

Automatisierte Anreicherung, Markierung und Detektion von seltenen Tumorzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Durchgeführt am Fraunhofer ICT-IMM



Lisa Schott

geb. am 30.06.1988 in Mainz

Mainz, den 24.03.2016

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2016

D77

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1. Zirkulierende Tumorzellen und Flüssigbiopsie	5
1.1.1. Zirkulierende Tumorzellen als prognostischer Faktor	7
1.1.2. Therapieüberwachung mittels zirkulierender Tumorzellen	8
1.1.3. Zirkulierende Tumorzellen in der Forschung	8
1.2. Das „CTC-Projekt“ am Fraunhofer ICT-IMM	8
1.3. Anforderung an ein automatisiertes Anreicherungssystem	9
1.4. Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen	11
1.4.1. Physikalische Eigenschaften	11
1.4.2. Biologische Eigenschaften	16
1.5. Detektion der CTCs	21
1.5.1. PCR basierte Detektion	21
1.5.2. Durchflusszytometrie	21
1.6. Fluoreszenzmarkierung von CTCs	24
1.6.1. Realisierung der automatisierten Anreicherung, Markierung und Detektion im Rahmen des CTC-Projektes	25
2. Material und Methoden	29
2.1. Material	29
2.1.1. Zelllinien	29
2.1.2. Blutproben	29
2.1.3. Bioreagenzien und Chemikalien	30
2.1.4. Magnetische Partikel	32
2.1.5. Geräte	32

2.1.6.	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.7.	Verbaute Materialien	34
2.1.8.	Verwendete Software	35
2.1.9.	Puffer, Lösungen und Medien	35
2.2.	Methoden	37
2.2.1.	Zellkultur	37
2.2.2.	CFSE Färbung	38
2.2.3.	Manuelle Einzelaufnahme der Zellen	39
2.2.4.	Referenzmethode für die immunomagnetische Separation	39
2.2.5.	Bestimmung der Fangrate	40
2.2.6.	Vitalitätsbestimmung mittels CASY Counter	40
2.2.7.	Vitalitätsbestimmung in verschiedenen Anreicherungssystemen	41
2.2.8.	Funktionalisierung der Magnetpartikel mit Antikörpern	42
2.2.9.	Anreicherungsprotokoll	45
2.2.10.	Optimierung der Waschpuffer für die immunomagnetische Separation	56
2.2.11.	Antikörper Fluoreszenzkopplung	56
2.2.12.	Zelldetektion	59
2.2.13.	Optimierung des Färbepuffers	61
2.2.14.	Fluidikablauf	62
2.2.15.	Sedimentationstest mit Xanthan	63
2.2.16.	Ficolldichtegradientenzentrifugation	65
2.2.17.	Bestimmung der Kreuzreaktionen	65
2.2.18.	Bestimmung des Leukozytenhintergrunds	66
2.2.19.	Einstellung des Hüllstroms zur Verringerung der Leukozytenkontamination	67
3.	Ergebnisse	71
3.1.	Automatisierte immunomagnetische Zellanreicherung	71
3.1.1.	Auswahl des Anreicherungssystems	72
3.1.2.	Fangeffizienz unterschiedlicher Magnetpartikel	73
3.1.3.	Optimierung der Magnetpartikelfunktionalisierung	75
3.1.4.	Optimierung der Flüssigkeitsaufnahme	76
3.1.5.	Systemtest mit Streptavidinpartikel	77

3.1.6.	Pufferoptimierung	78
3.2.	Verminderung der Zellverluste	79
3.3.	Fluoreszenzmarkierung	80
3.3.1.	Fluoreszenzintensität verschiedener Fluoreszenzkopplungen	81
3.3.2.	Fluoreszenzintensitäten verschiedener Antikörper-basierter Oberflächenmarkierungen	81
3.3.3.	Quantum Dot-Konzentration	83
3.3.4.	Zeitliche Optimierung des Protokolls	83
3.3.5.	Quantum Dot-Kompatibilität mit magnetischen Partikeln .	86
3.3.6.	Optimierung des Färbepuffers	88
3.4.	Detektion	89
3.4.1.	Bestimmung der Kreuzreaktionen	89
3.4.2.	Bestimmung der Reinheit - Detektion von Leukozyten . . .	90
3.4.3.	Unterschiede in der Geschwindigkeit von Leukozyten und MCF-7 Zellen	91
3.4.4.	Variation der Hüllstromflussrate	92
3.5.	Gesamtaufbau	96
4.	Diskussion	99
4.1.	Anreicherung	100
4.1.1.	Magnetische Partikel	101
4.1.2.	Partikeloptimierung	102
4.1.3.	Systemtest	106
4.1.4.	Pufferoptimierung	107
4.1.5.	Zellsedimentation	108
4.2.	Fluoreszenzmarkierung und -Detektion	109
4.2.1.	Optimierung der Quantum Dot-Konzentration	111
4.2.2.	Optimierung des Protokollablaufs	112
4.2.3.	Optimierung der QDs Inkubationszeiten	114
4.2.4.	Kreuzreaktionen der Quantum Dots	114
4.2.5.	Färbepufferoptimierung	114
4.3.	Prozesszeit	116
4.4.	Bestimmung der Reinheit - Detektion von Leukozyten	116
4.4.1.	Kreuzreaktionen zwischen Leukozyten, Quantum Dots und Partikeln	116

4.4.2. Minimierung des Leukozytenbeifangs durch Anpassung des Hüllstroms	118
4.5. Gesamtgerät	120
4.6. Zusammenfassung und Ausblick	122
A. Programmabläufe	125
A.1. Programmablauf halb-automatisiert	125
A.2. Programmablauf automatisierte Anreicherung	127
Nomenklatur	137
Abbildungsverzeichnis	141
Tabellenverzeichnis	145
Literaturverzeichnis	147

Kurzfassung

Epitheliale Tumore gehören zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Industrieländer. Allerdings sterben die meisten Patienten nicht an den Folgen eines Primärtumors, sondern durch die daraus entstandenen Metastasen, welche durch sogenannte zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) ausgelöst werden. CTCs lösen sich vom Tumor und dringen in den Blutkreislauf ein. Dort zirkulieren die CTCs durch den Körper und können durch Ablagerung Metastasen auslösen. CTCs sind in den letzten Jahren durch ihre enorme prognostische Relevanz immer weiter in den Fokus der Onkologie gerückt. Denn durch Zählung und Charakterisierung der CTCs können Aussagen über die Überlebenschance eines Patienten getroffen, der Prozess der Metastasierung genauer erforscht und neue Therapieansätze entwickelt werden. Die Charakterisierung der Zellen ist allerdings abhängig von Technologien die CTCs detektieren und isolieren können. Bei der Entwicklung solcher Techniken muss auf hohe Sensitivität und Reinheit bei der Isolation sowie geringen Aufwand für den Endanwender Wert gelegt werden. Daher liegt der Fokus des CTC-Projekts vom Fraunhofer ICT-IMM auf der Entwicklung eines vollständig automatisierten Systems zur Anreicherung, Markierung und Detektion von seltenen Tumorzellen. Zur Realisierung dieses Vorhabens wurden in dieser Arbeit zuerst verschiedene immunomagnetische Anreicherungs-systeme auf den Vitalitätsverlust der Zellen überprüft. Das System mit dem niedrigsten Vitalitätsverlust wurde dann weiterentwickelt und vollständig automatisiert. Die in dem System verwendeten Magnetpartikel und Waschpuffer wurden auf das System abgestimmt. Damit die seltenen Zellen detektiert werden konnten, wurde eine automatisierte Quantum Dot Färbung etabliert. Nach der Färbung konnten die Zellen in einen mikrofluidischen Chip überführt und dort durch die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenzemission detektiert werden. Durch die Optimierung des Anreicherungsablaufs konnte eine Wiederfindungsrate von 96 % erreicht werden. Nach einem kompletten Durchlauf des automatisierten Systems ist mit einer Wiederfindungsrate von 62 % zu rechnen.

