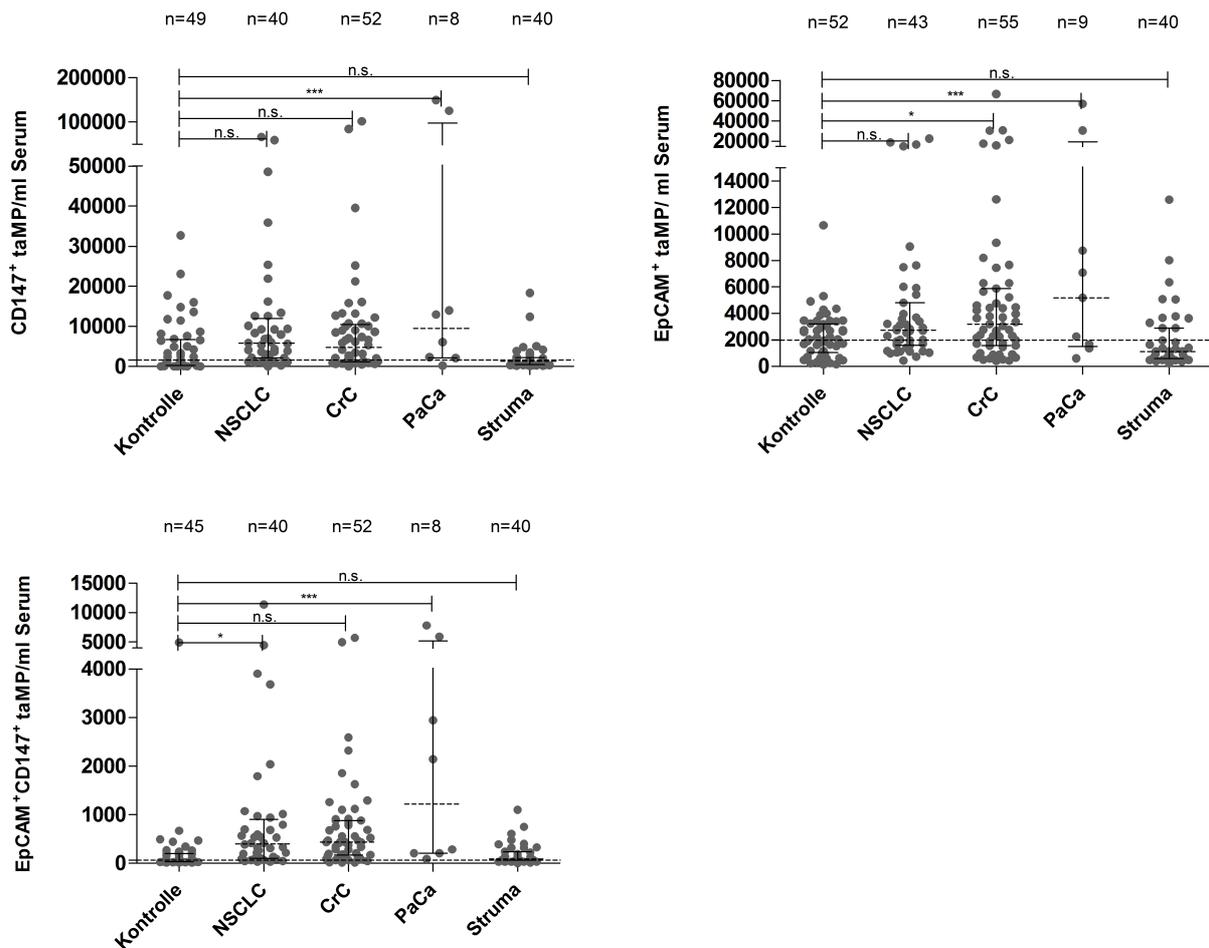
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Messungen der markerpositiven taMP/ml Serum für Patienten mit NSCLC, CrC, PaCa und Struma. Gezeigt sind die Entität und die gemessene Anzahl der Proben, die zugehörigen Mediane, die AUROC-Werte, die Standardabweichung und der p-Wert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Tumormarker	Anzahl Proben	Median taMP/ml	AUROC	SD	p-Wert
NSCLC	EpCAM	43	2734	0,6254	0,05756	0,03602
	EpCAM/CD147	40	402,3	0,7950	0,04851	< 0,0001
	CD147	40	5766	0,6888	0,05583	0,002287
CrC	EpCAM	55	3190	0,6626	0,05264	0,003768
	EpCAM/CD147	52	437,8	0,8064	0,04487	< 0,0001
	CD147	52	4753	0,6350	0,05536	0,01945
PaCa	EpCAM	9	5184	0,6987	0,1153	0,05865
	EpCAM/CD147	8	1215	0,8667	0,05911	0,001047
	CD147	8	9514	0,7219	0,09846	0,04569
Struma	EpCAM	40	1128	0,6084	0,06264	0,07578
	EpCAM/CD147	40	96	0,5908	0,06237	0,1501
	CD147	40	1280	0,5620	0,06210	0,3163
Kontrolle	EpCAM	52	1995			
	EpCAM/CD147	45	64			
	CD147	49	1584			

Nur bei den Patienten mit PaCa ist eine deutlich signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollwerten zu erkennen. Der AUROC-Wert liegt bei 0,8667.

Für die CD147⁺ taMP pro 1 ml Serum zeigt sich nur bei Patienten mit PaCa eine deutliche

Erhöhung der Werte. Zusammenfassend eignet sich die Messung der tumorassoziierten Mikropartikel pro 1 ml Serum für diese Studie nicht. Durch die Berechnung pro 1000 AnnexinV positiver Mikropartikel wird die Divergenz zwischen den Patienten ausgeglichen und erlaubt einen besseren Vergleich zwischen den Gruppen. Aus diesem Grund sind in den folgenden und vorangegangenen Teilen der Arbeit die Anzahl tumorassoziiertes Mikropartikel pro 1000 AnnexinV positiven Mikropartikel angegeben.

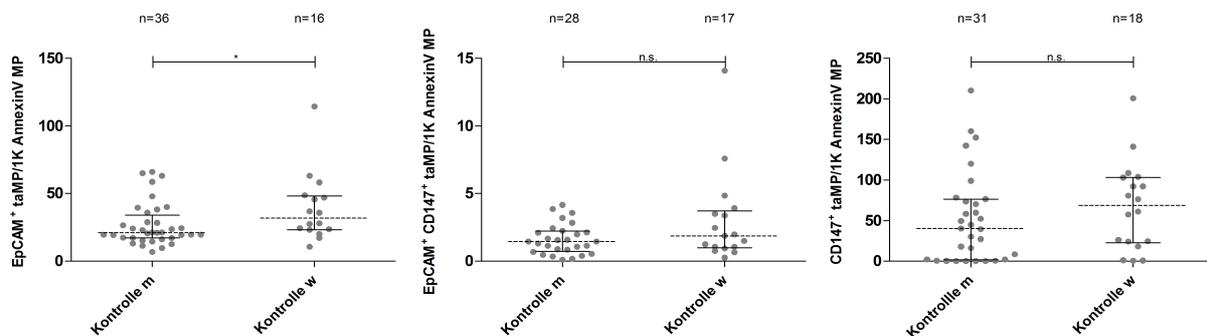


Figur 10: Darstellung der bisherigen Ergebnisse für CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP pro ml Serum. Die totalen Anzahlen CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP wurden für 1 ml Serum berechnet und mittels Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) verglichen (OneWayANOVA mit Dunnets multiplem Vergleichstest). Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

4.2 Der Einfluss des Geschlechts auf die Expression tumorassoziierter Mikropartikel im Serum von Patienten mit CrC, NSCLC, PaCa und Struma

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist, ob das Geschlecht der Patienten einen Einfluss auf die Anzahl der tumorassozierten Mikropartikel im Blut hat. Die Proben wurden zu diesem Zweck gekennzeichnet, sodass eine Zuordnung zu dem jeweiligen Geschlecht möglich war. Es wurde eine statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Es zeigt sich, dass zwischen Männern und Frauen überwiegend kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der tumorassozierten Mikropartikel besteht.

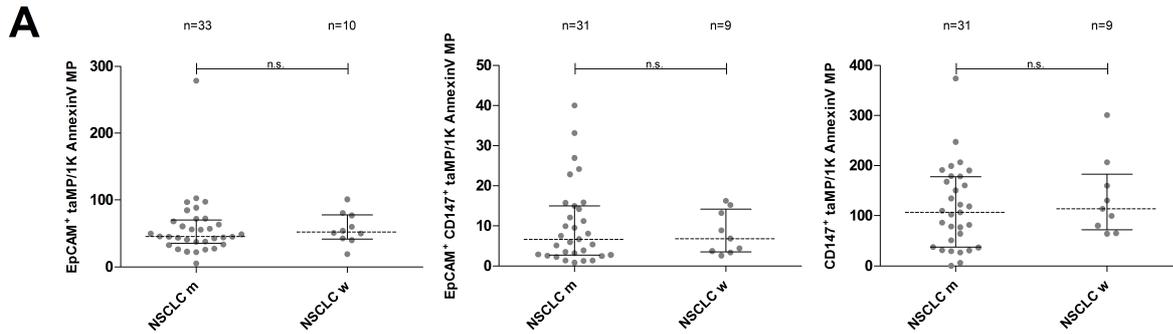
In der Kontrollgruppe (Figur 11) weisen Frauen bei der Messung von EpCAM⁺ taMP eine leichte Erhöhung im Vergleich zu Männern auf ($p=0,0383$). Dies trifft aber nicht auf die Messung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP und CD147⁺ taMP zu.



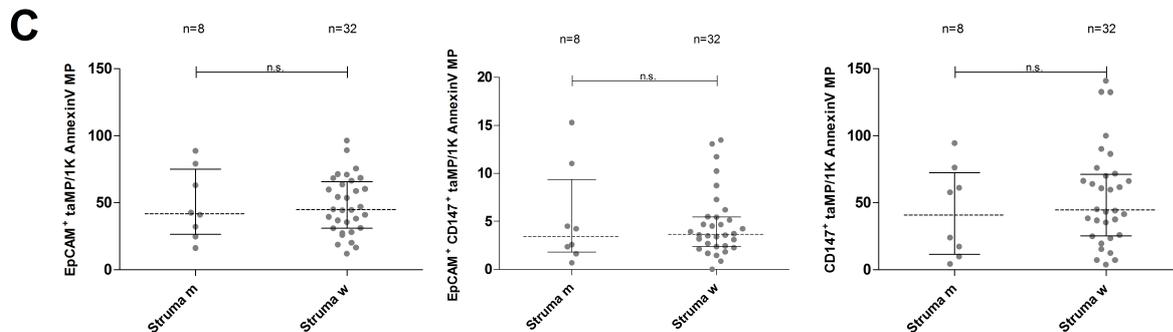
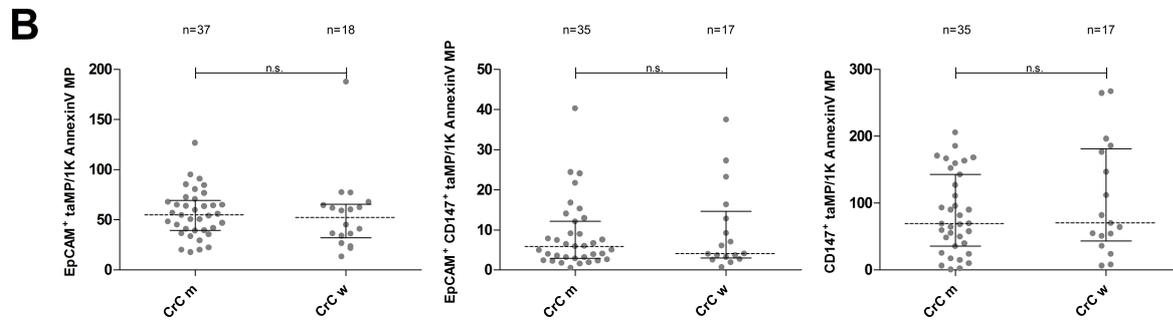
Figur 11: Anzahl der CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei Kontrollpersonen getrennt nach Geschlecht. Die Mediane der Gruppen wurden mittels Mann Whitney Test (two-tailed) verglichen und die Berechnungen mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

Bei den Patienten mit NSCLC, CrC und Struma gibt es keinen signifikanten Unterschied in den Mikropartikelanzahlen zwischen den Geschlechtern (Figur 12).

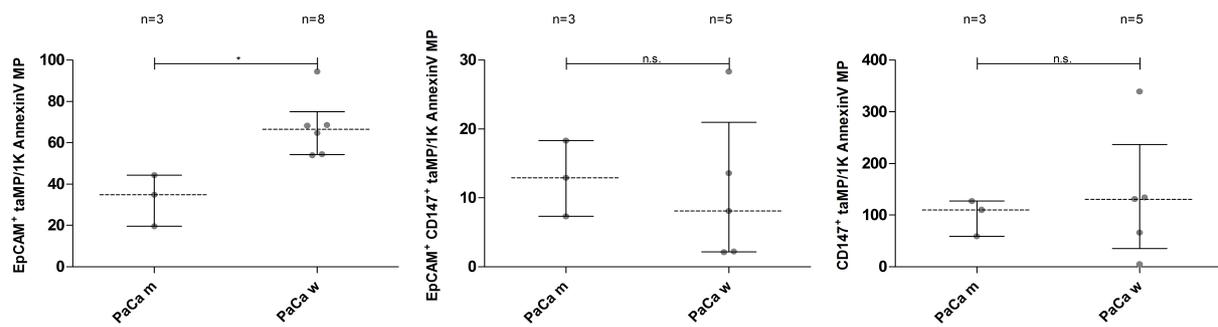
Bei Patienten mit PaCa (Figur 13) zeigen Frauen leicht erhöhte EpCAM⁺ taMP-Werte ($p=0,0238$). Bei der Messung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP und CD147⁺ taMP gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl zwischen Männern und Frauen. Die Aussagekraft des Test ist bei männlichen Patienten aufgrund der niedrigen Fallzahl als eingeschränkt zu betrachten.



Figur 12A: Anzahl der CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei Patienten mit NSCLC. Die Mediane der Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U Test (two-tailed) verglichen und die Berechnungen mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.



Figur 12B und C: Anzahl der CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei Patienten mit CrC (B) und Struma (C). Die Mediane der Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-u Test (two-tailed) verglichen und die Berechnungen mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

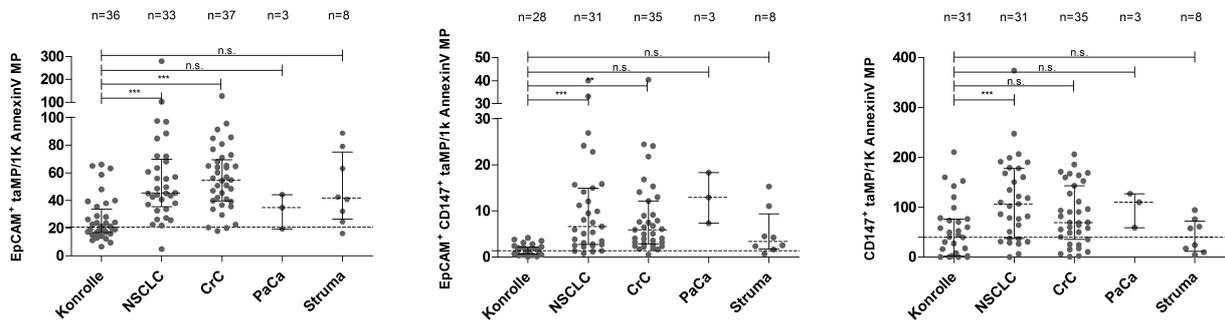


Figur 13: Anzahl der CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei Patienten mit PaCa. Die Mediane der Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U Test (two-tailed) verglichen und die Berechnungen mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

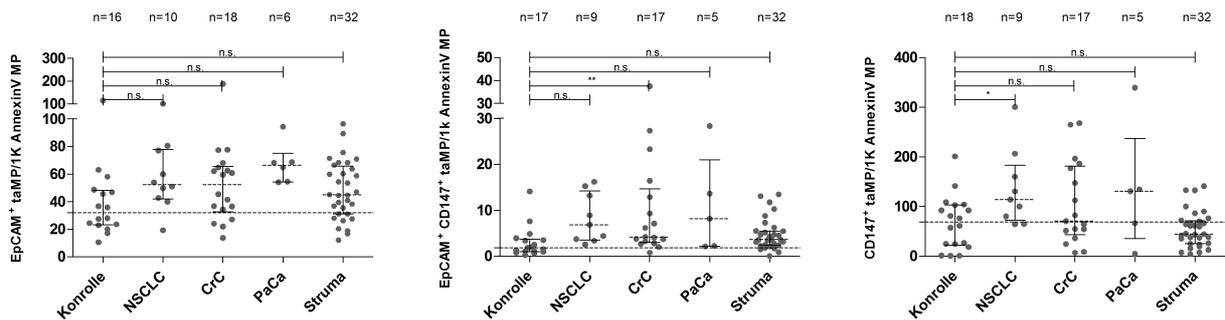
Betrachtet man die Ergebnisse getrennt nach Geschlecht im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zeigt sich, dass AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP bei Männern mit NSCLC (n=36) und CrC (n=37) signifikant erhöht sind (Figur 14). Die Gruppen der Patienten mit PaCa und Struma sind mit Fallzahlen von n=3 und n=8 sehr klein. Hier ist keine Signifikanz zu erkennen, was auch an der eingeschränkten Beurteilungsfähigkeit aufgrund der zu geringen Fallzahl liegen kann. Es ist aber ein Trend ersichtlich, dass sich bei beiden Gruppen eine höhere Anzahl taMP im Blut findet, wenn man die Mediane mit denen der Kontrollgruppe vergleicht. Der der Patienten mit PaCa liegt bei 34,90 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und der der Patienten mit Struma bei 41,70 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP.

Trotz einer höheren Fallzahl (n= 32) zeigen auch Frauen mit Struma im Vergleich zur weiblichen Kontrollgruppe keine signifikante Erhöhung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP (Median=44,90 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP). Dies kann im Zusammenhang mit den im Durchschnitt leicht höheren Werten der gesunden weiblichen Probanden (n= 16) stehen. Ebenfalls dadurch bedingt und durch die niedrigen Fallzahlen (NSCLC=10, CrC=18, PaCa=6) zeigt sich auch für die Tumorentitäten keine signifikante Erhöhung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum weiblicher Patienten (Figur 15). Aber auch hier ist anhand der Mediane ein Trend ersichtlich. Der Median der weiblichen Kontrollgruppe beträgt 31,84 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP. Der Median der Patientinnen mit NSCLC liegt bei 52,28 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP, der der Patientinnen mit CrC bei 52,37 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und der der Patientinnen mit PaCa bei 66,46 EpCAM⁺

taMP/10³ AnnexinV⁺ MP. Die Mediane sowie die ebenfalls berechneten AUROC Werte sind in der unten stehenden Tabelle zusammengefasst.



Figur 14: Anzahl der CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei männlichen Patienten mit NSCLC, CrC, PaCa und Struma im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse wurden mittels OneWayANOVA mit Dunnett's Multiplen Vergleichs Test erhoben und die Berechnungen mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.



Figur 15: Anzahl der CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei weiblichen Patienten mit NSCLC, CrC, PaCa und Struma im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse wurden mittels OneWayANOVA mit Dunnett's Multiplen Vergleichs Test erhoben und die Berechnungen mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

Betrachtet man nun die Messungen von EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei Männern und Frauen mit Tumorerkrankungen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen, zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier führt die Aufteilung der Geschlechter zu niedrigen Fallzahlen in manchen Gruppen. Die Fallzahl männlicher Patienten mit PaCa beträgt 3, und so zeigt sich trotz des im Vergleich zur Kontrollgruppe stark erhöhten Median (12,91 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP) keine Signifikanz.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Messungen der markerpositiven taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum für Patienten mit NSCLC, CrC, PaCa und Struma getrennt nach Geschlecht. Gezeigt sind die Tumorentitäten mit der Anzahl eingemessener Proben, die dazugehörigen Mediane, die AUROC-Werte, die Standardabweichung und der p-Wert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Geschlecht	Tumormarker	Anzahl Proben	Median taMP/10 ³ MP	AUROC	SD	p-Wert
NSCLC	<i>Männlich</i>	EpCAM	33	45,43	0,8350	0,05012	< 0,0001
		EpCAM/CD147	31	6,654	0,8836	0,04309	< 0,0001
		CD147	31	106,9	0,7503	0,06184	0,0007149
	<i>Weiblich</i>	EpCAM	10	52,28	0,7500	0,1029	0,03506
		EpCAM/CD147	9	6,833	0,8497	0,07412	0,003950
		CD147	9	113,8	0,7778	0,09142	0,02068
CrC	<i>Männlich</i>	EpCAM	37	54,84	0,8604	0,04333	< 0,0001
		EpCAM/CD147	35	5,928	0,9082	0,03593	< 0,0001
		CD147	35	69,49	0,6737	0,06650	0,01548
	<i>Weiblich</i>	EpCAM	18	52,37	0,6736	0,09371	0,08456
		EpCAM/CD147	17	4,151	0,7889	0,07911	0,004044
		CD147	17	70,42	0,6144	0,09721	0,2481
PaCa	<i>Männlich</i>	EpCAM	3	34,90	0,6852	0,1197	0,2919
		EpCAM/CD147	3	12,91	1,000	0,0	0,005032
		CD147	3	110,3	0,7849	0,08703	0,1077
	<i>Weiblich</i>	EpCAM	6	66,46	0,8958	0,07020	0,005108
		EpCAM/CD147	5	8,124	0,8118	0,1045	0,03793
		CD147	5	130,8	0,6889	0,1514	0,2052
Struma	<i>Männlich</i>	EpCAM	8	41,70	0,7847	0,09321	0,01262
		EpCAM/CD147	8	3,401	0,8080	0,09564	0,008678
		CD147	8	40,93	0,5242	0,09776	0,8347
	<i>Weiblich</i>	EpCAM	32	44,90	0,6582	0,08520	0,07654
		EpCAM/CD147	32	3,650	0,7132	0,08327	0,01487
		CD147	32	44,59	0,5608	0,09514	0,4794
Kontrolle	<i>Männlich</i>	EpCAM	36	21,00			
		EpCAM/CD147	28	1,434			
		CD147	31	40,27			
	<i>Weiblich</i>	EpCAM	16	31,84			
		EpCAM/CD147	17	1,860			
		CD147	18	68,65			

Wie im vorangegangenen Test wurde auch hier ein OneWayANOVA Test mit anschließendem Dunnets Test durchgeführt. Dieser ergab, dass, wie es auch das Gesamtergebnis zeigt, bei männlichen Patienten mit NSCLC (n= 31) und CrC (n=35) signifikant höhere Anzahlen EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum zu finden sind. Bei den Strumapatienten findet sich weder bei Männern noch bei Frauen eine signifikante Erhöhung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum, was auch dem Gesamtergebnis entspricht. Bei Frauen liegt, wahrscheinlich im Zusammenhang mit der niedrigen Fallzahl, bei den Patientinnen mit NSCLC (n=9) und CrC (n=17) keine signifikante Erhöhung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP vor. Bei den Patientinnen mit PaCa (n=5) zeigt sich indes eine signifikante Erhöhung. Hier zeigt sich auch eine große Spannbreite der Werte mit einem Minimum bei 2,119 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und einem Maximum bei 28,33 EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP.

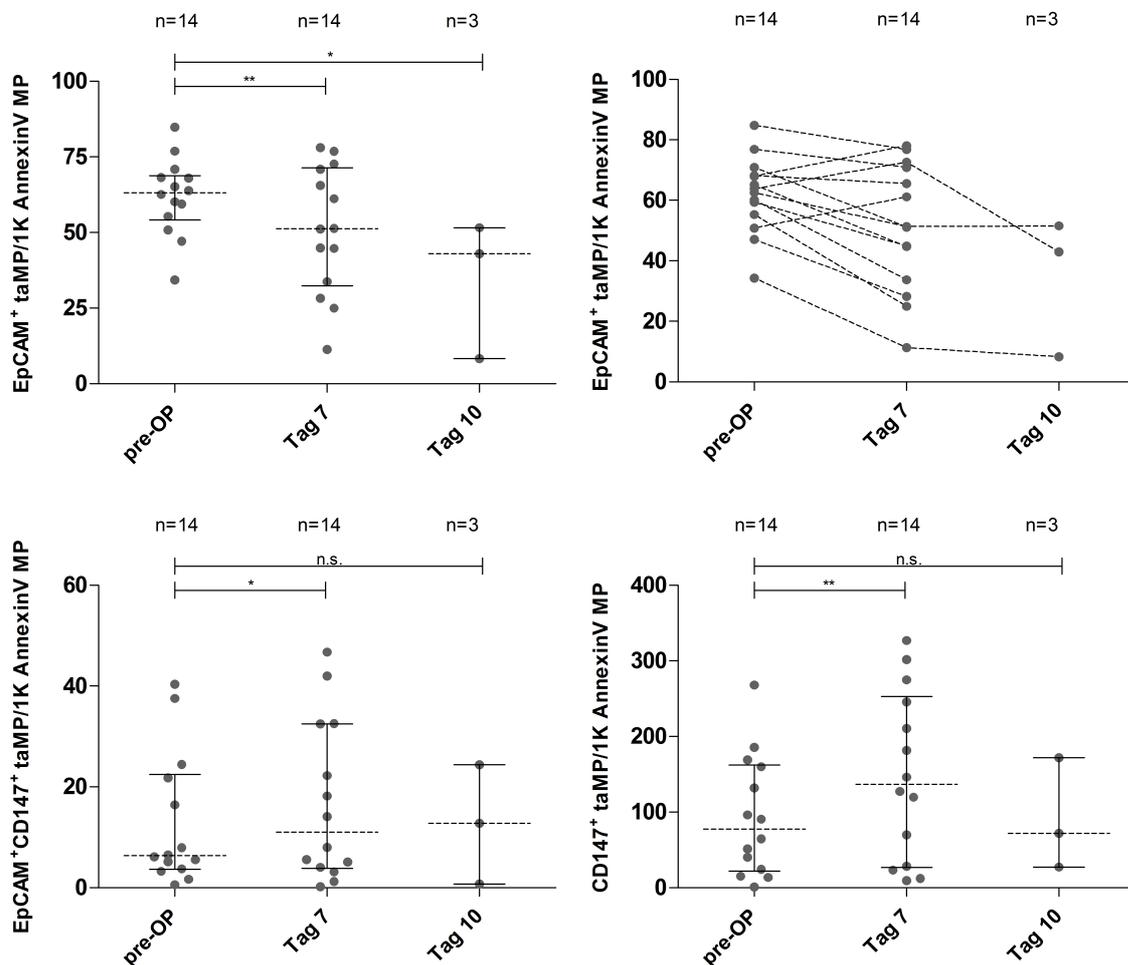
Wie beim Gesamtergebnis auch zeigen nur Patienten mit NSCLC eine signifikante Erhöhung der Anzahl CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum. An den AUROC-Werten (0,7503 für Männer und 0,7778 für Frauen) zeigt sich aber auch hier wie bei den anderen Gruppen eine eher niedrige diagnostische Relevanz. Die besten AUROC-Werte zeigen für alle Gruppen die Messung von EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Geschlecht die totale Anzahl tumorassoziierter Mikropartikel im Blut nicht beeinflusst.

4.3. Das Verhalten der tumorassozierten Mikropartikel bei Patienten mit CrC nach chirurgischer Resektion

In einer Studie von 2015 wurde gezeigt, dass bei Patienten mit Pankreaskarzinom der Median der Glypican-1 positiven Exosome sieben Tage nach einer Operation signifikant sinkt [84]. Um zu überprüfen, ob dies auch für das Level der tumorassozierten Mikropartikel im Serum von Patienten mit CrC zutrifft, wurde bei Patienten mit CrC Blut vor (n= 14), sieben Tage nach (n= 14) und wenn möglich zehn Tage nach (n=3) einer Operation mit kurativem Ansatz abgenommen und die Mikropartikel aus dem Serum isoliert.

Bei 11 von 14 Patienten sinken die Anzahlen EpCAM⁺ taMP von durchschnittlich 63,16 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP preoperativ auf 51,24 EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP an Tag 7 nach der Operation signifikant.

Und auch an Tag 10 lässt sich trotz kleiner Fallzahl ein signifikanter Abstieg erkennen. Die Anzahlen sinken jedoch nicht auf das Niveau der taMP bei gesunden Probanden. Es ist möglich anzunehmen, dass EpCAM taMP erst nach längerer Zeit abgebaut werden.



Figur 16: Detektion von CD147⁺, EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum von Patienten mit CrC vor und nach einer chirurgischen Resektion. Es wurden Mikropartikel aus Serumproben von Patienten mit CrC isoliert. Die Proben wurden vor der Operation (preOP, meist am Tag vor der geplanten Operation), sieben Tage nach der Operation (Tag 7) und wenn möglich zehn Tage nach der Operation (Tag 10) gesammelt. Berechnungen wurden mittels Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt (One-tailed T-test). Für die EPCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP wurde neben der Darstellung als vertikaler Scatterplot noch eine weitere Graphik hinzugefügt, die den taMP-Level-Verlauf der einzelnen Patienten deutlich macht. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

Bei der Messung von EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP dagegen lässt sich kein Absinken der Mikropartikellevel beobachten. An Tag 7 in Vergleich zu Tag 10 lässt sich sogar ein Anstieg der taMP erkennen. Dies trifft

auch besonders für die CD147⁺ taMP zu. CD147 wird nicht nur von Tumorzellen, sondern unter anderem auch von T-Zellen und Epithelzellen exprimiert und spielt eine Rolle im Gewebeumbau [137]. Daher kann man vermuten, dass auch CD147⁺ Mikropartikel von diesen Zellen während und nach einem operativen Eingriff ins Blut abgegeben werden.

Tabelle 8: Verhalten der taMP/10³ AnnexinV⁺ MP im Serum von Patienten mit CrC vor und nach einer chirurgischen Resektion. Angegeben ist der Zeitpunkt der Blutentnahmen und die Anzahl der gemessenen Proben, die dazugehörigen Mediane und der p-Wert des One-tailed t-Tests. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Zeitpunkt Blutentnahme	Tumormarker	Anzahl Proben	Median taMP/10³ MP	p-Wert (one-tailed t-Test gegen pre-OP)
Pre-OP	EpCAM	14	63,16	
Tag 7		14	51,24	0,0052
Tag 10		3	42,95	0,0242
Pre-OP	EpCAM/CD147	14	6,307	
Tag 7		14	11,03	0,0453
Tag 10		3	12,80	0,2680
Pre-OP	CD147	14	77,37	
Tag 7		14	136,8	0,0052
Tag 10		3	71,80	0,1847

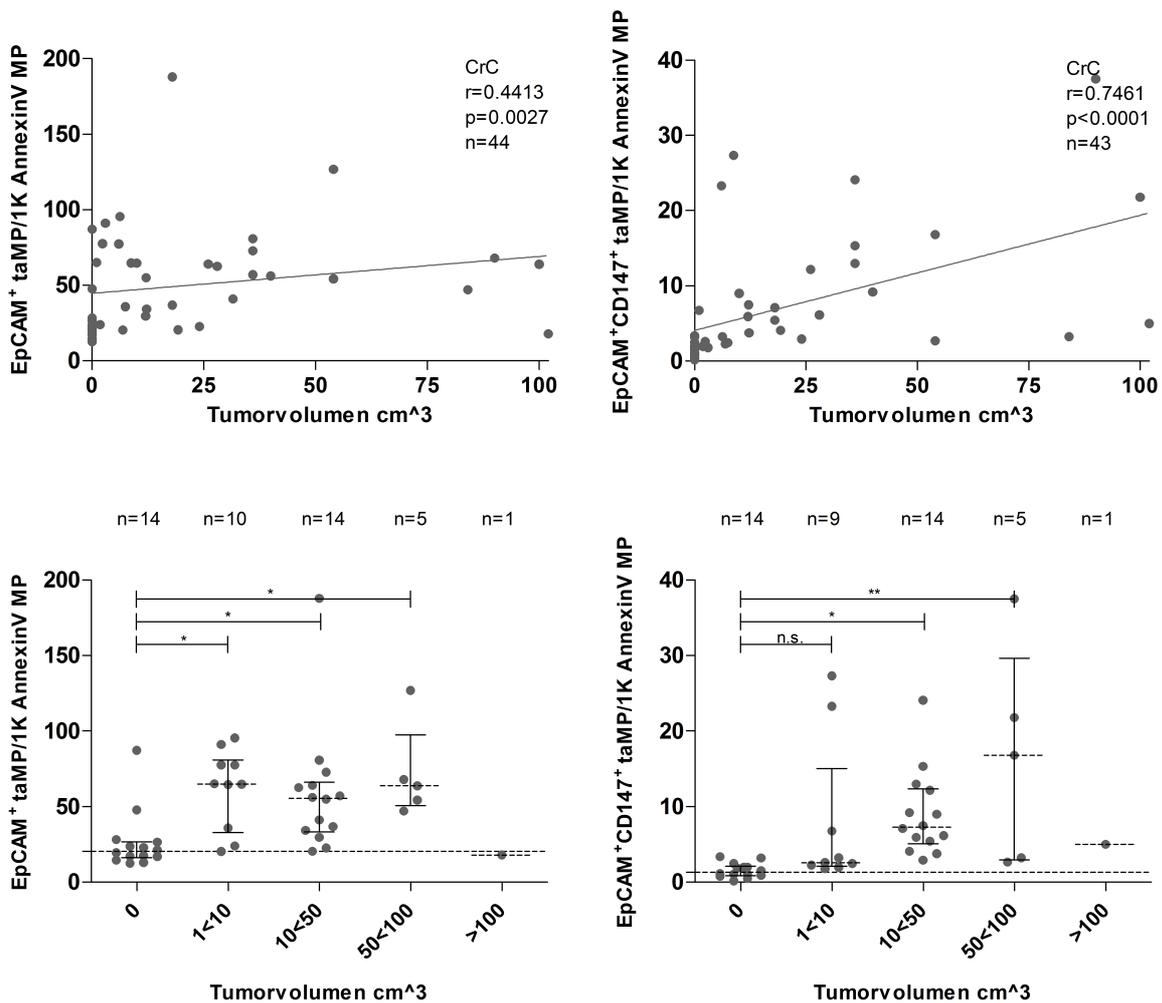
4.4. Die Korrelation zwischen der Anzahl tumorassoziierter Mikropartikel im Serum und dem Tumolvolumen von Patienten mit CrC und NSCLC

Eine weitere Fragestellung der Studie ist, ob die Anzahl der tumorassozierten Mikropartikel auch mit dem Tumolvolumen der Patienten korreliert. Zu diesem Zweck wurden die Daten, die im Rahmen des Stagings und Gradings bei den Patienten im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz erhoben wurden, gesammelt und ausgewertet.