Abstract

Epithelial tumors are one of the leading causes of death in western industrial countries. However, most of the cancer deaths aren't caused through primary tumors but from distant metastases. Metastases are caused by circulating tumor cells (CTCs), which are released from the primary tumor. Through intravasation into the bloodstream CTCs are able to disseminate across the whole body. By extravasation at distant organs CTCs can cause metastasis. Through their vast prognostic relevance CTCs became more important in oncology during the past few years. For instance the total number of CTCs can be used to assess the chance of survival for patients suffering from metastatic cancer. Furthermore, characterization of CTCs enables the close studying of the process of metastasis hopefully leading to the discovery of new therapies. The ability to characterize CTCs is heavily dependant on the availability of the technology that is capable of detecting and isolating CTCs. High sensitivity for the target cells and pureness of isolation are crucial for the performance of such a technology. Besides this, a short overall processing time is beneficial for the end user. Therefore, a fully automated system for enrichment, labeling and detection of rare tumor cells will be presented in this work. Different immunomagnetic enrichment systems were tested and the system found to be most efficient was improved and automated. Consumables were optimized to perform within the of the automated system. In order to reliably detect the enriched CTCs an automated quantum dot staining procedure is established. After being transferred into a microfluidic chip the fluorescently stained target cells are detected by use of method of spatially modulated fluorescence emission. Continuous optimisation of the enrichment process yielded a recovery rate of 96 %. A complete cycle of the automated system has a projected recovery rate of 62 %.

1. Einleitung

1.1. Zirkulierende Tumorzellen und Flüssigbiopsie

Epitheliale Tumore sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern [1]. Allein im Jahr 2013 erlagen 25 % aller in Deutschland verstorbenen Menschen einem Krebsleiden [2].

Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Tumore als eine „Neubildung von Gewebe durch spontanes, irreversibles und autonomes Wachstum von körpereigenem Gewebe“ beschrieben [1]. Die Zellfunktionen und somit das weitere Wachstum solcher Tumore kann jedoch ab einer Größe von 3 mm^3 nur noch durch eine eigene Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr aufrechterhalten werden. Der sogenannte „angiogenen Switch“ stimuliert die Angiogenese, also die Neubildung von Gefäßen und stellt somit die eigene Versorgung des Tumors her [3]. Durch weiteres Wachstum, zu hohem Druck des umgebenden Gewebes auf den Tumor oder externe Kräfte wie beispielsweise Reibung werden Tumorzellen passiv aus ihrem Zellverband gelöst und in die Blutgefäße gedrückt, dieser Vorgang wird als passive Intravasation bezeichnet [4]. Die Tumorzellen zirkulieren daraufhin im Blutkreislauf durch den Körper. Diese Zellen werden daher auch zirkulierende Tumorzellen (CTC, *engl. circulating tumor cells*) genannt. Die CTCs gelangen über den Blutkreislauf zu entfernten Geweben und können dort Metastasen auslösen (siehe Abbildung 1.1).

Neben der passiven Intravasation gibt es auch die aktive Intravasation. Bei der aktiven Intravasation kommt es während des Wachstums des Tumors zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), bei der es zu vielen inter- und intrazellulären Veränderungen der Tumorzellen kommt. Die ursprünglich epithelialen Zellen verlieren ihren Phänotyp und erwerben mesenchymale Eigenschaften. Beispielsweise wird die apicobasale Polarisierung der Zelle aufgelöst und die Expression der für die Zellkontakte zuständigen Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise E-Cadherin

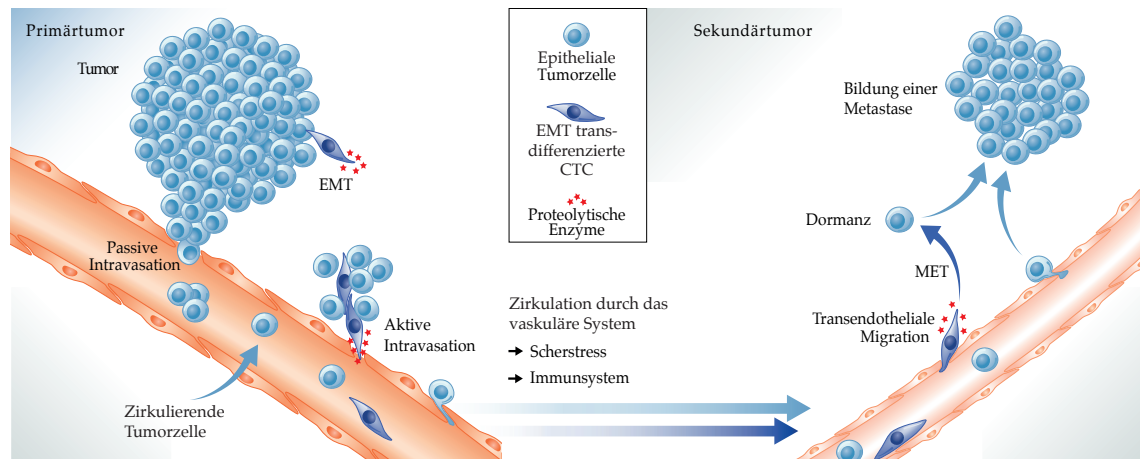


Abbildung 1.1.: Durch passive oder aktive Intravasation können Tumorzellen in das vaskuläre System migrieren. Dort zirkulieren die Zellen passiv durch den Körper und werden deshalb auch als zirkulierende Tumorzellen (CTC, *circulating tumor cells*) bezeichnet. Lagern sich die Zellen an einer Stelle im Körper ab, können sie durch weiteres Wachstum Metastasen auslösen (modifiziert nach Joosse *et al.* [4]).

und Zytokeratine, herunter reguliert. Zeitgleich werden mesenchymale Moleküle wie Vimentin und N-Cadherin hoch reguliert, wodurch die Zellen einen mesenchymalen Phänotyp erlangt [5]. Durch die EMT sind transdifferenzierte Tumorzellen in der Lage aktiv zu migrieren und die basale Membran zu überwinden [6, 7]. Über den umgekehrten Prozess der EMT, der mesenchymalen-epithelialen-Transition (MET) können diese Zellen epitheliale Metastasen auslösen [4].

Ungefähr 90 % der Krebsarten sind epithelialen Ursprungs und 90 % der krebsbedingten Todesfälle sind wiederum nicht auf den primären Tumor, sondern auf Metastasen zurückzuführen [5, 8]. Daher ist die genauere Analyse der CTCs enorm wichtig für die Krebsforschung, dies erkannte schon 1869 der australische Arzt Thomas Ashworth, welcher als erster die Existenz der zirkulierenden Tumorzellen dokumentierte [9].

Durch die Anwesenheit von CTCs im Blut von Krebspatienten ist das Interesse an der „Flüssigbiopsie“ (*engl. liquid biopsy*) in den letzten Jahren stetig gestiegen. Die Flüssigbiopsie ist ein Bluttest, bei dem mit hoher analytischer Sensitivität einzelne Tumormarker untersucht werden können [10, 11, 12]. Als Tumor Biomarker sind mittlerweile neben den CTCs auch zellfreie DNA (*engl. cell free DNA*, cfDNA) oder Exosome anerkannt. Infolgedessen werden immer mehr automatisierte Systeme entwickelt, die die Anreicherung der Tumorbiomarker ermöglichen.