Mittels Prism wurden die Korrelation sowie die lineare Regression zwischen den gemessenen Anzahlen EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bzw. EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und den in cm³ angegebenen Tumolvolumen von Patienten mit CrC und NSCLC berechnet.

Für die Patienten mit CrC (n=44) zeigt sich bei dem Vergleich der Anzahl der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP mit dem Tumolvolumen in cm³ keine hohe Korrelation. Zwar zeigt der p-Wert von 0,0027, dass sich die Anzahl der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP mit der

Größe des Tumors verändert, doch die Korrelation nach Spearman liegt bei 0,4413. Auch durch die lineare Regression lässt sich hier kein Zusammenhang feststellen.

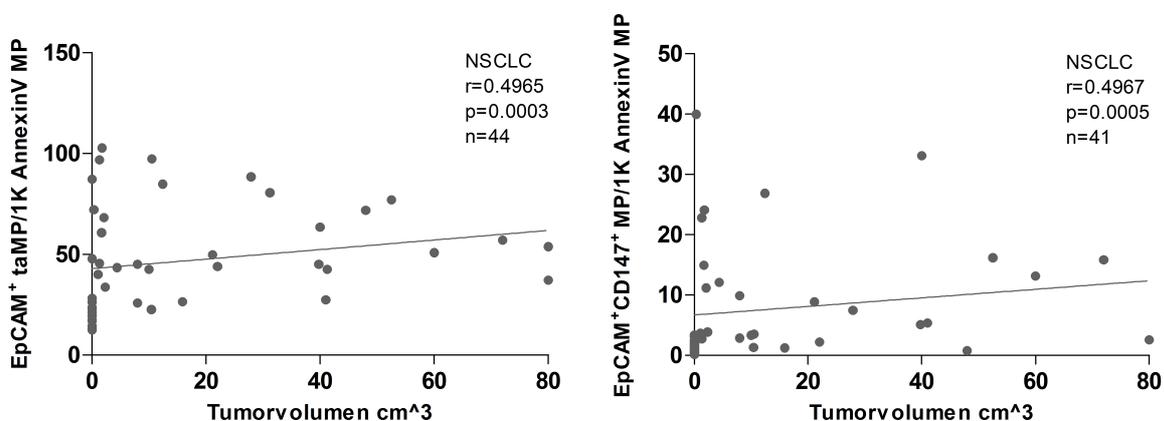


Figur 17: Die Korrelation zwischen der Anzahl EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ MP/10³ AnnexinV⁺ MP und dem Tumorvolumen von Patienten mit CrC. Angegeben sind zum einen der Spearman-Korrelationskoeffizient und die dazugehörigen p-Werte, die wie folgt angegeben sind; *= $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant. Die lineare Regression ist als Linie im Graphen integriert. Zum anderen gezeigt sind die Tumorvolumen in cm³ der Patienten mit CrC eingeteilt in Gruppen nach Größe (1<10 cm³, 10<50 cm³, 50<100 cm³, >100 cm³) und in Abhängigkeit von den gemessenen taMP-Werten. Verglichen worden sind die Werte mit den Werten von Kontrollpersonen (Tumorvolumen= 0 cm³) und untereinander mittels OneWayANOVA Test mit Dunnets multiplem Vergleichstest und Bonferronis multiplem Vergleichstest. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Bei der detaillierten Analyse der Tumorvolumen-Bandbreite und einem Vergleich mittels OneWayANOVA mit Dunnets Test zwischen der Anzahl EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP von Gesunden mit einem Tumorvolumen von 0 cm³ und der Anzahl EpCAM⁺CD147⁺

taMP/10³ AnnexinV⁺ MP von Patienten mit gemessenen Tumorzvolumina von 1<10 cm³, 10<50 cm³, 50<100 cm³ und >100 cm³ zeigt sich eine signifikante Erhöhung der tumorassoziierten Mikropartikel bei den Patienten mit Tumoren, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Größen der Tumoren im Bonferroni Test.

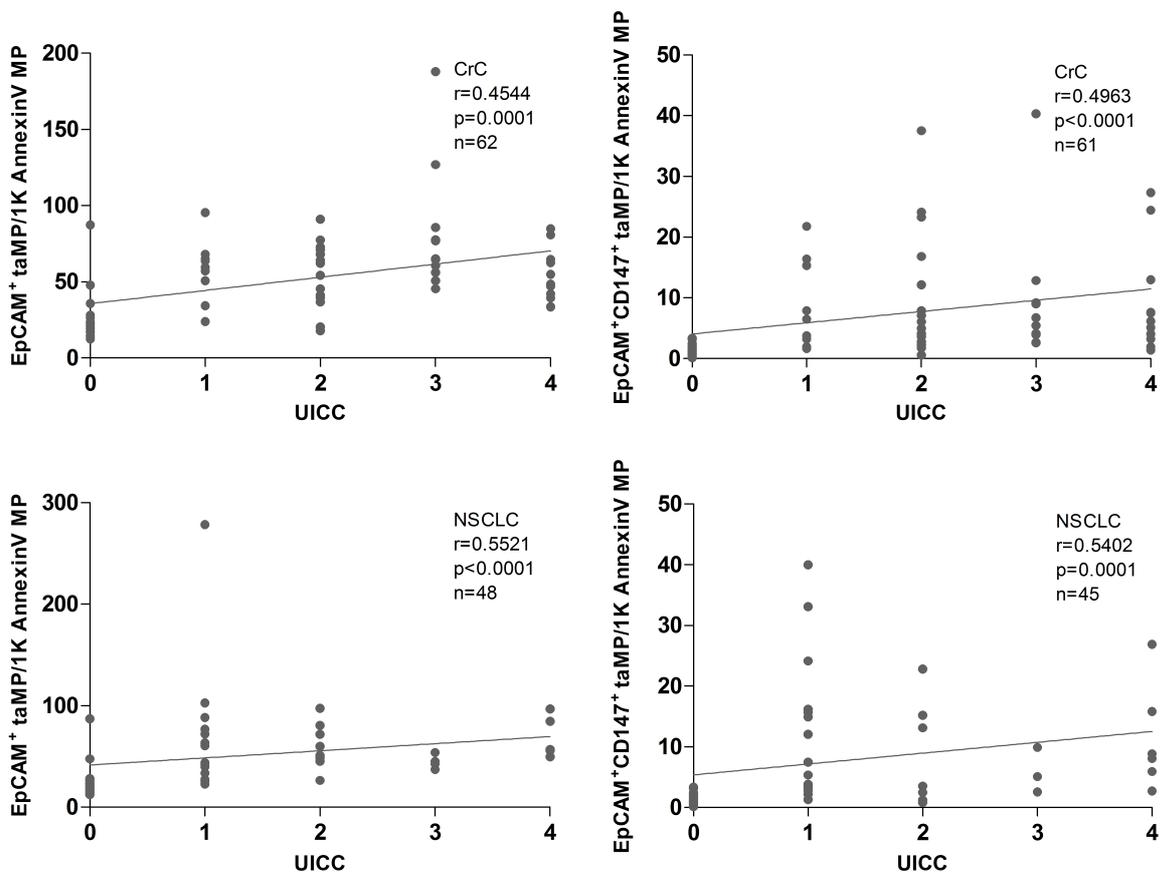
Ein anderes Ergebnis zeigt die Korrelation zwischen der Anzahl EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und dem Tumorzvolumen bei CrC-Patienten (n=43). Hier beträgt der Spearman Korrelationskoeffizient 0,7461, und auch die lineare Regression zeigt mit einem p-Wert von 0,0004 ein signifikantes Ergebnis. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Bei der detaillierten Analyse der Tumorzvolumen-Bandbreite zeigt sich auch hier eine signifikante Erhöhung der tumorassoziierten Mikropartikel bei Patienten mit Tumoren außer beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den Patienten mit niedrigen Tumorzvolumen (1<10 cm³), was die Annahme zulässt, dass sich in diesem Bereich das Detektionslimit für die Mikropartikel im Serum befindet. Die Ergebnisse und die AUROC-Werte sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Trotz positiver Korrelation und linearer Regression findet sich zwischen den hier gewählten Größeneinteilungen kein signifikanter Unterschied im OneWayANOVA Test mit Bonferroni Test.



Figur 18: Die Korrelation zwischen der Anzahl EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ MP/10³ AnnexinV⁺ MP und dem Tumorzvolumen von Patienten mit NSCLC. Angegeben sind zum einen der Spearman-Korrelationskoeffizient und die dazugehörigen p-Werte, die wie folgt angegeben sind; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,0005$, n.s.= nicht signifikant. Die lineare Regression ist als Linie im Graphen integriert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Bei den Patienten mit NSCLC konnte weder für die Anzahl EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und die dazu gehörigen Tumorzvolumina noch für die Anzahl EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und die dazu gehörigen Tumorzvolumina eine Korrelation festgestellt

werden. Der Spearman Koeffizient beträgt für die Messung von EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP 0,4965 und für die Messung der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP 0,4967, also fast identische Werte. Die p-Werte zeigen jedoch an, dass es einen Zusammenhang zwischen den Werten und den Tumorumfängen gibt. Eine signifikante lineare Regression ist andererseits nicht nachweisbar. Auch bei der detaillierten Betrachtung und der Testung mittels OneWayANOVA mit Bonferroni Test zeigen die Tumore keine Unterschiede der taMP Anzahlen nach Tumormenge, obwohl eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe besteht.



Figur 19: Die Korrelation zwischen der Anzahl EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ MP/10³ AnnexinV⁺ MP und dem UICC-Stadium von Patienten mit CrC und NSCLC. Angegeben sind zum einen der Spearman-Korrelationskoeffizient und die dazugehörigen p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant. Die lineare Regression ist als Linie im Graphen integriert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Auswertung enthalten ist eine Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der Anzahl EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP und der

Beurteilung der Erkrankung im klinischen Setting anhand der UICC-Stadien (Figur 19).

Für die Patienten mit CrC zeigt sich keine hohe Korrelation trotz guter p-Werte und signifikanter linearer Regression.

Für die Patienten mit NSCLC beträgt der Spearman-Korrelations-Koeffizient für die Messung der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP 0,5521 und für die Messung EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP 0,5402. Sie zeigen damit eine bessere Korrelation als die Patienten mit CrC. Indes zeigt die lineare Regression für die Patienten mit NSCLC keine Signifikanz.

Zusammenfassend besteht ein Zusammenhang zwischen der TumorgroÙe in cm³ und der Anzahl EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bei Patienten mit CrC, was vermuten lässt, dass Patienten mit einem größeren Tumor auch höhere taMP-Level im Serum zeigen.

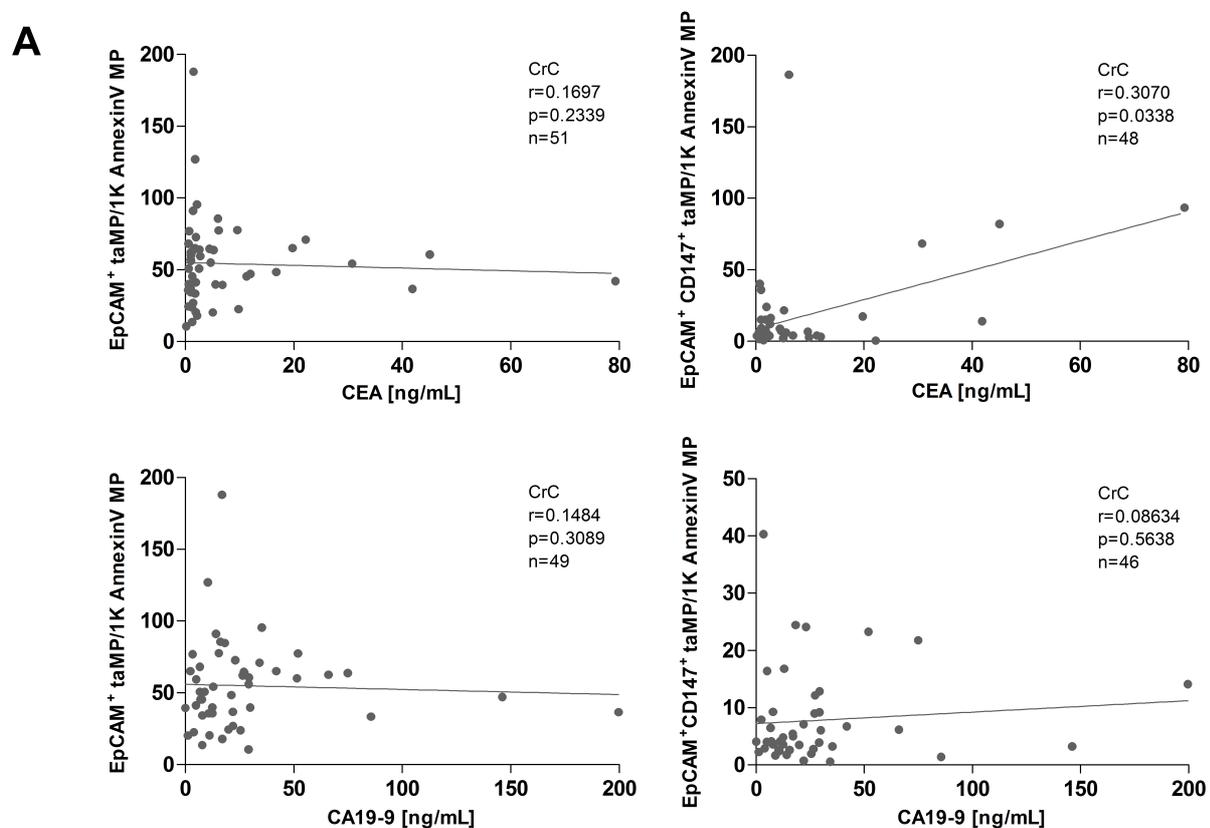
Tabelle 9: Vergleich der EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ MP/10³ AnnexinV⁺ MP aus dem Serum von Patienten mit unterschiedlichem Tumolvolumen. Angegeben sind die Tumorentitäten mit der Anzahl der eingemessenen Proben, ihre berechneten Mediane, die AUROC-Kurve mit Standardabweichung und p-Werte. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Tumor volumen [cm ³]	Tumormarker	Anzahl Proben	Median taMP/10 ³ MP	AUROC	SD	p-Wert
CrC	<i>1>10</i>	EpCAM	10	64,87	0,8714	0,07460	0,002340
		EpCAM/CD147	9	2,595	0,8413	0,08117	0,006777
	<i>10<50</i>	EpCAM	14	55,45	0,8571	0,07677	0,001307
		EpCAM/CD147	14	7,285	0,9898	0,01352	< 0,0001
	<i>50<100</i>	EpCAM	5	63,83	0,9286	0,06173	0,005499
		EpCAM/CD147	5	16,80	0,9571	0,04363	0,003065
NSCLC	<i>1>10</i>	EpCAM	11	45,43	0,8896	0,07004	0,001028
		EpCAM/CD147	11	11,20	0,9740	0,02614	< 0,0001
	<i>10<50</i>	EpCAM	14	47,38	0,8724	0,07196	0,0008019
		EpCAM/CD147	12	4,309	0,8274	0,08531	0,004690
	<i>50<100</i>	EpCAM	5	53,78	0,9143	0,07139	0,007280
		EpCAM/CD147	4	14,49	0,9643	0,04374	0,005780

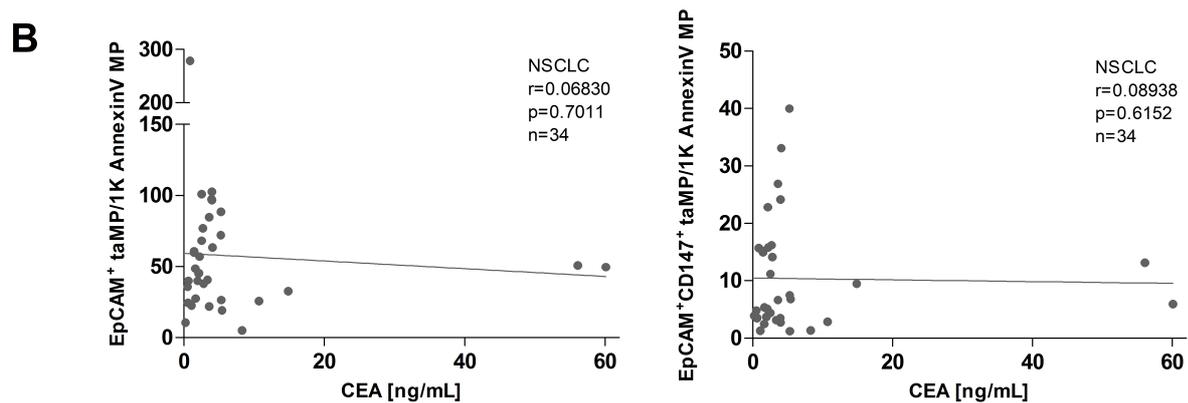
4.5. CEA und CA19-9 im Vergleich mit den tumorassoziierten Mikropartikeln als diagnostische Tumormarker für CrC und NSCLC

Wie bereits beschrieben dienen im klinischen Setting unter anderem CEA und CA19-9 als Tumormarker, die im Blut bestimmt werden. Das folgende Kapitel widmet sich dem Vergleich dieser Marker mit den in der Studie untersuchten tumorassoziierten Mikropartikeln.

Zu diesem Zweck wurden die im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz erhobenen CEA- und CA19-9 Werte mit den gemessenen Anzahlen tumorassoziierter Mikropartikel der jeweiligen Patienten und den Tumorumfängen in Verbindung gebracht.



Figur 20A: Die Korrelation zwischen der Anzahl EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ MP/10³ AnnexinV⁺ MP und den Tumormarkern CEA und CA19-9 bei Patienten mit CrC. Angegeben sind zum einen der Spearman- Korrelationskoeffizient und die dazugehörigen p-Werte, die wie folgt angegeben sind; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant. Die lineare Regression ist als Linie im Graphen integriert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

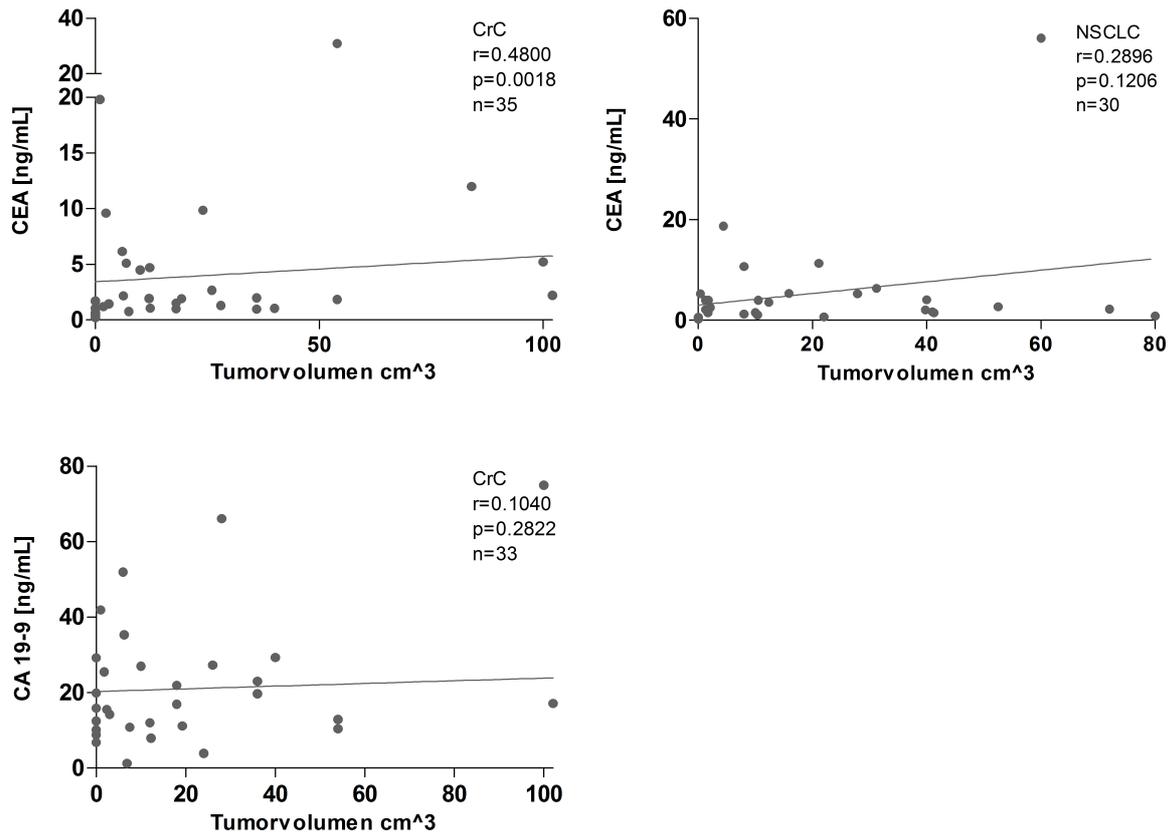


Figur 20B: Die Korrelation zwischen der Anzahl EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ MP/10³ AnnexinV⁺ MP und den Tumormarkern CEA und CA19-9 bei Patienten mit und NSCLC. Für die Patienten mit NSCLC sind nur die Vergleiche mit den Werten des Markers CEA gezeigt. Angegeben sind zum einen der Spearman- Korrelationskoeffizient und die dazugehörigen p-Werte, die wie folgt angegeben sind; *= $p<0,05$, **= $p<0,005$, ***= $p<0,0005$, n.s.= nicht signifikant. Die lineare Regression ist als Linie im Graphen integriert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Vergleicht man die Anzahlen EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP bzw. EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP von Patienten mit CrC mit den für die Patienten gemessenen CEA-Werten, zeigt sich kein Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient liegt für den Vergleich der EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP mit den CEA-Werten bei 0,1697 und für den Vergleich der EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP mit den CEA-Werten bei 0,3070. Bei den Patienten mit NSCLC zeigt sich ein ähnliches Ergebnis. Auch hier ergibt die Testung keine signifikante Korrelation der taMP-Werte mit den CEA-Werten.

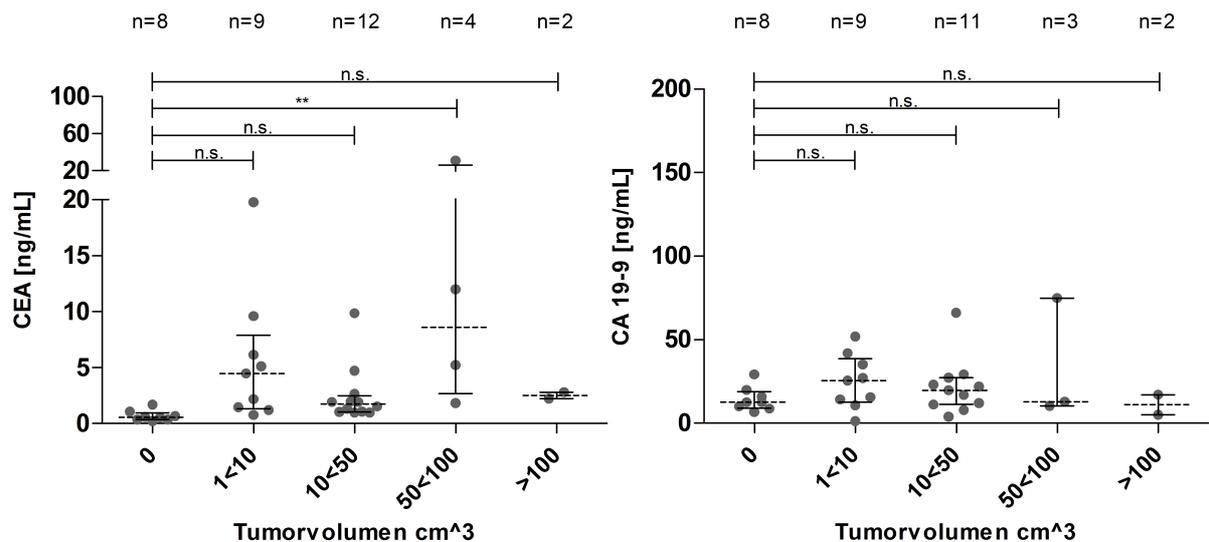
Für die Patienten mit CrC wurde die Testung weiterhin für den Vergleich mit den CA19-19 Werten durchgeführt, woraus sich ebenfalls keine signifikante Korrelation ergab.

Über die Werte der Marker CEA und CA19-9 kann man zudem nur eine mäßige bis keine Aussage über die Tumormasse machen. Im Vergleich zeigt sich, dass zwischen dem Tumorumfang und dem CEA-Wert der Patienten keine hohe Korrelation besteht, weder bei den Patienten mit CrC ($r=0,4800$) noch bei den Patienten mit NSCLC ($r=0,2896$). Für den Vergleich des Tumorumfangs mit den CA19-9 Werten der Patienten mit CrC liegt der Korrelationskoeffizient bei 0,1040 und zeigt so auch keinen Zusammenhang.



Figur 21: Die Korrelation zwischen den Werten der Tumormarkern CEA und CA19-9 und dem Tumorvolumen von Patienten mit CrC und NSCLC. Für die Patienten mit NSCLC sind nur die Vergleiche mit den Werten des Markers CEA gezeigt. Angegeben sind zum einen der Spearman- Korrelationskoeffizient und die dazugehörigen p-Werte, die wie folgt angegeben sind; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,0005$, n.s.= nicht signifikant. Die lineare Regression ist als Linie im Graphen integriert. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Teilt man die Werte in Gruppen mit den Tumorumfängen $0 < 10 \text{ cm}^3$, $10 < 50 \text{ cm}^3$, $50 < 100 \text{ cm}^3$ und $> 100 \text{ cm}^3$ ein und vergleicht die CEA-Werte der CrC-Patienten mit den Werten der Kontrollgruppe (Tumorumfang = 0 cm^3), zeigt sich, dass die Patienten mit größeren Tumoren im Allgemeinen keine signifikant höheren CEA-Werte zeigen. Nur in der Gruppe der Patienten mit einem Tumorumfang von $50 < 100 \text{ cm}^3$ ($n=4$) zeigt sich ein leicht signifikanter Anstieg, was im Zusammenhang mit der niedrigen Fallzahl stehen kann. Auch die CA19-9 Werte steigen bei Patienten mit größerem Tumorumfang nicht signifikant an.

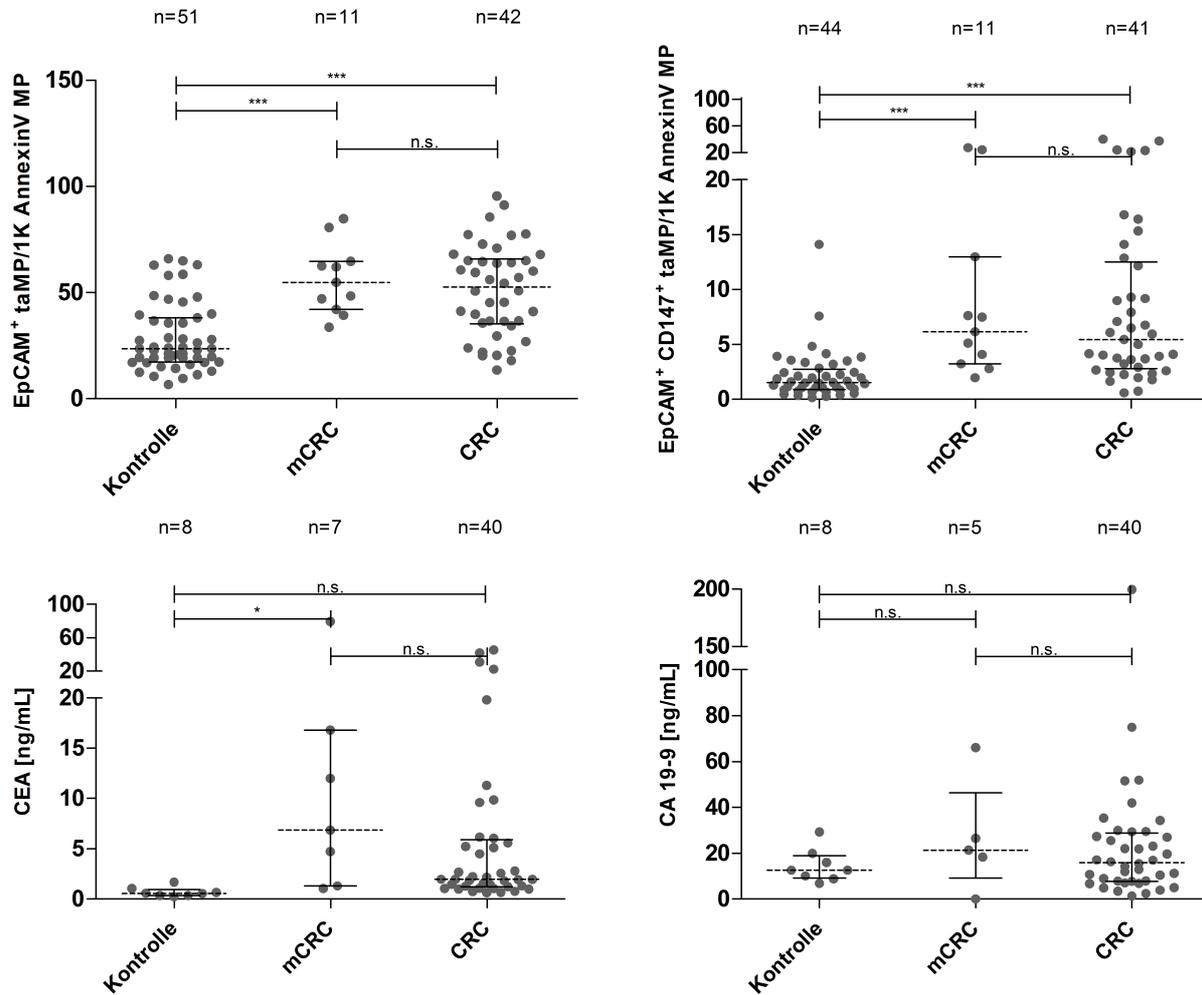


Figur 22: Nähere Betrachtung der Korrelation zwischen den Werten der Tumormarkern CEA und CA19-9 und dem Tumolvolumen von Patienten mit CrC. Gezeigt sind die Tumolvolumen in cm^3 der Patienten mit CrC eingeteilt in Gruppen nach Größe ($1 < 10 \text{ cm}^3$, $10 < 50 \text{ cm}^3$, $50 < 100 \text{ cm}^3$, $> 100 \text{ cm}^3$) und in Abhängigkeit von den gemessenen CEA- bzw. CA19-9-Werten. Verglichen worden sind die Werte mit den Werten von Kontrollpersonen (Tumolvolumen = 0 cm^3) und untereinander mittels OneWayANOVA Test mit Dunnetts multiplem Vergleichstest und Bonferronis multiplem Vergleichstest. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

4.6. Der Unterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Phänotypen des CRC

Dass die Anzahl der taMP nur bedingt eine Aussage über die Tumorlast der Patienten treffen kann, wirft die Frage auf, ob es einen Unterschied in der Anzahl der taMP bei Patienten mit bereits metastasiertem CrC gibt. Hierzu sind die Patienten mit CrC in zwei Gruppen aufgeteilt worden. Eine Gruppe bilden die Patienten ohne Metastasen ($n=42$) und die andere jene mit Fern- und/oder Lymphknotenmetastasen ($n=11$). Diese wurden mit den gesunden Proben und untereinander erneut verglichen mittels OneWayANOVA-Test mit anschließendem Dunnetts Test. Wie erwartet zeigen die Patienten mit CrC und mit mCrC eine signifikante Erhöhung der markerpositiven $\text{taMP}/10^3 \text{ AnnexinV}^+ \text{ MP}$. Es gibt jedoch keinen signifikanten Unterschied der Anzahlen EpCAM^+ und $\text{EpCAM}^+ \text{CD147}^+ \text{ taMP}/10^3 \text{ AnnexinV}^+ \text{ MP}$ zwischen den Patienten mit CrC und mCrC. Anders verhält sich dies bei der Betrachtung der Marker CEA und CA19-9 (Figur 13B). Hier ist nicht nur kein signifikanter Unterschied zwischen den Phänotypen des CrC zu sehen, sondern es fehlt

auch eine signifikante Erhöhung im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Einzig die Patienten mit metastasiertem CrC (n=7) zeigen leicht erhöhte CEA-Werte im Vergleich zu gesunden Probanden.



Figur 23: Der Unterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Phänotypen des CrC.