Zellfreie DNA kann bei 70 % der Tumore nachgewiesen werden. Jedoch schwankt dies abhängig von der Tumorentität und dem Tumorstadium. Beispielsweise kann bei Ovarialkarzinomen in fast 100 % der Fälle cfDNA nachgewiesen werden, während bei metastasierendem Prostata- und Nierenzellkarzinomen nur bei 40 % cfDNA nachgewiesen werden kann. Auch die Herkunft von cfDNA ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch die hohe Varianz der cfDNA Konzentration und der ungeklärten Herkunft ist es derzeit noch problematisch cfDNA als Tumormarker einzusetzen [13]. Neben der cfDNA gelten auch Exosome als Biomarker für Tumore, dies sind kleine Vesikel, die von vielen Zellen sezerniert werden. Sie enthalten unter anderem mRNA, miRNA, DNA, Proteine oder Cytokine. Exosome werden von vielen verschiedenen Zellarten sekretiert, daher ist die Zusammensetzung der Proteine und Nukleinsäuren in den Vesikeln sehr unterschiedlich [14]. Einer in der breite anwendbaren und auf Exosomen basierenden Diagnostik stehen derzeit noch die zur Isolation aus dem Blut nötigen Techniken (Zentrifugation, Filtration) entgegen, die nicht für den Einsatz in Hochdurchsatz-Screenings geeignet sind. [15, 16].

Zirkulierende Tumorzellen sind hingegen mittlerweile etablierte Tumormarker. Viele Studien haben gezeigt, dass CTCs als prognostische Marker eingesetzt werden können. Weiterhin können CTCs in der Therapieüberwachung und Forschung verwendet werden. Auch das derzeit einzige von der US Amerikanischen „Food and Drug Administration“ (FDA, dt. Nahrungs-und-Medizin-Verwaltung) zugelassene Flüssigbiopsie System „CellSearch“ (Janssen Diagnostics, LLC, USA) basiert auf der Anreicherung von CTCs.

1.1.1. Zirkulierende Tumorzellen als prognostischer Faktor

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen als prognostischer Faktor bezüglich der Überlebenschance eines Patienten verwendet werden kann. Befinden sich in einer 7,5 mL Blutprobe mehr als fünf zirkulierende Tumorzellen, wird dies mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert [17, 18, 19, 20]. Typischerweise werden bei einem Krebspatienten mit Metastasen 1-10 Zellen pro Milliliter Vollblut detektiert [21]. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorprogression ist bei Patienten mit mehr als fünf detektierten CTCs fünffach höher, als bei Patienten bei denen weniger als fünf CTCs gefunden wurden [22].

1.1.2. Therapieüberwachung mittels zirkulierender Tumorzellen

Zirkulierende Tumorzellen überleben nicht länger als 24 Stunden im Blutstrom eines Patienten. Insofern gibt die Anzahl der CTCs den Echtzeit-Status des Patienten wieder [8, 23]. Eine Änderung der CTC-Anzahl eines Patienten ist auf die Tumorprogression oder Tumorregression zurückzuführen. Infolgedessen können CTCs zur Therapieüberwachung verwendet werden. Eine sinkende Anzahl an Tumorzellen weist darauf hin, dass die angewandte Therapie bei einem Patienten positive Auswirkungen hat [24].

1.1.3. Zirkulierende Tumorzellen in der Forschung

Mehr als 100 unterschiedliche Krebsarten und Subtypen von Tumoren sind bekannt [25]. Der Prozess der Metastasierung ist allerdings bis heute nicht vollständig erforscht [26]. Eine Analyse der zirkulierenden Tumorzellen ermöglicht die Erforschung des Prozesses und somit auch die Entwicklung neuer angepasster Therapieansätze. Folglich kann dadurch die Überlebenschancen eines Krebspatienten maßgeblich erhöht werden, denn für fast alle Krebsarten gilt, dass die Überlebenschancen eines Patienten durch eine angepasste Therapie und eine Früherkennung steigen [1]. Der Vorteil der Einzelzellanalyse von zirkulierenden Tumorzellen ist, dass der Patient durch die Entnahme von peripherem Blut nur einem minimal invasiven Eingriff ausgesetzt ist. Die Blutentnahme kann daher regelmäßig durch standardmäßige Blutentnahme durchgeführt werden [17].

1.2. Das „CTC-Projekt“ am Fraunhofer ICT-IMM

Für die Anreicherung von CTCs sind in den letzten Jahren viele Systeme entwickelt worden [27] (siehe Kapitel 1.4). Bis jetzt fehlte jedoch ein System, welches voll automatisiert zirkulierende Tumorzellen anreichern, markieren, detektieren und isolieren kann, sodass die Zellen danach für molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden können. Daher wurde im Rahmen eines Verbundprojektes des CI3-Clusters (Cluster für Individualisierte Immunintervention) unter Förderung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) das Ziel gesetzt, ein Mikrofluidik-basiertes System zur Anreicherung und Einzelzell-Analyse von zirkulierenden Tumorzellen zu entwickeln.

Unter der Bezeichnung „CTC-Projekt“ hat das Fraunhofer ICT-IMM im Rahmen des Verbundprojektes die Entwicklung der automatisierten Anreicherung, Fluoreszenzmarkierung, Detektion und Isolation einzelner zirkulierender Tumorzellen aus einer 7,5 mL Blutprobe übernommen.

Als Teil des CTC-Projektes wurde sich in dieser Doktorarbeit zuerst ein Überblick über den Stand der Technik im Bereich der CTC Anreicherung verschafft. Dieser Überblick wurde dazu verwendet eine geeignete Anreicherungsmethode zu entwickeln, die eine automatisierte Zellanreicherung mit geringem Vitalitätsverlust ermöglicht. Auch die Optimierung der für die Anreicherung benötigten immunomagnetischen Partikel, Puffer und Einwegartikel, um die Effizienz des Systems zu steigern, stand im Fokus dieser Arbeit. Die Anpassung der Fluoreszenzmarkierung der Zellen an die Anreicherungseinheit und die parallel vom Fraunhofer ICT-IMM entwickelte Detektionsmethode durch Protokoll- und Pufferoptimierung war ebenfalls Teil dieser Arbeit. Außerdem wurde die Reinheit der aufgereinigten Probe und die Anreicherungseffizienz des Gesamtsystems bestimmt.

1.3. Anforderung an ein automatisiertes Anreicherungssystem

Wie oben beschrieben ist die Anzahl von CTCs im Blut zum Teil sehr gering und macht die Anreicherung und Isolierung dadurch zu einer anspruchsvollen Aufgabe [28, 29]. Durch die geringe CTC-Anzahl ergeben sich zwei Anforderungen an das System. Zum einen muss das System sehr sensitiv sein, denn alle in einer Blutprobe vorhandene CTCs sollten angereichert und detektiert werden, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Zum anderen muss das System eine hohe Spezifität aufweisen, damit es nicht zu falsch positiven Ergebnissen kommt. Neben der Sensitivität und Spezifität ist auch die Vitalität der Zellen zu berücksichtigen. Durch effektives und schonendes Anreichern der CTCs, kann die Qualität des Probenmaterials für eine anschließende molekulare Charakterisierung, wie beispielsweise PCR (*engl.: polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion), Real-Time-PCR, in situ Hybridisierung oder Immunohistochemie verbessert werden. Mit diesen Methoden können sehr detaillierte Informationen über den Tumor gewonnen werden, so dass jeder Patient - im Sinne der „personalisierten Medizin“ individuell behandelt werden kann.

In den letzten Jahren wurde immer mehr über die sogenannte „personalisierte Medizin“ diskutiert. Vor allem in der Onkologie werden aufgrund der enormen Diversität der Tumore durch eine personalisierte Therapie verbesserte Therapieerfolge erwartet [30, 31]. Für Brust-, Lungen- und Darmkrebs gibt es inzwischen viele diagnostische Tests. 1998 wurde beispielsweise das erste Medikament für die personalisierte Therapie von HER2-positivem Brustkrebs zugelassen [32].