Gezeigt sind zum einen die Anzahlen der EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP für Patienten mit metastasiertem CrC (mCrC) und nicht- metastasiertem CrC (CrC), und zum anderen die Werte der Tumormarker CEA und CA19-9 Patienten mit metastasiertem CrC (mCrC) und nicht-metastasiertem CrC (CrC) im Vergleich zu Kontrollpersonen. Die Berechnungen (OneWayANOVA mit Dunnets multiplum Vergleichstest) wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Für alle Gruppen sind der Median und der Interquartilsabstand dargestellt sowie die p-Werte, die wie folgt angegeben sind; *= $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

Mittels der Berechnung der AUROC-Werte soll eine Aussage über die diagnostische Akkuratess der Auswertung gemacht werden. Hier zeigen sich gute Werte für die

markerpositiven taMP/10³ AnnexinV⁺ MP, aber auch für die Berechnungen der CEA-Werte. Sie reichen von 0,7979 für die EpCAM⁺ taMP/10³ AnnexinV⁺ MP der Patienten mit CrC bis zu 0,9464 für die CEA-Werte bei Patienten mit mCrC.

Zusammenfassend zeigt sich zwischen Patienten mit bereits metastasiertem CrC und Patienten ohne Metastasen kein Unterschied in der Anzahl der taMP.

Tabelle 11: Der Unterschied zwischen metastasierten und nicht metastasierten Phänotypen des CrC.

Gezeigt sind die Phänotypen und die eingemessene Anzahl der Proben, die Mediane, die AUROC-Kurve sowie zugehörige p-Werte und die Standardabweichung. Die Berechnungen wurden mit Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt.

Entität	Marker	Anzahl Proben	Median*	AUROC	SD	p-Wert
CrC	EpCAM	42	52,53	0,7979	0,04579	< 0,0001
	EpCAM/CD147	41	5,430	0,8537	0,04157	< 0,0001
mCrC	EpCAM	11	54,84	0,8770	0,04426	< 0,0001
	EpCAM/CD147	11	6,134	0,8967	0,04694	< 0,0001

CrC	CEA	40	1,960	0,9250	0,05045	0,0001703
	CA19-9	40	7,743	0,5594	0,08630	0,5992
mCrC	CEA	7	6,850	0,9464	0,05478	0,003830
	CA 19-9	5	9,190	0,7000	0,1783	0,2416

*EpCAM und EpCAM/CD147 angegeben als taMP/ 10³ MP; CEA und CA19-9 angegeben in ng/ml

5. Diskussion

5.1 Die Isolierung von taMP aus humanem Serum und die Detektion mittels Durchflusszytometrie stellen ein mögliches neues Verfahren zur Früherkennung von Tumorerkrankungen dar

Um mittels Durchflusszytometrie die Oberfläche der Mikropartikel beurteilen zu können, ist es notwendig ein standardisiertes Verfahren zur Isolation der Mikropartikel aus humanem Serum zu verwenden [2]. Im Detail wurde in dieser Studie den Patienten venöses Blut abgenommen und in Standard S-Monovetten 7,5 ml, Serum Gel mit Gerinnungsaktivatoren (Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Nach dem Gerinnungsvorgang wurden die Blutproben mit 4000x g zentrifugiert, um das Serum zu separieren. Dieses wurde dann bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Vor der Isolation der Mikropartikel mittels Zentrifugation wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und über Nacht bei 4°C gegen 45 ml AnnexinV 1xBindepuffer mit BSA dialysiert [131].

Die Zentrifugation erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt, der schwächeren Zentrifugation, werden Zellrückstände und andere größere Partikel, wie die apoptotischen Körperchen, entfernt [113]. Die zweite Zentrifugation erfolgt mit höherer Beschleunigung, sodass sich hier die größeren Mikropartikel absetzen können, die kleineren Exosome aufgrund ihrer noch geringeren Größe jedoch wahrscheinlich im Serum verbleiben [134].

Die Zentrifugation als Mittel zur Isolierung von Mikropartikeln wird in vielen Studien beschrieben und ist inzwischen das gängige Verfahren[2][23]. Mikropartikel pelletieren bei einer Beschleunigung von 10.000-20.000x g, während sich kleinere EV erst bei höheren Beschleunigung (100.000-120.000x g) absetzen [134]. Doch die Gruppen der EV sind sehr heterogen, und so ist es möglich, dass sich größere Exosome auch schon bei schwächeren Beschleunigung absetzen und so eine komplette Isolierung einer Gruppe nicht immer möglich ist [134]. Beachtet werden sollte zudem, dass die Zentrifugation vielleicht die Aggregation und PS-Exposition von Mikropartikeln induziert [141].

Um die Reinheit der Proben zu gewährleisten, wurde in dieser Studie zudem noch eine Dialyse mit Filtern eingesetzt [131]. Die Isolierung von Mikropartikeln alleine nach der Größe mittels Filter wird als unzureichend gewertet und daher meist in der Kombination mit Verfahren wie der Zentrifugation beschrieben [134], wie es auch in dieser Studie gemacht wurde.

Neben der Zentrifugation scheint auch der Umgang mit den Proben einen Einfluss auf die EV zu haben [122]. So wird zum Beispiel beschrieben, es sei wichtig, dass alle Proben gleich behandelt werden [61] und gefrorene Proben nur mit gefrorenen Proben verglichen werden sollten, da es noch keine eingängigen Studien gibt, die den Effekt des Einfrierens auf die EV thematisieren [134]. Empfohlen wird die Lagerung bei -80°C [134]. Auch dies wurde in dieser Studie berücksichtigt.

Mikropartikel können sowohl aus Serum als auch aus Plasma isoliert werden [38]. Und obwohl die Isolierung aus Plasma empfohlen wird [134], wurde in dieser Studie gelagertes Serum verwendet, unter anderem auf der Grundlage einer vorangegangenen Studie, die gezeigt hat, dass zwar minimale bis moderate Unterschiede zwischen den MP-Populationen in Serum und Plasma bestehen, dies aber keine Auswirkung auf das Anlegen eines Profils für die Studie hat [66].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine korrekte Isolation der Mikropartikel aus humanem Serum möglich ist, unter anderem durch die Orientierung an bereits weit verbreiteten Verfahren.

5.1.1 AnnexinV⁺ EpCAM⁺ und AnnexinV⁺ EpCAM⁺ CD147⁺ taMP sind potente Pan-Tumormarker für das CrC, das NSCLC und das PaCa

Um eine passende Markerkombination zu finden, die als Pan-Tumormarker fungieren kann, ist die Testung mehrerer Marker notwendig gewesen, unter anderem solcher, die bereits mehrfach auf Tumorzellen und zum Teil auch auf Extrazellulären Vesikeln nachgewiesen wurden. Um zu gewährleisten, dass nur die Mikropartikelpopulation betrachtet wird, wurden alle Proben in einem ersten Schritt mit AnnexinV gefärbt, welches an Phosphatidylserin bindet und damit die Mikropartikelpopulation von anderen Populationen abgrenzen kann [64]. Die AnnexinV⁺ Population wurden in weiteren Schritten mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. CD66c und CD44 scheinen wenig potente Marker für die Detektion von taMP im Serum zu sein, da gesunde und kranke Proben ähnliche taMP-Level zeigen (Kapitel 4, Figur 4). CD44 ist nicht nur assoziiert mit vielen Tumoren, wie zum Beispiel dem Kolorektalen Karzinom [4], sondern auch mit physiologischen Prozessen und anderen Erkrankungen [58], was die Differenzierung von Tumorpatienten alleine mittels CD44 erschweren könnte. CD66c, welches weder tumor- noch organspezifisch zu sein scheint [124], könnte einen guten Pan-Tumormarker darstellen, doch auch hier zeigen die gesunden Probanden ähnliche taMP-Level wie Patienten mit

Tumoren. Auch die Kombination mit EpCAM zeigte keine signifikanten Ergebnisse (Kapitel 4, Figur 8A). Aufgrund dieser Ergebnisse sind die beiden Marker in dieser Studie ausgeschlossen und das Augenmerk auf andere Marker gerichtet worden, was vor allem CD66c als möglichen Tumormarker für Mikropartikel jedoch weiterhin nicht ausschließt. Dies müsste durch größere Studien mit höheren Fallzahlen untersucht werden.

AnnexinV⁺EpCAM⁺ und AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP erweisen sich als sehr potente Marker zur Diskriminierung von gesunden Kontrollpersonen und Tumorpatienten. Sowohl AnnexinV⁺EpCAM⁺ als auch AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP konnten im Serum von Tumorpatienten identifiziert werden, während sie bei Gesunden nicht, bzw. in kleineren Mengen, vorhanden waren (Kapitel 4, Figur 5 und 8A). Mit der Messung von AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP konnten mittels der berechneten Cut-offs von insgesamt 107 Patienten 82 richtig als erkrankt erkannt werden, bei der Messung von AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP wurden ebenfalls 82 von 100 Patienten als erkrankt identifiziert. Auch der positive prädiktive Wert bestätigt das gute Ergebnis der Messung von taMP im Blut. Der positive prädiktive Wert (positiv prediction value, PPV) zeigt an, wie viele der positiv getesteten Personen tatsächlich krank sind und der negative prädiktive Wert (negativ prediction value, NPV) gibt an, wie viele der negativ getesteten Personen tatsächlich gesund sind [33]. Der PPV liegt für die Messung der Annexin V⁺EpCAM⁺ taMP bei 85,42% und der NPV bei 60,32%. Auch Sensitivität und Spezifität zeigen gute Werte (Kapitel 4, Tabelle 4). Die Spezifität bei den berechneten Cut-Off Werten für die Messung AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP reicht von 74,55 % (CrC) bis 88,89 % (PaCa). Würde man höhere Cut-off-Werte verwenden, würde die Rate der Falsch-positiven ansteigen. Im Zusammenhang mit der Sensitivität und der Spezifität wurden auch die AUROC Werte betrachtet. Die AUROC-Werte spiegeln die diagnostische Akkuratess des Test wieder [7], und auch hier zeigt die Messung der AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP gute Werte (Kapitel 4, Tabelle 4 und Figur 6). Sie liegen bei 0,7965 (NSCLC), 0,8059 (CrC) und 0,8675 (PaCa). Überraschenderweise zeigten auch Patienten mit Struma ohne Tumorerkrankungen erhöhte AnnexinV⁺EpCAM⁺-Werte. EpCAM kommt im einfachen Epithel des reifen Gewebes vor [116], sodass eine Erhöhung bei Patienten mit Struma vielleicht durch Gewebeumbau bedingt sein könnte. Diese Einschränkung lässt sich bei der Detektion der AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP nicht erkennen. Allgemein zeigt die Messung der doppelt positiven taMP bessere Ergebnisse gegenüber der alleinigen Messung von AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP. Der PPV liegt hier bei 87,23% und der NPV bei 64,71%, die Sensitivität bei 77,50% (NSCLC), 84,62% (CrC) und 87,50 (PaCa) und die AUROC-Werte

bei 0,8672 (NSCLC), 0,8628 (CrC) und 0,9111 (PaCa). Zudem kann man bei dieser Messung wie bereits angedeutet keine Erhöhung der Parameter bei Strumapatienten feststellen. AnnexinV⁺CD147⁺ taMP wiederum eignet sich augenscheinlich schlechter, um Patienten mit Tumorerkrankungen von gesunden Probanden zu differenzieren. Hier zeigen auch die gesunden Probanden oft erhöhte Werte, was möglicherweise daran liegen könnte, dass CD147 nicht nur von Tumorzellen exprimiert wird, sondern auch in gesundem Gewebe und bei anderen Krankheiten wichtige Rollen übernimmt [137]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung einer Markerkombination der alleinigen Messung eines tumorassoziierten Markers überlegen ist. Nichtsdestotrotz könnte die Messung sowohl der doppelt positiven als auch der nur AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP als gängiges Verfahren zur minimalinvasiven Früherkennung von Krebserkrankungen in Betracht gezogen werden, wobei das Vorhandensein anderer Erkrankungen, die eine Erhöhung der AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP nach sich ziehen könnte, ein mögliches Ausschlusskriterium sein müsste, da es zu mehr falsch positiven Ergebnissen kommen könnte und damit womöglich zu unnötigen Behandlungen. Eine ausführliche Anamnese ist aus diesem Grund obligat und sollte am Anfang einer jeden Vorsorgeuntersuchung stehen. In dieser Studie werden die taMP pro 1000 AnnexinV⁺ Mikropartikel angegeben, da sich die Darstellung pro ml Serum als unzureichend erweist. In der Darstellung per ml Serum zeigen nicht alle Gruppen mit Tumorerkrankungen erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Kapitel 4, Figur 10). Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass alle Probanden individuelle Anzahlen Mikropartikel im Serum aufweisen, zum anderen aber könnte es auch an schwankenden Ausbeuten bei der Mikropartikelisolierung liegen. Da man aber davon ausgehen kann, dass keine individuelle Mikropartikelpopulation bei der Isolierung verloren geht, kann man von einer gleichmäßigen Verteilung ausgehen. Die relative Angabe per 1000 AnnexinV⁺ Mikropartikel eignet sich daher gut [131][60]. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Mikropartikeln um eine sehr heterogene Gruppe, die in unterschiedlichem Maße von Zellen abgeschnürt werden. So setzen nicht nur Tumorzellen Mikropartikel frei, sie sind auch vorrangig Produkte von Erythrozyten, Thrombozyten und Epithelzellen [42]. Daher ist es nicht überraschend, dass sich die Anzahlen der Annexin V⁺ Mikropartikel im Serum der einzelnen Probanden unterscheiden, jedoch nicht signifikant, sodass die Gruppen vergleichbar bleiben (Kapitel 4, Figur 9). Der somit geringe Unterschied der Mikropartikel-Anzahlen, der jedoch, wie die Darstellung pro ml zeigt, einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, lässt sich durch die Darstellung pro 1000 Annexin V⁺ Mikropartikel weiter ausgleichen

[131].

5.2 Klinisches Potenzial der Messung tumorassoziierter Mikropartikel

Nachdem sich mit EpCAM und EpCAM/CD147 aussagekräftige Pan-Tumormarker gefunden haben, ist ein weiterer Ansatz der Arbeit, zu schauen, in wieweit das Verfahren klinische Relevanz in der Diagnostik und der Therapieüberwachung hat. Als Grundlage für diese Beurteilung dienen die im Krankenhaus während der Diagnostik und Therapie erhobenen Daten. Darunter fallen die Messungen der Tumormarker CEA und CA19-9, die Abschätzung der Tumorgröße sowie Angaben zur Therapie und Blutabnahmen nach vorgenommenen Operationen.

5.2.1 Tumorassoziierte Mikropartikel in der Therapieüberwachung und Rezidivfrüherkennung

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob die Messung taMP in der Therapieüberwachung eine Rolle spielen könnte, stellt sich am Anfang die Frage, ob die Anzahl der taMP im Serum mit der Tumorlast der Patienten korreliert. Dafür wurden von den Patienten mit NSCLC und CrC die Daten bezüglich Tumorgröße ausgewertet und mit der Anzahl der taMP im Serum verglichen (Kapitel 4, Figur 15+16). Während bei den Patienten mit NSCLC kein Zusammenhang zwischen den AnnexinV⁺EpCAM⁺ oder AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP und dem Tumolvolumen in cm³ gefunden werden kann, korreliert die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP signifikant mit dem Tumolvolumen von Patienten mit CrC ($r = 0,7461$), wobei das untere Detektionslimit der taMP voraussichtlich bei ca. 10 cm³ liegen könnte, da die AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP Werte dieser Patienten nicht signifikant erhöht sind im Vergleich zu gesunden Probanden. Die Feststellung, dass die Anzahl der AnnexinV⁺ EpCAM⁺ CD147⁺ taMP die Tumorlast der Patienten widerspiegeln könnte, könnte das Verfahren zu einem nützlichen Instrument für die Überwachung der Therapie oder in der Nachsorge machen. Nach Tumorresektion treten in 10-30% der Fälle von CrC lokale Rezidive auf, davon die meisten bereits in einer frühen postoperativen Phase [48][143]. Als Nachsorge für Patienten mit kurativ operiertem CrC werden unter anderem die Koloskopie, die Sonographie der Leber und die Abnahme des Tumormarkers CEA empfohlen, wobei die zeitlichen Abstände nicht genau festgelegt sind, da hierzu die Studienlage nicht genug Aufschluss gibt [75]. Bei Patienten in Stadium UICC 1 wird sogar nur eine koloskopische Nachsorge empfohlen [75]. In einer 2009

erschienenen Studie wurde auch für Patienten mit CrC in Stadium 1 eine ähnliche Nachsorge empfohlen wie bei Patienten mit CrC in späteren Stadien, basierend auf den Resultaten eines chirurgischen Therapieverfahrens [117], dies wurde jedoch kritisiert unter den Gesichtspunkten, dass eine ausgedehnte Nachsorge mit CEA und weiterer Bildgebung wenig Nutzen hat im Vergleich zu den entstehenden negativen Auswirkungen wie Stress der Patienten und hohe finanzielle Belastung durch mögliche falsch positive Ergebnisse [13]. Die Abnahme von CEA als Tumormarker in der Nachsorge bleibt daher bisher nur bei Patienten in späteren Stadien empfohlen [75]. CEA zeigt in der Nachsorge im Vergleich zu Koloskopie oder anderen bildgebenden Verfahren eine gute Sensitivität für Rezidive, vor allem bei Metastasen in der Leber [28], ist aber auf der anderen Seite auch fehleranfällig. In einem 2001 erschienenen Review von M.J. Duffy wurden einige Faktoren zusammengetragen, die den CEA Wert beeinflussen können. Neben der Differenzierung und dem Stadium des Tumors wurden dort auch nicht maligne Lebererkrankungen, Rauchen und Darmverschlüsse als mögliche Gründe für einen erhöhten CEA Wert angegeben [27]. Ebenso scheinen adjuvante Chemotherapien Einfluss auf den CEA-Wert zu haben [75]. Während die AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP mit der Tumorlast korrelieren, konnte ein solcher Zusammenhang zwischen den CEA Werten von Patienten mit CrC und der Tumorgröße in cm³ in dieser Studie nicht festgestellt werden (Kapitel 4, Figur 19). Nichtsdestotrotz wird CEA in der Nachsorge verwendet, da es zur Zeit das kostengünstigste und sensitivste Verfahren zur Erkennung von Rezidiven zu sein scheint [27]. Ein preoperativ erhöhtes CEA sollte ca. 6 Wochen nach chirurgischer Entfernung des Tumors wieder auf Normalniveau sein, andererseits könnte dies rezidivverdächtig sein [27]. Im Vergleich dazu wird in dieser Studie dargestellt, ob auch die EpCAM⁺ und EpCAM⁺CD147⁺taMP im Serum der Patienten mit CrC nach einer chirurgischen Resektion absinken (Kapitel 4, Figur 14). Dazu wurden Patienten mit CrC Serumproben, zusätzlich zu den preoperativen Blutentnahmen, sieben und zehn Tage nach einer kurativen Resektion abgenommen und eingemessen. Hierbei zeigt sich, dass nur die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺taMP sieben und zehn Tage nach der Operation sinkt. Die Anzahl der AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺taMP sinkt nicht signifikant, ebenso wie die AnnexinV⁺CD147⁺taMP, die sogar einen Anstieg zeigen. Wie bereits besprochen könnte dies daran liegen, dass CD147 nicht nur eine Rolle beim Wachstum, der Verbreitung und der Metastasierung von Tumoren spielt, sondern auch bei anderen Prozessen wie dem Gewebeumbau [137]. Da eine Operation nicht ohne Gewebeschäden und -reizungen vonstatten geht, könnte es zu erhöhter Expression AnnexinV⁺CD147⁺ taMP kommen.