Viele Erkrankungen werden jedoch nicht durch eine einzelne Mutation oder Genvariation ausgelöst, daher ist eine detailliertere Analyse nötig. Solch eine Analyse wird durch das Next Generation Sequencing (NGS) ermöglicht. Im Rahmen des „Cancer Genome Project“ wurden beispielsweise schon unter Einsatz der NGS-Analyse verschiedene Mutationsspektren unterschiedlicher Tumorentitäten analysiert [33]. Durch die Analyse von einzelnen CTCs hinsichtlich mehrere Biomarker, kann ermittelt werden, welches der Medikamente bei einem Patienten am besten wirken kann.

Der ökonomische Aspekt darf bei der personalisierten Medizin auch nicht außer Acht gelassen werden. Insofern muss das System möglichst kostengünstig, mit minimalem Arbeitsaufwand und hohem Durchsatz betrieben werden können [34].

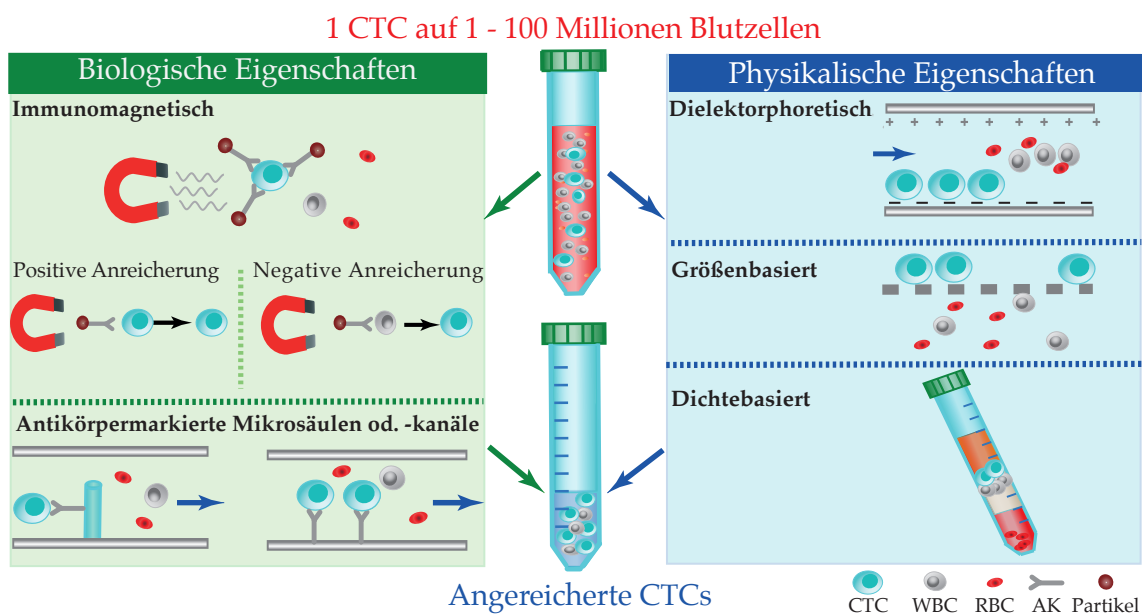


Abbildung 1.2.: Zirkulierende Tumorzellen unterscheiden sich in physikalischen und biologischen Eigenschaften von normalen Blutzellen. Durch Ausnutzung dieser Unterschiede als CTC-Marker können die Zellen angereichert werden.

1.4. Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen

Die Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen ist nicht allein aufgrund der geringen Anzahl von CTCs eine Herausforderung, sondern auch weil die entarteten Zellen eine hohe phänotypische Varianz aufweisen. Gegenwärtig gibt es noch keinen universellen CTC-Marker, der alle Typen zirkulierender Tumorzellen zuverlässig anreichert [21]. Trotzdem unterscheiden sich entarteten Krebszellen durch physikalische und biologische Eigenschaften von normalen Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten).

1.4.1. Physikalische Eigenschaften

Zirkulierende Tumorzellen unterscheiden sich in Größe, Deformierbarkeit, Dielektrizität und Dichte von hämatopoetischen Zellen [8]. Diese physikalischen Unterschiede erlauben eine CTC-Anreicherung unabhängig von molekularen Markern.

1.4.1.1. Separationstechniken basierend auf Deformierbarkeit und Größe

Viele Systeme die auf physikalische Eigenschaften zurückgreifen differenzieren CTCs von normalen Blutzellen über die Deformierbarkeit und Größe. Solche Systeme basieren zumeist auf einer Art von Größenfilter, wie beispielsweise poröse Membranen oder speziell angeordneten Mikrostrukturen in einem Kanal (siehe Abbildung 1.3 (a)). Die Strukturen führen dazu, dass die größeren CTCs (20 - 30 μm [27]) zurückzuhalten oder abgelenkt werden und die restlichen Blutzellen passieren können.

Kommerzialisierte Systeme wie ScreenCell® (ScreenCell, Paris, Frankreich) oder ISET® (Rarecells, Paris, Frankreich) nutzen beispielsweise einen Filter, dessen 8 μm Poren zufällig auf dem Filter verteilt wurden. Die großen steiferen CTCs werden auf dem Filter zurückgehalten, während die kleineren deformierbaren hämatopoetischen Zellen durch die Poren hindurchfließen können. Die CTCs können daraufhin vom Filter entnommen und zytopathologisch analysiert werden [35, 36]. Die filterbasierte Aufreinigung hat jedoch verschiedene Nachteile, zum einen muss die Probe von geschultem Personal zytopathologisch analysiert werden, zum anderen können die Schritte nicht vollständig automatisiert werden.

Außerdem sind die Poren auf den Filtern zufällig verteilt, dies kann dazu führen, dass zwei Poren fusionieren und dadurch eine große Pore entsteht durch die CTCs verloren gehen können. Um dieses Problem der zufälligen Porenverteilung zu adressieren, wurden diverse mikrofluidische Chips mit Mikrostrukturen entwickelt, die eine kontrollierte Verteilung, Größe und Geometrie besitzen [27].

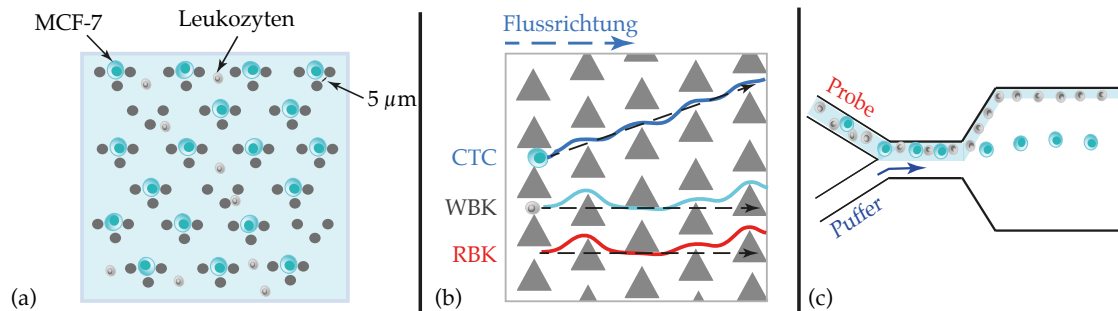


Abbildung 1.3.: Verschiedene Systeme zur größenbasierten Zellsélection. (a) Halbmondförmig angeordnete Mikrostrukturen fangen CTCs auf und lassen Leukozyten durch ihre Zwischenräume hindurchfließen [37] (b) Deterministische laterale Ablenkung (DLD), trennt unterschiedliche Populationen nach ihrer Größe auf. CTCs werden durch die Mikrostrukturen stärker abgelenkt als weiße Blutkörperchen (WBK) oder rote Blutkörperchen (RBK). Die CTCs werden zu einem Sammelfluss abgelenkt und können dann entnommen werden [38]. (c) Über zwei getrennte Einlässe wird die Probe und der Puffer in den Chip geführt. In der Verengung wird die Zellsuspension durch den Pufferstrom an die Kanalwand gedrückt und beim Austritt aus dem verengten Kanal werden die kleinen Leukozyten weiter abgelenkt als die großen CTCs [39].