Obwohl bei 11 von 14 Patienten die Anzahl der Annexin V⁺EpCAM⁺ taMP sinkt, sowohl an Tag 7 als auch an Tag 10, kann das gesunde Level nicht erreicht werden. Ein hypothetischer Grund hierfür könnte sein, dass Mikropartikel möglicherweise eine längere Halbwertszeit besitzen, oder dass Exosome vielleicht schneller abgebaut bzw. in Zellen aufgenommen werden. Diese Unklarheit könnte ein Problem in der Nutzung des Verfahrens in der Rezidiverkennung darstellen, da man ohne das Wissen, wann die taMP Level wieder auf Normalniveau zurückgehen, keine Aussage darüber machen kann, ab wann eine postoperative Erhöhung der taMP auf eine Metastase oder ein Rezidiv zurückzuführen sein könnte. In einer weiterführenden Studie unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass eine Antikörperkombination aus AnnexinV, EpCAM, CD133 und ASGPR1 leberspezifische taMP färbt, und dass AnnexinV⁺EpCAM⁺ASGPR1⁺ taMP Level nach einer R0 Resektion schon an Tag 2 postoperativ absinken und auch an Tag 10 niedrig bleiben [60]. Dies lässt die Vermutung zu, dass Mikropartikelfärbungen mit organspezifischen Antikörperkombinationen in der Nachsorge und Rezidivfrüherkennung bessere Ergebnisse zeigen könnten als die Verwendung eines Pan-Tumormarkers, obwohl auch das Level der taMP, die mit dem Pan-Tumormarker gefärbt werden, signifikant bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) und Cholangiokarzinom (CCA) erhöht ist [60]. Neben CEA ist in dieser Studie auch CA19-9 im Vergleich zu den taMP betrachtet worden. CA19-9 wird auch als Tumormarker für das CrC verwendet und könnte eine sinnvolle Ergänzung zu der Messung von CEA in der Nachsorge sein [108]. Unseren Messungen zufolge besteht zwischen dem Tumolvolumen in cm³ und den CA19-9 Werten der Patienten mit CrC keine Korrelation (Kapitel 4, Figur 21) und auch nicht zwischen der Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP oder Annexin V⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP und den CA19-9 Werten (Kapitel 4, Figur 20). Zusammenfassend zeigt sich, dass sich die Verwendung von organspezifischen Antikörperkombinationen zur Anfärbung der Mikropartikel statt der in dieser Studie verwendeten Pan-Tumormarker Kombination aus AnnexinV, EpCAM und CD147, als guter minimalinvasiver Test in der Nachsorge und Früherkennung erweisen könnte, AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP jedoch für die Nachsorge nur unter Umständen in Frage kommen könnte, hierfür aber noch weitere Studien durchgeführt werden müssten, die den Zeitraum festlegen könnten, wie lange nach einer OP die Anzahl der AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP wieder auf das Normalniveau sinken. Gegen eine Verwendung des Verfahrens in der Nachsorge sprechen auch die Erhöhungen der AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP bei anderen Erkrankungen wie dem Struma oder der Leistenhernie [60]. Die Kombination mit den bereits bekannten Markern CEA und CA19-9

scheint sich nicht zu empfehlen, da keine Korrelation zwischen den taMP und den CEA- oder CA19-9 Werten besteht. Betrachtet man hierbei, inwieweit die Marker Aussage über die Tumorgröße treffen können, scheinen unseren Ergebnissen zu Folge die Messung der taMP der Messung von CEA und CA19-9 überlegen zu sein. Diese Aussage müsste aber noch durch Studien mit größeren Fallzahlen bestätigt werden und beschränkt sich zudem auf den Vergleich mit der Tumorgröße in cm^3 . Im Vergleich mit anderen diagnostisch wichtigen Einflussfaktoren ist CEA wesentlich besser erforscht und auch aussagekräftiger, wie beispielsweise im Zusammenhang mit dem Überleben bei Chemotherapie, dem Tumorstadium und der Tumordifferenzierung [27].

5.2.2 Tumorassoziierte Mikropartikel in der Diagnostik und Vorsorge von Tumorerkrankungen

Während die Messung der tumorassoziierten Mikropartikel für die Verwendung in der Nachsorge zur Zeit noch zu wenig Potenzial aufzuweisen scheint, ist ein mögliches Potenzial für die Anwendung als Diagnosemittel sichtbar. Zirkulierende Mikropartikel sind inzwischen schon längst als potenzielle Biomarker für maligne Tumore bekannt. Sie spielen eine Rolle beim Wachstum von Tumoren und der Resistenz der Tumorzellen und sind in Körperflüssigkeiten wie Urin [97][98], Blut [88] oder Aszites [119] von Tumorpatienten zu finden. Es wurden schon bei einigen Tumorarten erhöhte Mikropartikelanzahlen gefunden, wie zum Beispiel beim NSCLC [36] oder beim Brustkrebs [78]. In dieser Studie wurde dabei der Fokus auf die Oberflächenantigene der Mikropartikel gelegt. Mikropartikel scheinen dieselben Oberflächenmerkmale wie die Zelle zu tragen, von der sie stammen [59][30], daher könnte man davon ausgehen, dass die Mikropartikel, welche von Tumorzellen abgegeben werden, Oberflächenantigene tragen, die auf Tumorzellen vorkommen. Die Messung von Annexin V⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP im Serum von Patienten kann wie bereits erwähnt mit einer Sensitivität von 77,50% (NSCLC), über 84,62% (CrC) bis hin zu 87,50% (PaCa) und einem PPV von 87,23% gut zwischen Gesunden und Patienten mit Tumoren unterscheiden. Zudem besteht eine Korrelation zwischen dem Tumolvolumen in cm^3 und der Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP im Serum, sodass man vielleicht anhand der taMP-Anzahl auch eine Aussage darüber treffen könnte, wie groß der Tumor voraussichtlich sein könnte. Damit könnte sich das Verfahren nicht nur in der Diagnostik alleine als nützlich erweisen, sondern auch als Prognosefaktor dienen. Eine schon bekannte und zur Zeit stark erforschte Methode, die prognostisch

Relevanz in der Diagnostik haben könnte, ist die Messung von zirkulierenden Tumorzellen (circulating tumor cells, CTC). Auch hier wird unter anderem EpCAM als Marker verwendet (CellSearch™) [46]. Es handelt sich um Zellen, die von einem soliden Tumor stammen und im Blut zirkulieren [115]. Über die Jahre gab es viele Versuche, die Detektion und Analyse der CTC zu verbessern, da sie nur zu sehr geringen Zahlen im Blut vorhanden sind, zugelassen von der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Food and Drug Administration, FDA) ist bisher jedoch nur das CellSearch™ System für den metastasierten Brustkrebs, das metastasierte Kolorektale Karzinom und das metastasierte Prostatakarzinom [35]. Hierbei wird mittels immunomagnetischer Separation 7,5 ml peripheres Blut analysiert und Zellen dann als zirkulierende Tumorzellen bezeichnet, wenn sie unter anderem zum einen im Streulicht oval bis rund erscheinen, und zum anderen in der Färbung positiv für Cytokeratin und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sowie negativ für CD45 sind [93]. Bei gesunden Personen werden nicht mehr als ≥ 2 CTCs pro 7,5 ml Blut gefunden [1]. Eine höhere Anzahl von CTC über ≥ 3 CTCs pro 7,5 ml Blut scheint verbunden zu sein mit einer kürzeren Überlebensdauer [93]. Die Messung von CTC wird auch in der Diagnostik vorgeschlagen, beruhend auf der Vermutung, dass die Verbreitung der Tumorzellen über den Blutweg zum Teil bereits im Stadium der frühen Karzinogenese geschieht, der primäre Tumor also parallel zu möglichen Metastasen wächst [34]. Dies würde jedoch nicht auf Karzinome zutreffen, die wenig oder spät metastasieren. Hier zeigt die Messung der tumorassoziierten Mikropartikel möglicherweise größeres Potenzial, da die Tumorzellen unabhängig von Metastasierungen Mikropartikel exprimieren. In dieser Studie konnte kein Unterschied festgestellt werden zwischen der Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺ und AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP pro 10^3 AnnexinV⁺ MP im Serum von Patienten mit CrC und metastasiertem CrC (Kapitel 4, Figur 23), jedoch waren bei beiden Gruppen die Anzahlen der taMP pro 10^3 AnnexinV⁺ MP im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens gegenüber der Messung von zirkulierenden Tumorzellen ist, dass die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP viele Tumorarten sicher detektieren kann. Darunter fallen nicht nur die in dieser Studie betrachteten Entitäten NSCLC, CrC und PaCa, sondern auch das HCC und das CCA [60]. Ein weiterer Vorteil, den die Mikropartikel gemeinsam haben mit den CTC gegenüber anderen Untersuchungen in der Früherkennung, wie beim CrC beispielsweise die Koloskopie, ist die minimale Invasivität. Die Testung der Mikropartikel könnte so möglicherweise im Zuge einer Routine-Blutabnahme erfolgen, während zum Beispiel eine Koloskopie im Durchschnitt 30 Minuten dauert (die Vorbereitungszeit nicht mit

eingerechnet) und mit einigen Risiken behaftet ist wie Blutungen, Perforationen oder Infektionen [85]. Aufgrund dieser Risiken muss vor der Durchführung einer Koloskopie eine Aufklärung erfolgen. Vorteil der Koloskopie ist, dass man mögliche Vorstufen des Karzinoms in Form von Polypen direkt erkennen und abtragen kann. Eine Kombination der Verfahren könnte sich bewähren. Ähnlich wie beim okkulten Bluttest könnten positive Ergebnisse bei der Messung der taMP eine Koloskopie obligat nach sich ziehen, um ein CrC so früh wie möglich zu erkennen. Voraussetzung dafür wäre jedoch, dass sich eine Markerkombination für die taMP finden würde, die spezifisch wäre für das Kolorektale Karzinom, ähnlich wie die Kombination von AnnexinV, EpCAM, CD133 und ASGPR1 leberspezifisch zu sein scheint [60]. Für die Verwendung der Pan-Tumormarker könnte man folgendes Vorgehen anstreben: Wenn bei den Routineblutentnahmen die AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP und besonders oder nur die AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP im Serum erhöht sein sollten, könnte eine erweiterte Tumorsuche erfolgen, vielleicht in Form von bildgebenden Verfahren oder der Untersuchung schon bekannter Tumormarker wie CEA oder CA19-9.

Ein weiteres neues Verfahren, das in der Tumorforschung an Aufmerksamkeit gewinnt, ist die Detektion von zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA), einer Untergruppe der zellfreien DNA (cfDNA), welche im Blut eines jeden Menschen vorkommt [142]. Diese DNA Fragmente stammen wahrscheinlich von apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen [55], und es wird vermutet, dass die Fragmente in ihrer Länge variabel sind im Gegensatz zu jenen, die bei der Apoptose von normalen Zellen entstehen [45]. Sie können anhand ihrer genetischen Abweichungen detektiert werden. Darunter fallen zum Beispiel das Ungleichgewicht der Allele, Translokationen oder Mutationen [127]. Erhöhte totale Level von cfDNA im Vergleich zu Kontrollgruppen wurden schon bei vielen Tumorarten nachgewiesen [45]. Neben der Messung von totalen Konzentrationen hat auch die Berechnung des DNA integrity index zugenommen, welcher erstmals von Wang et al. verwendet wurde [127]. Dabei wird das Verhältnis von langen zu kurzen cfDNA-Fragmenten errechnet [45]. Neben malignen Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom [19], dem Prostatakarzinom [44] und Tumoren der Brust [109] gilt dies auch für das Kolorektale Karzinom [31][76]. Das Verfahren scheint zudem Potenzial als Prognosemarker und als Mittel in der Therapieüberwachung aufzuweisen, da unter anderem Rezidive und Metastasierung mit einem deutlich höherem cfDNA Level verbunden zu sein scheinen [45], was in dieser Studie für die Messung der taMP nicht bestätigt werden konnte (Kapitel 4, Figur 21). Dabei sind die im Rahmen der meisten Studien erhobenen Werte für Sensitivität

und Spezifität sehr hoch. Die Vermutung liegt daher nahe, dass sich die Messung der cfDNA, entweder direkt im Serum/Plasma oder über den DNA integrity index, als potentes Mittel in der Diagnostik und Therapieüberwachung bestimmter maligner Tumore durchsetzen könnte. Aber auch hier gibt es einige negative Aspekte, die die klinische Anwendbarkeit ähnlich wie die der taMP einschränken könnten und weiterer Forschung bedürfen. Darunter fällt zum einen die große Bandbreite der Methoden zur Isolierung und Messung der cfDNA, die ein Grund für die großen Unterschiede in Sensibilität und Spezifität sein könnten [19]. So werden zum Beispiel in den Studien entweder Plasma oder Serum verwendet, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass es Unterschiede in der Menge an cfDNA geben könnte [19]. Dieses Problem zeigt sich wie bereits besprochen auch bei der Messung der taMP. Eine andere Einschränkung ist die Vielzahl an Möglichkeiten die DNA zu isolieren, die mit großen Unterschieden in der Leistung einhergehen [18]. Auch in der Mikopartikelforschung gibt es viele Ansätze der Isolierung, hier existieren jedoch erste Ansätze zur Vereinheitlichung [134]. Ein Vergleich zwischen den Ergebnissen verschiedener Studien gestaltet sich unter anderem aufgrund der genannten Probleme als schwierig, weswegen es nicht verwunderlich ist, dass es zu teilweise gegensätzlichen Ergebnissen kommt. Ein Beispiel hierfür ist die Messung des DNA integrity index für das Prostatakarzinom. Während eine Gruppe hier zu signifikanten Ergebnissen kommt, welche vermuten lassen, dass die Messung der DNA-Integrität sich in der Diagnostik des Prostatakarzinoms durchsetzen könnte [44], zeigt eine andere Gruppe konträre Ergebnisse, die cfDNA für einen nicht geeigneten Marker des Prostatakarzinoms halten [8]. Das in dieser Studie etablierte Verfahren und die daraus resultierenden Ergebnisse hingegen konnten in weiterführenden Studien wiederholt werden [60].

Wie bei der Messung der AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP zeigt sich bei der Messung der cfDNA auch das Problem, dass benigne Erkrankungen ebenfalls zu erhöhten Werten führen können [19]. Vor allem im direkten Vergleich von malignen Erkrankungen zu ihren benignen Korrelaten gibt es Hinweise darauf, dass eine Unterscheidung mittels cfDNA nicht möglich ist, weder frei gemessen noch anhand des DNA integrity index [50]. Im Falle des Kolorektalen Karzinoms zeigt eine Studie im Gegensatz dazu, dass sowohl die totale Konzentration der cfDNA als auch die Mediane der Level des DNA integrity index signifikant höher sind als die von Kontrollpersonen und Patienten mit benignen Polypen im Kolon [31]. Diese Ergebnisse sind aber beschränkt auf eine betrachtete Tumorentität, während in dieser und weiterführenden veröffentlichten Studien gezeigt werden konnte,

dass durch eine Kombination von EpCAM und CD147 eine Unterscheidung zwischen benignen Erkrankungen und verschiedenen Formen von malignen Neoplasien möglich ist [60][131].