Die Mikrostrukturen können beispielsweise unterschiedliche Geometrien besitzen und in verschiedenen Abständen positioniert werden. Ein mikrofluidisches System, das sich dreidimensionaler Filterstrukturen bedient, ist beispielsweise das von Loutharback *et al.* entwickelte „Deterministic lateral displacement array“ (Deterministische laterale Verschiebung, DLD). Das DLD basiert auf einer mikrofluidischen Zellsortierung durch laterale Ablenkung unterschiedlicher Zellpopulationen. Der Chip besteht aus einem Array, in dem dreieckige Mikrostrukturen für die Ablenkung der unterschiedlichen Zellpopulationen sorgen. Die großen CTCs werden während des Transports durch den Chip stärker von den Mikrostrukturen abgelenkt als die kleineren roten und weißen Blutkörperchen. Die CTCs werden in einen Sammelfluss abgelenkt und können daraufhin aus diesem Sammelfluss entnommen werden. Loutharback *et al.* konnte so 85 % der CTCs anreichern (siehe Abbildung 1.3 (b)) [38].

1.4 Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen

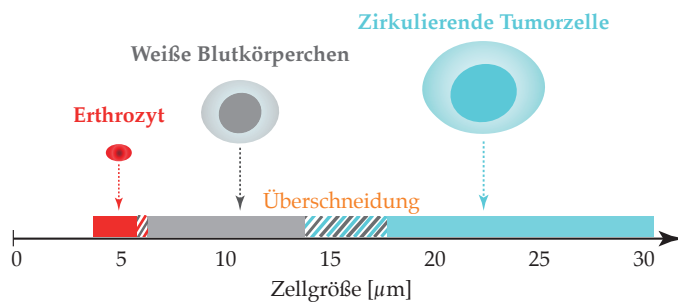


Abbildung 1.4.: Die Größe der zirkulierenden Tumorzellen überschneidet sich mit der Zellgröße der weißen Blutkörperchen.

Auch der mikrofluidische Chip von Tan *et al.* verwendet Mikrostrukturen zur größenbasierten Zellsortierung. Der Chip besteht aus 3 Sektionen, die erste Sektion besteht aus einem Filter, der dafür sorgt, dass der Chip nicht durch Zelltrümmer oder Agglomerate verstopft. Anschließend durchfließt die Probe Sektion 2 und 3, in denen sich halbmondförmige Strukturen befinden, die die großen CTCs auffangen und die kleinen hämatopoetischen Zellen hindurchfließen lassen.

Eine 5 mL Probe kann mit dieser Aufreinigungstechnik in zweieinhalb Stunden prozessiert werden und erreicht eine Fangrate und Reinheit von 80 % [41, 37]. Viele der größenbasierten mikrofluidischen Aufreinigungssysteme (Mohammed *et al.*, Chen *et al.* und Davis *et al.*) bedienen sich solcher Mikrostrukturen [42, 43, 44]. Solche mikrofluidischen Systeme sind mit erhöhtem Fertigungsaufwand verbunden, die Herstellungsdauer und -kosten sind daher entsprechend hoch.

Neben der Verwendung von Mikrostrukturen können unterschiedliche Zellpopulationen auch durch hydrodynamische-, trägheits- oder biomimetische Filtration voneinander getrennt werden [45].

Die hydrodynamische Filtration kommt

beispielsweise bei der von Yamada *et al.* vorgestellten „Pinched flow fraction“ (PFF)

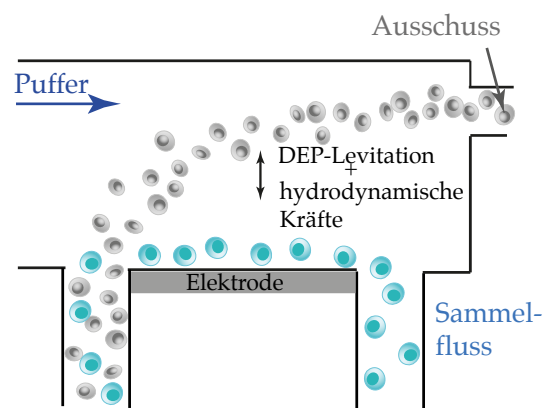


Abbildung 1.5.: Zellen können aufgrund ihrer Polarisierbarkeit durch Dielektrophoretische (DEP) Separation getrennt werden. Die Zellsuspension wird in den Chip geleitet und dort durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Die Leukozyten werden durch DEP-Levitation und hydrodynamische Auftriebskräfte vom Sedimentieren abgehalten. Die CTCs werden durch die Elektrode am Kanalboden auf den Boden gedrückt und können daraufhin aus dem Sammelfluss extrahiert werden [40].

zum Einsatz (12 (c)). Über zwei getrennte Einlässe werden die verdünnte Probe und ein Puffer in den Chip geführt. Im Chip befindet sich ein Kanal mit einer verengten Stelle, bei der die Zellsuspension in der Probe durch den Pufferstrom an die Kanalwand gedrückt wird. Die verengte Stelle endet in einem breitem Kanalsegment in dem die kleineren Zellen beim Austritt aus dem engen Kanalsegment weiter abgelenkt werden als die großen CTCs. Durch die unterschiedlich starke Ablenkung der Zellen können verschiedene Zellpopulationen aufgetrennt werden [39].

Viele der größenbasierten Systeme erreichen eine hohe Fangeffizienz mit über 80 %. Allerdings ist die größenbasierte Anreicherung nicht sehr zellspezifisch, da die Größe von sehr kleinen CTCs mit großen weißen Blutzellen überlappen kann (siehe Abbildung 1.4) [46]. Die Reinheit von physikalischen Aufreinigungssystemen beläuft sich häufig auf 10 % oder weniger. Ermittelt wird die Reinheit der Probe durch die Anzahl von Zielzellen (CTCs) dividiert durch die totale Anzahl der angereicherten Zellen mit Zellkern (CTCs+Leukozyten) [47]. Eine weitere Probenbehandlung vor der molekularen Analyse ist daher unabdingbar, denn Verunreinigungen der Probe durch Leukozyten oder rote Blutkörperchen kann die Analyse beeinträchtigen [48].

1.4.1.2. Dielektrophoretische Separationstechniken

Neben der Größe und Deformierbarkeit können auch Unterschiede in der Dielektrizität der Zellen verwendet werden, um sie von Blutzellen zu trennen. Es ist schon lange bekannt, dass die meisten Säugetierzellen unter physiologischen Bedingungen eine negativ geladene Zelloberfläche besitzen. Außerdem beinhalten die Zellen verschiedene polarisierbare Moleküle, wie Proteine, Peptide oder Nukleinsäuren. Daher haben die Zellen unterschiedliche dielektrische Eigenschaften [48].

Dielektrophoretische (DEP) Separationstechniken basieren auf der Polarisierbarkeit von Zellen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden Zellen polarisiert, diese induzierte Polarisation interagiert wiederum mit dem elektrischen Feld. Dadurch erfährt jede Zelle eine spezifische resultierende elektrische Kraft. Die resultierende Kraft ist abhängig von den dielektrischen Eigenschaften der Zelle (Größe und Polarisierbarkeit der Zelle), Frequenz und Stärke des elektrischen Feldes, sowie den elektrischen Eigenschaften des umgebenden Mediums. Durch

die spezifische resultierende Kraft auf die CTCs können diese von normalen Zellen getrennt werden [8].

Gupta und Davis *et al.* entwickelten unter Ausnutzung der Polarisierbarkeit der Zellen, das ApoStream™ System. Es war das erste kommerziell erhältliche Gerät bei dem unterschiedliche CTCs im kontinuierlichen Fluss durch DEP-Separation von Leukozyten getrennt wurden. ApoStream™ verwendet dabei die „dielectrophoretic field-flow fractionation“ (dielektrophoretische Feld-Fluss Fraktionierung (DEP-FFF)), die CTCs werden im Durchfluss durch einen Kanal von positiven DEP-Kräften zu der Elektrode auf den Boden des Kanals gedrückt, während die Leukozyten durch hydrodynamische Auftriebskräfte und DEP-Levitation von der Sedimentation zurückgehalten werden (siehe Abbildung 1.5). Die CTCs werden durch einen Auslass am Kanalboden extrahiert und die Leukozyten durch den Waschpuffer verworfen. Die Fangraten liegen bei diesem System bei über 70 %. Allerdings muss auch hier eine Dichtegradientenzentrifugation vor der eigentlichen Separation durchgeführt werden [40]. Die Dichtegradientenzentrifugation dauert circa eine Stunde und muss von geschultem Personal durchgeführt werden. Dadurch ist eine schnelle, automatisierte Analyse der Probe auch bei diesem Gerät nicht gegeben.

1.4.1.3. Dichtebasierte Separationstechniken

Zirkulierende Tumorzellen unterscheiden sich ebenfalls durch ihre Dichte von Blutzellen. CTCs haben mit einer Dichte von weniger als 1,077 g/mL eine geringere Dichte als Blutzellen mit mehr als 1,077 g/mL. Diesen Unterschied macht sich beispielsweise das Ficoll-Paque® (Pharmacia-Fine Chemicals, Uppsala Schweden) oder das neuere OncoQuick® System (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) zunutze.

OncoQuick® verwendet eine poröse Barriere in Kombination mit einem Separationsmedium. Durch Zentrifugation werden die CTCs und Blutzellen aufgrund der unterschiedlichen Dichte durch die Membran und das Medium voneinander getrennt (siehe Abbildung 1.6). Unter Verwendung von OncoQuick können 70-90 % der CTCs angereichert werden [49, 50]. Nachteil dieser Methode ist allerdings die schlechte Automatisierbarkeit und niedrige Sensitivität [51]. Mit einer Reinheit von unter 1 % wird die Methode meist nur als Vorbereitung auf weitere Aufreinigungsschritte verwendet [48].

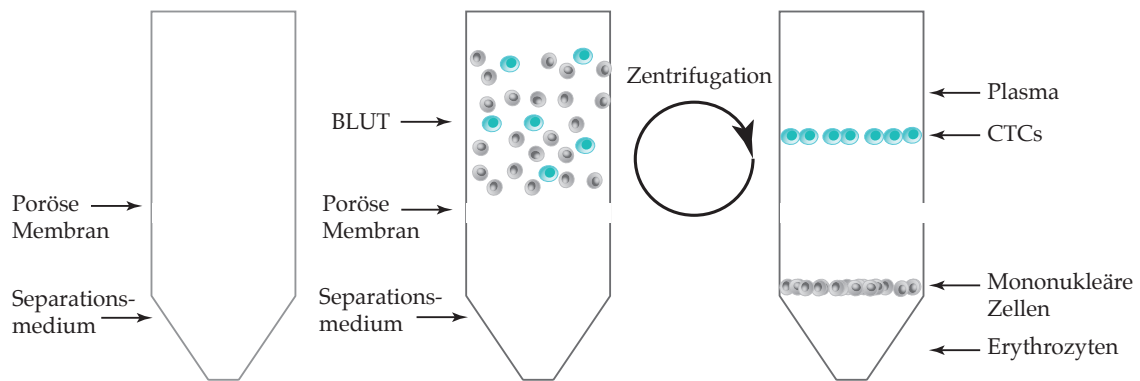


Abbildung 1.6.: Durch Verwendung einer porösen Membran und einem Separationsmedium kann durch Zentrifugation eine Aufreinigung der CTCs in einer Blutprobe realisiert werden. Die CTCs befinden sich nach der Zentrifugation in einer Schicht zwischen Plasma und dem Separationsmedium [49].

1.4.2. Biologische Eigenschaften

Neben den physikalischen Eigenschaften unterscheiden sich die Zellen auch auf molekularer Ebene von hämatopoetischen Zellen. Zirkulierende Tumorzellen exprimieren tumorassoziierte Antigene wie beispielsweise das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) und Mucin-1. Da normale Blutzellen diese Antigene nicht exprimieren, können die Antigene zur Differenzierung der Zellen von normalen Blutzellen verwendet werden [52]. Viele der in den letzten Jahren entwickelten automatisierten Anreicherungssystemen bedienen sich biologische Merkmale.

Die Trennung der CTCs von den hämatopoetischen Zellen kann durch zwei verschiedene antikörperbasierte Methoden erreicht werden. Zum einen kann eine „Positiv“-Anreicherung durchgeführt werden. Bei dieser Methode werden Antikörper eingesetzt, die gegen tumorassoziierte Antigene oder epitheliale Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Bei der zweiten Methode, der „Negativ“-Anreicherung oder auch Depletion, werden Antikörper verwendet, die gegen hämatopoetische Zellen gerichtet sind. Häufig wird der Leukozyten-spezifische CD45 (*cluster differentiation 45*) Antikörper verwendet, um die CD45 positiven Leukozyten von den CD45 negativen CTCs zu trennen (siehe Abbildung 1.2).