Betrachtet man diese Ergebnisse zeigt sich, dass beide Verfahren Potenzial als Tumormarker aufweisen, in Falle der cfDNA beschränkt sich dies je nach Markerkombination jedoch auf eine Tumorentität, während die Messung von AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP eine größere Bandbreite von Malignomen in der Früherkennung abdecken könnte.

Zusammenfassen kann man sagen, dass sich die Messung des taMP Level im Serum als minimalinvasives Verfahren in der Früherkennung von Tumorerkrankungen durchsetzen könnte. Zur Früherkennung von Tumorerkrankungen gibt es bis heute kaum Mittel, die Bestimmung von taMP könnte also eine Lücke füllen und durch eine frühe Diagnostik die Mortalität von Tumorerkrankungen senken. Durch die Eigenschaft als Pan-Tumormarker wäre es vielleicht möglich, ohne vorherigen spezifischen Verdacht eine Großzahl von Malignomen zu erkennen. Die prognostische Relevanz müsste noch durch größere Studien untersucht werden, vor allem in Hinblick auf die Frage, inwieweit das Level der taMP im Serum die Größe des Tumors widerspiegelt.

5.3 Potenzial und Grenzen des Verfahrens

Bevor die Messung von taMP sich als Mittel in der Früherkennung und Diagnostik von Tumorerkrankungen durchsetzen kann, müssen die Grenzen des Verfahrens und mögliche Ausschlusskriterien definiert, sowie mögliche Fehlerquellen eingegrenzt werden, um die Rate der falsch positiven Ergebnisse gering zu halten. Eine wichtige Frage ist hier, ob das Geschlecht Einfluss auf die Expression der taMP besitzt. Eine Studie zu aus Blut stammenden Mikrovesikeln von wahrscheinlich gesunden Probanden zeigte, dass es Unterschiede in der Anzahl verschiedener Mikrovesikelpopulationen zwischen Männern und Frauen gibt [41], und ein Vergleich sollte sicherstellen, dass dies bei den taMP nicht der Fall ist.

Hierzu wurden die Patientengruppen und die Kontrollgruppe aufgetrennt nach Geschlecht und separat betrachtet (Figuren 11-13). In der Kontrollgruppe zeigen Frauen im Vergleich zu Männern leicht erhöhte Werte für die AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP, nicht jedoch für die AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP und AnnexinV⁺CD147⁺ taMP. Bei den Patientengruppen zeigen nur die weiblichen Patienten mit PaCa eine Erhöhung im Vergleich zu den Männern

mit PaCa, hier müssten jedoch weitere Tests mit höheren Fallzahlen erfolgen, um diese Ergebnisse zu bestätigen. Im Allgemeinen lässt sich aber sagen, dass es keine ausschlaggebenden Unterschiede zwischen Männern und Frauen in der Expression taMP zu geben scheint.

Eine weitere Frage, die nähere Betrachtung verdient, ist, wo das Detektionslimit der tumorassoziierten Mikropartikel liegt. Betrachtet man die Patienten mit CrC, deren Tumoren eine Größe von $<10 \text{ cm}^3$ aufweisen, so fällt auf, dass diese Patienten keine erhöhte Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP im Vergleich zu gesunden Probanden aufweisen, obwohl die AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP mit der Tumorlast der Patienten korrelieren (Kapitel 4, Figur 17). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass kleinere Tumoren mit einem Volumen unter $<10 \text{ cm}^3$ (entspricht einem Durchmesser von ca. 2 cm) nicht mehr zuverlässig durch die Messung der taMP erkannt werden können. Die geringe Anzahl an Patienten mit gemessenen Tumorumfängen $<10 \text{ cm}^3$ lässt jedoch keine eindeutige Beurteilung zu. So zeigt zum Beispiel die Messung von AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP auch bei den Patienten mit Tumorumfängen $<10 \text{ cm}^3$ schon eine signifikante Erhöhung. Es kann also aufgrund der bisherigen Studienlage keine Aussage über das Detektionslimit der taMP gemacht werden, wenngleich eine Tendenz dahin sichtbar ist, dass kleine Tumoren mit einem Volumen $<10 \text{ cm}^3$ unter Umständen nicht erkannt werden können. Damit würde das Verfahren jedoch nicht weniger sensibel sein als andere Ansätze in der Früherkennung von Tumoren. So beträgt beispielsweise die Sensibilität der Messung von CEA zur Erkennung von Kolorektalen Karzinomen (nach Dukes Klassifikation A und B) nur 36% [27]. Ausnahmen bilden invasive Verfahren wie die Koloskopie, bei der bereits verdächtige Polypen $<5 \text{ mm}$ entdeckt und abgetragen werden können [48] und der daher bereits in der Früherkennung des CrCs große Bedeutung zugesprochen wird [75][85]; ebenso Ausnahmen bilden manche bildgebende Verfahren, welche jedoch bei keiner der in dieser Studie behandelten Tumorentitäten in der Früherkennung empfohlen werden [40][75][74].

Wenn man über das Potenzial des Verfahrens spricht, darf man nicht außer Acht lassen, wie gut anwendbar das Verfahren im klinischen Alltag wäre. Die Gewinnung der Proben kann wie bereits besprochen aus venösem Blut im Rahmen einer Routineabnahme erfolgen. Dafür benötigt wird eine Standard S-Monovette 7,5 ml, Serum Gel mit Gerinnungsaktivatoren (Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland). Für die Isolierung der Mikropartikel wird 1 ml Serum benötigt, für die Messung von anderen Tumormarkern wie z.B. CEA oder CA 19-9 wird durchschnittlich ebenfalls 1 ml Serum benötigt [70]. Bis

hierher unterscheidet sich das Verfahren nicht von einer alltäglichen Blutentnahme für das Labor im Krankenhaus. Als über den normalen Aufwand hinausgehend hingegen kann die Färbung der Mikropartikel und die Messung mittels FACS bewertet werden. Neben einem geschulten Personal müsste ein FACS-Gerät zur Verfügung stehen. Auf längere Sicht wäre es daher eine Überlegung, das Verfahren so umzuarbeiten, dass eine Beurteilung mittels Durchflusszytometrie nicht mehr notwendig wäre.

Kostentechnisch gesehen wäre das Verfahren unter den Tumormarkern teurer einzustufen als die bisher gängigen Tumormarker. Mit ca. 25 Euro pro Messung (reine Materialkosten) liegt der Preis höher oder ähnlich hoch wie der der meisten Tumormarker, jedoch sind diejenigen, die bisher beim CrC eingesetzt werden, günstiger. So kostet eine Messung des Tumormarkers CEA beispielsweise 14,57 Euro und von CA19-9 17,49 Euro (inbegriffen sind die Verarbeitung des Probenmaterials durch Personal und die Auswertung und Beurteilung durch einen Arzt) [37].

Einen Ausblick auf das große Potenzial der Messung taMP in der Früherkennung und Diagnostik von Tumorerkrankungen zeigen weiterführende Studien unserer Gruppe, die bereits zeigen konnten, dass auch bei Patienten mit HCC und CCA die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP und AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP im Serum erhöht sind, und dass andere Markerkombinationen möglicherweise organspezifisch Tumorerkrankungen detektieren können [60].

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Messungen von AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP und AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP mit einer hohen Sensitivität und Spezifität, sowie einem guten PPV und die Ergebnisse unterstützenden AUROC-Werten Patienten mit Tumorerkrankungen von gesunden Probanden unterscheiden können. Dabei haben Merkmale wie Geschlecht, Alter und Metastasierung keinen Einfluss auf die Anzahl der Mikropartikel, die Anzahl der AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP korreliert jedoch mit dem Tumolvolumen in cm³ der Patienten mit CrC. Für das NSCLC konnten diese Zusammenhänge nicht beschrieben werden. In der Therapieüberwachung und Rezidiv-Früherkennung weist das Verfahren ebenfalls Potenzial auf, jedoch ist dies nicht als sehr hoch einzuschätzen. Nach R0 Resektion sinkt die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺ taMP bei Patienten mit CrC zwar an Tag 7 postoperativ, jedoch nicht auf das Level der Gesunden, und die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺CD147⁺ taMP sinkt nicht, was an der Erhöhung der AnnexinV⁺CD147⁺ taMP an Tag 7 postoperativ liegen könnte. Einen positiven Ausblick bietet hier wiederum, dass die Anzahl AnnexinV⁺EpCAM⁺ASGPR1⁺ taMP nach Resektion von Lebertumoren schon an Tag 2

signifikant abnimmt und auch an Tag 10 postoperativ niedrig bleibt [60]. So kann man davon ausgehen, dass die Verwendung anderer Antikörperkombinationen für die Messung der taMP auch in der Therapieüberwachung angewendet werden könnte.

Zwischen den bereits in der Klinik verwendeten Markern CEA /CA19-9 und der Anzahl taMP im Serum konnte in dieser Studie kein Zusammenhang festgestellt werden. Die Marker CEA und CA19-9 konnten auch nicht in Zusammenhang mit der Tumorlast gebracht werden, was für die Anzahl der taMP möglich war. Ein Vorteil des CEA gegenüber den taMP ist, dass er mit einer hohen Sensitivität Lebermetastasen des CrC anzeigen kann [28] und damit in der Therapieüberwachung ein besseres Potenzial aufweist. In der Diagnostik und Früherkennung ist der Marker mit einer Sensitivität von 36% [27] jedoch nicht in Gebrauch. Hier könnten die taMP in Zukunft an Bedeutung gewinnen, da sensitive Methoden zur Tumorfrüherkennung weiterhin fehlen und die Messung der taMP neben schon benannten Vorteilen ein minimalinvasives und wenig kostenintensives Mittel in der Früherkennung und Diagnostik von Tumorerkrankungen darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Allard JW, Matera J, Miller CM, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. (2005) Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research* 10: 6897-6904
- [2] Aralsi E, Kräer-Albers E, Nolte-‘t Hoen E, Peinado H, Psonka-Antonczyk KM, Rao P, et al. (2012) International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, April 17 Á 21, 2012: ISEV-2012, *Journal of Extracellular Vesicles* 1: 1-11
- [3] Beauchemin N, Arabzadeh A (2013) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 32: 643–671
- [4] Belov L, Zhou J, Christopherson RI (2011). Cell Surface Markers in Colorectal Cancer Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*12: 78-113
- [5] Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z(2011). Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer : A meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer* 47: 1928–1937
- [6] Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, et al (2003) High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J.* 145: 962-970
- [7] Bewick V, Cheek L, Ball J (2004) Statistics review 13: Receiver operating characteristic curves. *Critical Care* 8: 508-512
- [8] Boddy JL, Gal S, Malone PR, Shaida N, Wainscoat JS, Harris AL (2006). The role of cell-free DNA size distribution in the management of prostate cancer. *Oncol Res* 16: 35-41.
- [9] Boye K, Nesland JM, Sandstad B, Haugland Haugen M, Mælandsmo GM, Flatmark K (2012) EMMPRIN is associated with S100A4 and predicts patient outcome in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 107: 667-674

- [10] "BSG basigin (Ok blood group) [Homo sapiens (human)]" [Online] Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=682> (Stand 25.03.2018)
- [11] "Caecum und Colon" [Online], Verfügbar: <https://amboss.miamed.de/library#xid=rK0f3S> (Stand 28.04.2018)
- [12] „Cell Adhesion Molecules MeSH Descriptor Data 2018“ [Online] Verfügbar: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Cell%20Adhesion%20Molecules> (Stand 25.03.2018)
- [13] Chao M, Gibbs P (2009). Caution Is Required Before Recommending Routine Carcinoembryonic Antigen and Imaging Follow-Up for Patients With Early-Stage Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27: 279-280
- [14] Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, Yang J, Reis-Sobreiro M, de Candia P, et al. (2016) Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 1-17
- [15] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology* 19: 43-51
- [16] "Consensus-Bericht Kolorektales Karzinom der Österreichischen Gesellschaft für chirurgische Onkologie" [Online], Verfügbar: <https://www.aco-asso.at/publikationen/aco-asso-consensusberichte/consensus-bericht-kolorektalkarzinom/7-pathologie-des-kolorektalkarzinoms/> (Stand: 28.04.2018)
- [17] Darby S, Hill D, Auvinen A, Baysson H, Bochicchio F, Deo H, et al. (2004) Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 329: 1-6
- [18] De Kok JB, Hendriks JC, van Solinge WW, Willems HL, Mensink EJ, Swinkels DW (1998). Use of real-time quantitative PCR to compare DNA isolation methods. *Clinical*

chemistry 44: 2201-2204

[19] De Martino M, Klatte T, Haitel A, Marberger M (2012). Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: A diagnostic and prognostic marker. *Cancer* 118: 82-90

[20] „Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft: Häufigste Krebstodesursachen“ [Online], Verfügbar: https://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_6.html (Stand 14.01.2018)

[21] DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V (ed.) (2010) Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC). DGHO, Berlin

[22] Dhar P, Kalghatgi S, Saraf V (2015) Pancreatic Cancer in Chronic Pancreatitis. *Indian Journal of Surgical Oncology* 6: 57–62

[23] Dinkla S, Brock R, Joosten I, Bosman GJCGM (2013) Gateway to understanding microparticles: standardized isolation and identification of plasma membrane-derived vesicles Perspective. *Nanomedicine* 8: 1657-1668

[24] Distler JHW, Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS (2006) Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity* 39: 683-690

[25] Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K, et al. (2008) Surgery Versus Radiochemotherapy for Resectable Locally Invasive Pancreatic Cancer: Final Results of a Randomized Multi-Institutional Trial. *Surgery Today* 38: 1021–1028

[26] Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, et al. (2001) Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 858-65

[27] Duffy MJ (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful?. *Clinical Chemistry* 47: 624-630

[28] Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousová M, Holubec L, et al. (2014).

Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *International Journal of Cancer* 134: 2513-2522

[29] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48: 526–535

[30] El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 12: 347–357

[31] El-Gayar D, El Abd N, Hassan N, Ali R (2016). Increased free circulating DNA integrity index as a serum biomarker in patients with colorectal carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17: 939-944

[32] Elmunzer BJ, Singal AG, Sussman JB, Deshpande BJ, Sussman DA, Conte ML, et al. (2016) Comparing the effectiveness of competing tests for reducing colorectal cancer mortality: a network meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 81: 700–709

[33] „Epidemiologie: Statistische Grundlagen“ [Online]. Verfügbar: <https://www.lecturio.de/magazin/epidemiologie-statistische-grundlagen/#statistische-guetekriterien-diagnostischer-tests> (Stand: 26.04.17)

[34] Esmailsabzali H, Beischlag TV, Cox ME, Parameswaran AM, Park EJ (2013). Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods. *Biotechnology Advances* 31: 1063-1084

[35] „FDA CLEARs CELLSEARCH™ CIRCULATING TUMOR CELL TEST“ [Online] Verfügbar: <http://www.investor.jnj.com/releaseDetail.cfm?releaseid=296494> (Stand 25.05.2017)

[36] Fleitas T, Martínez-Sales V, Vila V, Reganon E, Mesado D, Martín M, et al. (2012) Circulating Endothelial Cells and Microparticles as Prognostic Markers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 7: 1-6

- [37] „Gebührenverordnung für Ärzte“ [Online] Verfügbar: <http://www.pkv.de/service/broschueren/rechtsquellen/gebuehrenordnung-fuer-aerzte.pdb.pdf> (Stand: 30.05.2017)
- [38] George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA (1982). Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 60: 834-40
- [39] „Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland Atlas: Inzidenz und Mortalität“ [Online]. Verfügbar: <http://www.gekid.de/> (Stand 08.03.17)
- [40] Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, et al. (2010). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 2010 64, Supplement 2: e1–e164
- [41] Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M (2015). Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biology of sex differences* 6: 10
- [42] György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2667–2688
- [43] Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ (1997). The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 315: 980-988
- [44] Hanley R, Rieger-Christ KM, Canes D, Emara NR, Shuber AP, Boynton KA, et al. (2006). DNA integrity assay: A plasma-based screening tool for the detection of prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 12: 4569-4574
- [45] Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, et al. (2014). Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 111: 1482-1489

- [46]] Hardingham JE, Grover P, Winter M, Hewett PJ, Price TJ, Thierry B (2015). Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer-20 Years of Progress To staging. *Molecular Medicine* 21: 25-31
- [47] Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, et al. (2009) A Compendium of Potential Biomarkers of Pancreatic Cancer. *PLoS Med* 6(4): e1000046
- [48] Herold G (ed.) (2017). *Innere Medizin*. Gerd Herold, Köln
- [49] Hewitson P, Glasziou PP, Irwig L, Towler B, Watson E (2007) Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 1. Art. No.: CD001216
- [50] Holdenrieder S, Burger A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P (2008). DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137: 162-170
- [51] Holme Ø, Bretthauer M, Fretheim A, Odgaard-Jensen J, Hoff G (2013) Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 9. Art. No.: CD009259.
- [52] Hulspas R, O’Gorman MRG, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR (2009) Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 76: 355-364
- [53] Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ (2007) CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology. *Experimental and Molecular Pathology* 83: 283–295
- [54] Inal JM, Ansa-Addo EA, Stratton D, Kholia S, Antwi-Baffour SS, Jorfi S, et al. (2012) Microvesicles in Health and Disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 60: 107–121