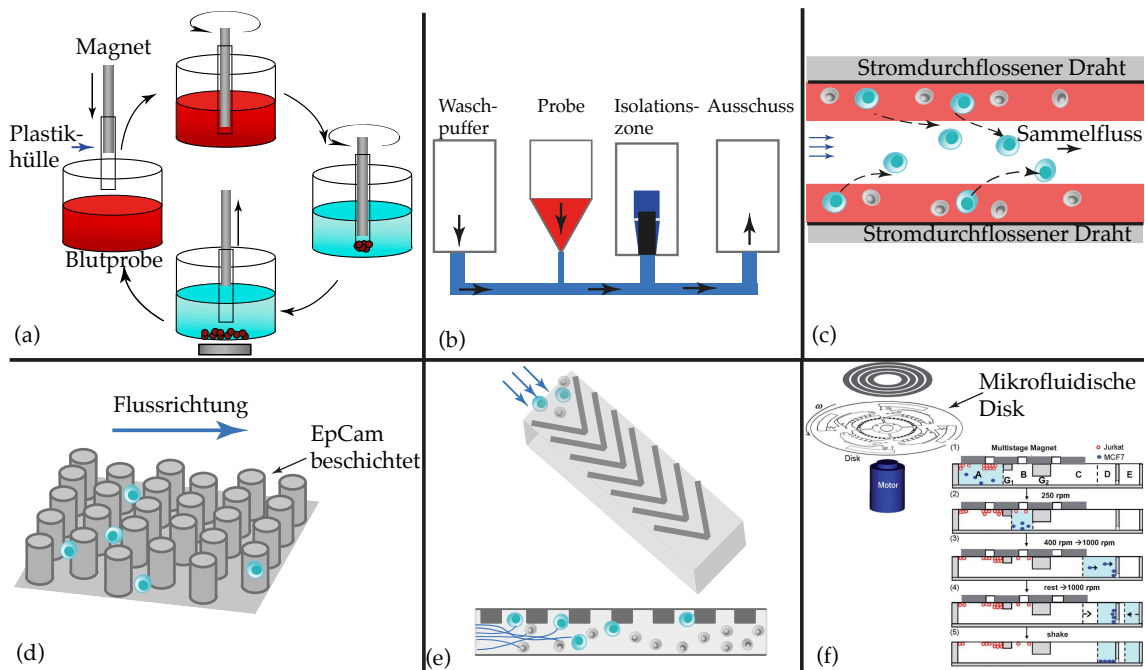


Abbildung 1.7.: Isolation basierend auf Antikörper-Antigen-Bindungen. (a) Die immunomagnetisch markierten CTCs werden durch einen rotierendem Magnetstab angezogen, der mit einer Plastikhülle ummantelt ist ([53]). (b) Magnetisch markierte Zellen werden durch einen Mikrokanal in verschiedene Kavitäten gepumpt, in der sie gewaschen und anschließend isoliert werden (modifiziert nach [54]). (c) Magnetisch markierte Zellen werden durch einen mikrofluidischen Kanal geführt. Seitlich am Kanal befinden sich zwei stromdurchflossene Drähte durch die ein magnetisches Feld erzeugt wird. Das magnetische Feld drückt die markierten Zellen in den zentralen Sammelfluss (modifiziert nach [55]). (d) Mikrosäulen in einem mikrofluidischen Kanal erhöhen die Wahrscheinlichkeit für Zell-Oberflächen Kontakte. Die CTCs haften über Antikörper-Antigen-Bindungen an der antikörperbeschichteten Chipoberfläche, während die Leukozyten weiterfließen. (e) Die passive Vermischung der Probe durch die Fischgrätenstruktur der Kanalwand begünstigt häufige Zellkontakte mit der antikörperbeschichteten Oberfläche (f) Mikrofluidische Disk die durch negative immunomagnetische Anreicherung und Zentrifugation CTCs isoliert. (Reproduziert von [56] mit Genehmigung der „Royal Society of Chemistry“)

1.4.2.1. Immunomagnetische Anreicherung

Die Positiv-Selektion ist die am häufigsten verwendete antikörperbasierte Anreicherung [57]. Auch das derzeit einzige von der FDA zugelassene System „Cell-Search“ basiert auf einer Positiv-Anreicherung. Durch Verwendung von anti-EpCAM funktionalisierten immunomagnetischen Partikeln werden CTCs beim „CellSearch“ System angereichert [58]. Ein weiteres immunomagnetisches Anreicherungssystem ist der von Talasaz et al. entwickelte „Magsweeper“. Bei dieser

Anreicherungsmethode werden die magnetisch markierten Zellen durch einen Magnetstab, der von einer ultradünnen nicht-adherente Plastikhülle ummantelt ist, angezogen. Dieser Magnetstab rotiert durch eine Kavität in einer 6-Well Zellkulturplatte und zieht dadurch die magnetisch markierten Zellen an (siehe Abbildung 1.7 (a)). Mit diesem System konnte in den Studien von Talasaz *et al.* jedoch nur eine Fangrate von ungefähr 60 % erreicht werden [59].

Auch die von Pluffe *et al.* entwickelte „Magnetophoretic Isolation“ verwendet immunomagnetische Partikel, hier wird eine Chipkammer zur Auftrennung der Zellen verwendet. Die Probe wird mit magnetischen Partikeln inkubiert und anschließend durch einen mikrofluidischen Kanal geführt. Seitlich am Kanal befinden sich zwei stromdurchflossene Drähte. Die Drähte erzeugen ein magnetisches Feld, dass die magnetisch markierten Zellen aus dem Probenstrom in einen kollinaren, zentralen Sammelfluss transportiert. Die unmarkierten Zellen werden von dem magnetischen Feld nicht beeinflusst und fließen im Probenstrom weiter (siehe Abbildung 1.7 (c)). Durch diese Art von Aufreinigung konnten 85 % der Zielzellen isoliert werden [55].

Auch das von FLUXION entwickelte IsoFlux System basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung und verwendet ebenfalls einen mikrofluidischen Chip. Die Blutprobe wird bei diesem System durch einen mikrofluidischen Kanal in verschiedene Kavitäten geleitet (siehe Abbildung 1.7 (b)). Dort fließt die Probe langsamer, in der Isolationskavität wird ein magnetisches Feld angelegt und die magnetisch markierten Zellen werden angezogen. Die restliche Blutprobe fließt weiter und wird verworfen. Beim Fluxion System muss die Probe jedoch durch Dichtegradientenzentrifugation extern vorbereitet werden, ein voll automatisierter Ablauf ist daher nicht möglich [54].

Neben Systemen mit einer Positiv-Anreicherung wurden auch Systeme basierend auf einer Negativ-Anreicherung entwickelt. Einen Ansatz basierend auf einer Negativ-Anreicherung liefert Chen *et al.*. Zur separation kommt hier ein runder mikrofluidischer Chip (Disk) zum Einsatz. Indem die Zellen durch negative immunomagnetische Separation, in Kombination mit einem mehrstufigen magnetischen Gradienten über die Disk und durch Rotation voneinander getrennt werden (siehe Abbildung 1.7 (f)). Chen *et al.* konnte dadurch eine Fangrate von 60 % erreichen [56, 60]. Die Negativ-Anreicherung wird zumeist in zwei Schritten durchgeführt. Bevor die Leukozytendepletion durchgeführt werden kann,

werden die roten Blutkörperchen durch Lyse oder Dichtegradientenzentrifugation entfernt [61, 62, 63, 64]. Durch eine Negativ-Anreicherung können zumeist hohe Fangeffizienzen erreicht werden, der Beifang an nicht gewünschten Leukozyten ist allerdings ebenfalls sehr hoch. Außerdem ist die Depletion der roten Blutkörperchen schlecht zu automatisieren.

Mit einer Positiv-Anreicherung kann eine höhere Reinheit erreicht werden, da die Zellen spezifisch angereichert werden. Der Nachteil der Positiv-Anreicherung ist, dass mache der zirkulierenden Tumorzellen, wie zuvor schon erwähnt, eine EMT durchlaufen haben. Dadurch verlieren sie den epithelialen Phänotyp einer Zelle. Die Expression epithelialer Antigene wie beispielsweise EpCAM wird während der EMT herunter reguliert. Es ist daher nicht auszuschließen, dass solche CTCs durch antikörperbasierte Systeme welche nur einen Marker verwenden nicht angereichert werden können [65]. Diesem Problem kann man entgegen wirken, indem eine Zusammenstellung aus mehreren Antikörpern zur Anreicherung verwendet wird. Somit kann ein breites Spektrum an unterschiedlichen CTCs angereichert werden.

1.4.2.2. Adhäsionsbasierte Anreicherung

Neben der Immobilisierung von Antikörpern auf immunomagnetischen Partikeln können Antikörper auch auf Oberflächen von Mikrostrukturen in mikrofluidischen Kanälen oder Kathetern (GILUPI CellCollector®) immobilisiert werden. Im Unterschied zu der immunomagnetischen Aufreinigung muss die Probe bei der adhäsionsbasierten Anreicherung nicht zuvor inkubiert werden. Die Isolation der Zellen kann entweder statisch oder im kontinuierlichen Fluss durchgeführt werden. Bei der statischen Anreicherung wird die Probe auf die Oberfläche mit den immobilisierten Antikörpern gegeben und inkubiert. Nach einer Inkubationszeit werden der Überstand und die nicht gebundenen Zellen verworfen. Die gebundenen Zellen verbleiben auf der Oberfläche. Die Isolation im kontinuierlichen Fluss ist allerdings die effektivere und häufiger verwendete Methode um CTCs zu isolieren [66, 67]. Die Sensitivität und Selektivität adhäsionsbasierter Systeme kann durch die Verwendung eines kontinuierlichen Flusses über eine Oberfläche mit immobilisierten Antikörpern erhöht werden [27]. Durch Mikrostrukturen wie beispielsweise eine Fischgrätenstruktur auf der Oberseite des Kanals kann die Kollisionsrate der durchfließenden Zellen mit der antikörperbeschichteten