- [55] Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research* 61: 1659–1665
- [56] Jess T, Gomborg M, Matzen P, Munkholm P, Sørensen TIA (2005) Increased Risk of Intestinal Cancer in Crohn's Disease: A Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *American Journal of Gastroenterology* 100: 2724–2729
- [57] Jiang JL, Tang J (2007) CD147 and its interacting proteins in cellular functions. *Acta Physiologica Sinica* 59: 517–523
- [58] Jordan AR, Racine RR, Hennig MJP, Lokeshwar VB (2015). The role of CD44 in disease pathophysiology and targeted treatment. *Front. Immunol* 6:182
- [59] Julich H, Willms A, Lukacs-Kornek V, Kornek M (2014) Extracellular vesicle profiling and their use as potential disease specific biomarker. *Frontiers in Immunology* 5: 1-6
- [60] Julich-Haertel H, Urban SK, Krawczyk M, Willms A, Jankowski K, Patkowski W, et al. (2017). Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*
- [61] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS (2004). Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2: 1842–3
- [62] Kendrick AA, Schafer J, Dzieciatkowska M, Nemkov T, D'Alessandro A, Neelakantan D, et al. (2017) CD147: a small molecule transporter ancillary protein at the crossroad of multiple hallmarks of cancer and metabolic reprogramming. *Oncotarget* 8: 6742-6762
- [63] Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW (2004) Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 19: 182–186
- [64] Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ (1994) Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on

B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood* 84: 1415-142

[65] Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 5:957–971

[66] Kornek M, Lynch M, Mehta SH, Lai M, Exley M, Afdhal NH, Schuppan D (2012) Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 143: 448–458

[67] Kornek M, Popov Y, Libermann TA, Afdhal NH, Schuppan D (2011) Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 53: 230–242

[68] Kornek M, Schuppan D (2012). Microparticles: Modulators and biomarkers of liver disease. *Journal of Hepatology* 57: 1144-1146

[69] Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017

[70] „Laborlexikon“ [Online] Verfügbar: <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/c/CEA.htm> (Stand: 30.05.2017)

[71] Lang F, Silbernagel S (2009) Taschenatlas Pathofysiologie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

[72] Laroche C, Fairbairn I, Moss H, Pepke-Zaba J, Sharples L, Flower C, et al. (2000) Role of computed tomographic scanning of the thorax prior to bronchoscopy in the investigation of suspected lung cancer. *Thorax* 55: 359-363

[73] Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW (2016) Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology* 22: 1745-1755

[74] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe,

AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF
Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.htm>

[75] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF
Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Stand: 20.02.17)

[76] Leszinski G, Lehner J, Gezer U, Holdenrieder S (2014). Increased DNA Integrity in Colorectal Cancer. *In Vivo* 28: 299-304

[77] Leventis PA, Grinstein S (2010) The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annual Review of Biophysics* 39: 407–427

[78] Liebhardt S, Ditsch N, Nieuwland R, Rank A, Jeschke U, von Koch F, et al. (2010) CEA-, Her2/neu-, BCRP- and Hsp27-positive Microparticles in Breast Cancer Patients. *Anticancer Research* 30: 1707-1712

[79] Li Y, Xu J, Chen L, Zhong W-D, Zhang Z, Mi L, et al. (2009) HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection. *Histopathology* 54: 677–687

[80] Lüttmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie, 3.Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

[81] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 350: 2129-39

[82] Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, De Leng WWJ, Montgomery EA (2018) Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology* 50: 49–59

[83] Manser R, Lethaby A, Irving LB, Stone C, Byrnes G, AbramsonMJ, Campbell D (2013) Screening for lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 6. Art.

No.: CD001991

[84] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al.(2015) Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523: 177–182

[85] Messmann H, et al. (2006). Atlas of Colonoscopy : Techniques, Diagnosis, Interventional Procedures. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

[86] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008) Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings* 83: 584-594

[87] Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P (1987) Immunohistochemical Study of the Expression of a Mr 34 , 000 Human Epithelium-specific Surface Glycoprotein in Normal and Malignant Tissues. *Cancer Research* 47: 2883-2891

[88] Mrvar-Brečko A, Šuštar V, Janša V, Štukelj R, Janša R, Mujagić E, et al. (2010) Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 44: 307- 312

[89] Mueller-Hermelink HK, Pfeifer U, Roessner A (eds.) (2008) Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. 11. Auflage. Elsevier GmbH, München

[90] Muenz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O (2004) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c- myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23: 5748-5758

[91] Munz M, Baeuerle PA, Gires O (2009) The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Research* 69: 5627-5630

[92] Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of cell science* 123: 1603–1611

- [93] Negin BP, Cohen SJ (2010). Circulating tumor cells in colorectal cancer: Past, present, and future challenges. *Current Treatment Options in Oncology* 11: 1-13
- [94] Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz S, Marcus PM. Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 84:1572-5
- [95] Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. (2007) Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. *JAMA* 297: 267-277
- [96] Omoto S, Nomura S, Shouzu A et al (2002) Detection of monocyte- derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 45: 550–555
- [97] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 13368-13373
- [98] Pomatto MAC, gai C, Bussolato B, Camussi G (2017) Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. *Frontiers in Molecular Biosciences* 4: 1-22
- [99] Poruk KE, Firpo MA, Mulvihill SJ (2014). Screening for Pancreatic Cancer. *Advances in Surgery*, 48: 115–136.
- [100] Recio-Boiles A, Cagir B (2017) Cancer, Colon. StatPearls Publishing LLC [Online] Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/> (Stand 16.01.2018)
- [101] Renz-Polster H, Krauzig S (eds.) (2008) Basislehrbuch Innere Medizin-Kompakt, greifbar, verständlich. 4. Auflage. Elsevier GmbH, München
- [102] Robert Koch-Institut (Hrsg) (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Berlin
- [103] Roca E, Lacroix R, Judicone C, Laroumagne S, Robert S, Cointe S, et al. (2015)

Detection of EpCAM-positive microparticles in pleural fluid: A new approach to minimally invasively identify patients with malignant pleural effusions. *Oncotarget* 7: 3357-3366

[104] Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2012) *Prometheus, LernAtlas der Anatomie: Innere Organe*. 3., überarbeitete und erweiterte Ausgabe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

[105] Simak J, Gelderman MP (2006) Cell membrane microparticles in blood and blood products: Potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion Medicine Reviews* 20: 1-26

[106] Son SM, Han HS, An JY, Choe KH, Lee KM, Lee KH, et al. (2015) Diagnostic performance of CD66c in lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion: comparison with CEA, CA 19-9, and CYFRA 21-1. *Pathology* 47: 123–129

[107] Spurr NK, Durbin H, Sheer D, Parkar M, Bobrow L, Bodmer WF (1986) Characterization and chromosomal assignment of a human cell surface antigen defined by the monoclonal antibody AUAI. *International Journal of Cancer* 38: 31-636

[108] Stikma J, Grootendorst DC, Van Der Linden PWG (2014). CA 19-9 as a marker in addition to CEA to monitor colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 13: 239-244

[109] Stötzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, Nagel D, Holdenrieder S (2014). Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. *Tumor Biology* 35: 1183-1191

[110] Subramanian J, Govindan R () Lung Cancer in Never Smokers: A Review. *Journal of Clinical Oncology* 25: 561-570

[111] Tagore KS, Lawson MJ, Yucaitis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, et al. (2003) Sensitivity and Specificity of a Stool DNA Multitarget Assay Panel for the Detection of Advanced Colorectal Neoplasia. *Clinical Colorectal Cancer* 3: 47-53

[112] „The top 10 causes of death“ [Online] Verfügbar: <http://www.who.int/mediacentre>

[113] Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Current Protocols in Cell Biology* 2016: 3.22.1-3.22.29

[114] Tian F, Appert HE, Myles J, Howard JM (1992) Prognostic Value of Serum CA 19-9 Levels in Pancreatic Adenocarcinoma. *Annals of Surgery* 215: 350-355

[115] Torino F, Bonmassar E, Monmassar L, de Vecchis L, Barnabei A, Zuppi C (2013). Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer Treatment Reviews* 39: 759-772

[116] Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC (2007) Epithelial Cell Adhesion Molecule: More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *The American Journal of Pathology* 171: 386-395

[117] Tsikitis VL, Malireddy K, Green EA, Christensen B, Whelan R, Hyder J, et al. (2009). Postoperative Surveillance Recommendations for Early Stage Colon Cancer Based on Results From the Clinical Outcomes of Surgical Therapy Trial. *Journal of Clinical Oncology* 27: 3671-3676

[118] Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F (2014) Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *American journal of physiology. Cell physiology* 306: C621–C633

[119] Van Bitterswijk WJ, Emmelot P, Hilkmann HAM, Hilgers J, Feltkamp CA (1979) Rigid plasma-membrane-derived vesicles, enriched in tumor-associated surface antigens (M1r), occurring in the ascites fluid of a murine leukaemia (GRSL). *International Journal of Cancer* 23: 62-70

[120] Van der Gun BTF, Melchers LJ, Ruiters MHJ, de Leij LFMH, Mclaughlin MJ, Rots MG (2010) EpCAM in carcinogenesis : the good , the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 31: 1913–1921

- [121] Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews* 64: 676–705
- [122] Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, Van Leeuwen TG, Nieuwland R (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8: 2596–2607
- [123] Van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R (2009) Cell-derived microvesicles and cancer. *Netherlands Journal of Medicine* 67: 266–273
- [124] von Kleist S, Chavanel G, Burtin P (1972). Identification of an Antigen from Normal Human Tissue That Crossreacts with the Carcinoembryonic Antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 2492-2494
- [125] Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW (2014) Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* 91: 586–594
- [126] Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan THM, Clarke CA, Holmberg Lars, et al. (2009) Lung cancer incidence in never-smokers. *Journal of Clinical Oncology* 25: 472–478
- [127] Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. (2003). Increased Plasma DNA Integrity in Cancer Patients. *Cancer Research* 63: 3966–3968
- [128] Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, Inoue A, Sugawara S, et al. (2014) Effectiveness of Gefitinib against Non–Small-Cell Lung Cancer with the Uncommon EGFR Mutations G719X and L861Q. *Journal of Thorac Oncology* 9: 189–194
- [129] 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

- [130] Wild CP, Stewart BW(eds.) (2014). *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- [131] Willms A, Müller C, Julich H, Klein N, Schwab R, Richardsen I, et al. (2016). Tumour-associated circulating microparticles: A novel liquid biopsy tool for screening and therapy monitoring of colorectal carcinoma and other epithelial neoplasia. *Oncotarget*, Advance Publications: 1-9
- [132] Wilson MC, Meredith D, Manning Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP (2005) Basigin (CD147) Is the Target for Organomercurial Inhibition of Monocarboxylate Transporter Isoforms 1 and 4. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 27213-27221
- [133] Winawer SJ, Zauber A, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 329: 1977-81
- [134] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles* 2: 1–25
- [135] „WHO: Cancer key facts“ [Online] Verfügbar:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Stand 28.02.17)
- [136] Xie X, Wang CY, Cao YX, Wang W, Zhuang R, Chen LH, et al. (2005) Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. *World Journal of Gastroenterology* 11: 344-347
- [137] Xiong L, Edwards CK, Zhou L (2014) The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: A review of the current scientific literature. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 17411–17441
- [138] Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, Pestell RG, et al. (2015) The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development. *OncoTargets and Therapy* 8: 3783–3792

- [139] Xua X, Lin N, Li Y, Zhi C, Shen H (2013) Expression of HAb18G/CD147 and its localization correlate with the progression and poor prognosis of non-small cell lung cancer. *Pathology - Research and Practice* 209: 345-352
- [140] Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyrén O, Adami HO, Ekblom A (2002) Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut* 51: 236–239
- [141] Yuana Y, Bertina RM, Osanto S (2011) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thrombosis and Haemostasis* 105.3: 396-408
- [142] „Zellfreie DNA“ [Online]. Verfügbar: <http://flexikon.doccheck.com/de/CfDNA> (Stand 07.06.2017)
- [143] Safi F, Beger HG (1991) Ist die Tumornachsorge beim kolorektalen Karzinom sinnvoll. *Deutsche Medizinische Wochenschrift - Georg Thieme Verlag KG* 116, 1001-1007

7. Abkürzungsverzeichnis

-	negative Population
+	Positive Population
#	Anzahl
°C	Grad Celsius
%	Prozent
ANOVA	Analysis of variance (Varianzenanalyse)
APC	Allophycocyanin
APC-Vio770	Allophycocyanin-Vio770
ATP	Adenosintriphosphat
AUROC	Area under Receiver-Operating-Characteristic
BSA	Bovinem Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CA125	Cancer-Antigen 125
CCA	Cholangiokarzinom
CD44	Cluster of differentiation 44
CD66c	Cluster of differentiation 66c
CD147	Cluster of differentiation 147, siehe EMMPRIN
CD326	Cluster of differentiation 326, siehe EpCAM
CEA	carcinoembryonale Antigen
cfDNA	cell free DNA (zellfreie DNA)
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CrC	Kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
CTC	Circulating tumor cells (zirkulierende Tumorzellen)
ctDNA	Circulating tumor DNA (zirkulierende Tumor-DNA)
e.V.	Eingetragener Verein
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
EP	Extrazelluläre Partikel
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigung
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDI	Human Development Index
HPV	Humanes Papillomavirus
Hu-FcR	Human fragment crystallisable rezeptor
kDa	Kilodalton
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	micro ribonucleic acid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MP	Mikropartikel
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Microsoft
n	Anzahl
nm	Nanometer
NPV	Negativ prediction value (negativer prädiktiver Wert)
n.s.	Nicht signifikant
NSCLC	Nicht- kleinzelliges Lungenkarzinom
n.v.	Nicht verfügbar
p	Signifikanzwert
PaCa	Pankreaskarzinom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE-Cy 7	Phycoerythrin- Cychrome 7
PPV	Positiv prediction value (positiv prädiktiver Wert)
PS	Phosphatidylserin
ROC	Receiver-Operating-Characteristic (Grenzwertoptimierungskurve)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
TaMP	Tumorassoziierte Mikropartikel
UICC	Union for International Cancer Control
USA	United States of America
x	Mal
µl	Mikroliter

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Dr. Miroslaw Kornek danken. Miroslaw, danke für diese und all die anderen Chancen, die du mir gegeben hast. Danke für dein Vertrauen, deine Unterstützung, deine Geduld (die ganz besonders), deine Geschichten, deine Fachkenntnis und dein offenes Ohr für alle Fragen. Danke, dass ich mit dir und für dich arbeiten durfte, es hat sehr viel Spaß gemacht.

Ein weitere besonderer Dank gilt Junior Prof. Dr. Dr. Veronika Lukacs-Kornek, die ebenfalls viel zu dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank für all die Hilfe und Unterstützung, die ich von dir erhalten habe. Und natürlich für all den Tee.

Rike möchte ich danken für die Unterweisung und die vielen Ratschläge, die sie mir gegeben hat, ohne deine Überwachung wäre ich bestimmt nicht so schnell fit geworden in der Handhabung der Proben und der Auswertung. Ihr und Sabine gilt zudem ein großer Dank für die weiterführenden Studien und die damit verbunden Veröffentlichung, die ich in dieser Studie verwenden durfte. Christoph möchte ich danken für seine Tipps und sein Wissen.

Ich möchte Niklas danken, ohne den ich wahrscheinlich nie im Labor von Veronika und Miroslaw hätte anfangen können und der mein ganzes Studium an meiner Seite war und mich unterstützt hat. Ich hoffe, du bleibst noch lange Zeit an meiner Seite, ich liebe dich.

Dann möchte ich natürlich meiner Familie und meinen Freunden danken (auch wenn ich nicht alle namentlich erwähnen kann, das würde den Rahmen sprengen).

Mama und Papa, danke für eure Unterstützung, ohne euch hätte ich das Studium nicht so sorgenfrei durchziehen können und die Zeit für diese Arbeit vermutlich nicht aufbringen können. Und vielen Dank dafür, dass ihr mir immer wieder zuhört, wenn ich mal wieder jammern muss und immer für mich da seid.

Luci, vielen Dank für deine Tipps, ich hoffe, ich habe sie beherzigt und mache mit dieser Arbeit keinem Bibliothekar das Leben schwer.

Gereon, danke fürs zuhören und deine eher schlechte als rechte Fähigkeit mich zu motivieren (awkward sibling hug *Pat.Pat*). Mein Schuhbild ist besser.

Antje, danke für deine Unterstützung und dafür, dass du immer für mich da warst wenn ich Ablenkung gebraucht habe.

Ailsa, danke, dass du mich motiviert hast und für deine Hilfe beim Übersetzen des Abstract.