Oberfläche nochmals erhöht werden. Die Fischgrätenstruktur führt dazu, dass der laminare Probenstrom passiv vermischt wird (siehe Abbildung 1.7 (e)). Stott *et al.* konnte so in Kombination mit einer anti-EpCAM beschichteten Oberfläche eine Fangrate von bis zu circa 92 % erreichen [68]. Die Kollision der Zellen mit der Chipoberfläche kann ebenfalls durch die Erweiterung der Oberfläche mit dreidimensionalen Strukturen wie beispielsweise Mikrosäulen erhöht werden. Erstmals wurden solche Strukturen beim „CTC-Chip“ vorgestellt. Der „CTC-Chip“ besteht aus einem Mikorkanal mit 78.000 anti-EpCAM beschichteten Mikrosäulen (siehe Abbildung 1.7 (d)). Unter Verwendung dieses Chipdesigns konnte eine Fangrate von circa 60 % erreicht werden [28, 69]. Ähnliche Ansätze wurden auch bei dem „GEDµ device“ und den kommerzialisierten Chips „OnQChip™“ (On-Q-ity, MA, USA) und „CEE™“ Chip (Biocept Laboratories, CA, USA) gewählt, hier wurden jedoch Anordnung und Größe der Mikrosäulen verändert. Der OnQChip™ kann beispielsweise durch einen abnehmenden Säulendurchmesser und Säulenabstand in Fließrichtung die Zellen nach Größe auftrennen und sie über biologische Marker immobilisieren. Durch die Kombination von physikalischer und biologischer Selektion konnte eine Fangrate von ca. 94-97 % erreicht werden [27]. Die immobilisierten Zellen müssen nach der Aufreinigung aus dem Chip gelöst werden, dies kann wie beispielsweise bei der „High Throughput Microsampling Unit“ (HTMSU) von Adams *et al.* mit Trypsin geschehen [70]. Das Ablösen der Zellen durch Trypsin kann jedoch, wenn die Zellen zu lange der Substanz ausgesetzt sind, Schäden an den Zellen hervorrufen.

Auch der „CTC-iChip“ nutzt physikalische und biologische Merkmale der CTCs zur Separation. Beim „CTC-iChip“ werden zuerst durch deterministische seitliche Verschiebung die CTCs und immunomagnetisch markierten Leukozyten von roten Blutkörperchen im Fluss getrennt. Daraufhin werden die Leukozyten und die CTCs durch Trägheitsfokussierung hintereinander aufgereiht, damit die immunomagnetischen Leukozyten anschließend durch ein magnetisches Feld von den CTCs getrennt werden können. Durch die Kombination mehrerer Anreicherungsmethoden konnte somit eine Fangrate von circa 97,2 % erreicht werden. Die komplette Prozessierung einer 8 mL Probe liegt (mit Einstellung des Gerätes) bei 2 Stunden. Nachteilig ist allerdings, dass die Fertigungszeit eines „CTC-iChips“ mit zwei bis fünf Tagen viel Zeit in Anspruch nimmt [71]. Der hohe Fertigungsaufwand der Chips ist ein genereller Nachteil der adhäsionsbasierten Systeme, denn die Mikrostrukturen im Kanal erfordern eine hohe Fertigungspräzision.

1.5. Detektion der CTCs

Nach der Anreicherung mit den vorstehend beschriebenen Methoden wird die Zellprobe analysiert beziehungsweise quantifiziert. Auch hierfür stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei grundsätzlich zwischen zytometrischen und nukleinsäurebasierten Techniken zu unterscheiden ist. Im Folgenden werden exemplarisch zwei Methoden beschrieben.

1.5.1. PCR basierte Detektion

Entartete Tumorzellen unterscheiden sich genotypisch und auf Expressionsebene von hämatopoetischen Zellen. Folglich kann auf nukleinsäurebasierende Tests zurückgegriffen werden, um CTCs zu detektieren. Unter Verwendung von spezifischen Primern, die in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt werden um die Amplifikation von CTC-spezifischen Genen zu ermöglichen, können CTCs detektiert werden. Beispielsweise codieren diese Gene gewebe-, organ- oder tumorspezifische Proteine [72]. Der als Diagnosetest zugelassene „Adna-Test“ von AdnaGen bedient sich beispielsweise einer Multiplex-PCR, um die durch magnetische Partikel angereicherten Zellen zu analysieren. Dabei wird die mRNA (messenger RNA) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Die Multiplex-PCR ermöglicht dann die Detektion von tumorassoziierten Transkripten [73]. Allerdings kann durch eine PCR nur eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Probe für ein oder mehrere Marker positiv waren. Eine genaue Zählung der CTCs ist auf diesem Weg nicht möglich [27].

1.5.2. Durchflusszytometrie

Eine Zellzählung kann hingegen über immunhistochemische Färbung erreicht werden. Bei dieser Methode werden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert.

Die Zählung der Zellen erfolgt daraufhin über Bildzytometrie (Image Cytometry), Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie [74].

Die Durchflusszytometrie ist im biomedizinischen Feld eine etablierte Technik um Zellen im Durchfluss zu zählen und zu charakterisieren. Der große Vorteil dieser

Methode ist, dass eine hohe Anzahl von Zellen in kurzer Zeit analysiert werden kann. Die Zellen werden in einer Messzelle durch einen Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert (siehe Abbildung 1.8).

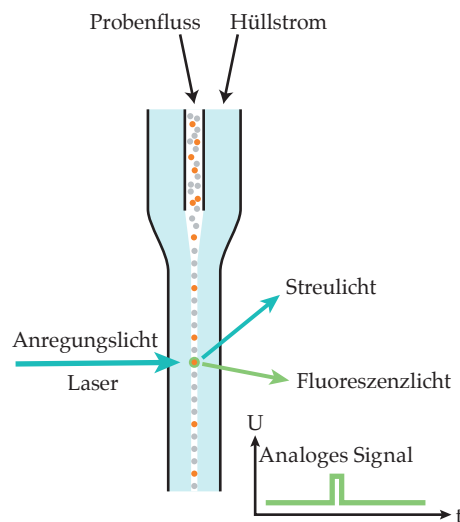


Abbildung 1.8.: Messkapillare eines Durchflusszytometers in der die Probe hydrodynamisch durch den Hüllstrom fokussiert wird. Die Zellen werden dann in der Detektionszone vereinzelt detektiert indem das Streulicht und das Fluoreszenzlicht gemessen wird. Modifiziert nach [75]

Dadurch wird garantiert, dass sich zur Zeit der Detektion nur eine Zelle in der Detektionszone befindet. Auf die Detektionszone ist punktgenau ein Laser ausgerichtet, der die fluoreszenzmarkierten Zellen anregt. Das entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht wird von Detektoren aufgenommen [76]. Ein Nachteil der konventionellen Durchflusszytometrie ist, dass das Gerät sehr anfällig gegenüber unpräziser Ausrichtung der Detektionskomponenten ist [77].

Seit 2008 existiert eine neue Methode, die mit dem Ziel entwickelt wurde, eine günstigere, robustere und kleinere Alternative zu einem Durchflusszytometer zu schaffen. Das System basiert auf dem Prinzip der räumlich modulierten Fluoreszenzmission, welche erstmals 2008 von Kiesel *et al.* präsentiert wurde [78]. Herzstück der Methode ist eine optische Schlitzmaske, die zwischen Detektionskanal und Detektor liegt und dafür sorgt, dass das Signal einer fluoreszierenden Zelle beim Passieren der Detektionszone zeitlich moduliert wird (siehe

Abbildung 1.9). Das entstandene Signal beinhaltet Informationen über die Geschwindigkeit (Ausdehnung des Signals) und die Fluoreszenzintensität (Amplitude des Signals) der Zelle. Durch Verwendung dieser Technik und der Ausnutzung des Segré-Silberberg-Effekts erhält man eine Methode, mit der man unterschiedlich große Zellen voneinander differenzieren kann. Denn der Segré-Silberberg-Effekt beschreibt die laterale Migration von Zellen oder Partikeln unter bestimmten Flussbedingungen in einem parabolischen Flussprofil. Zellen oder Partikel, die beim Eintritt in einen Kanal über das parabolische Flussprofil gleich verteilt sind, werden durch die Auftriebskraft und die Trägheitskraft beim Durchfließen des Kanals lateral abgelenkt (siehe Abbildung 1.10 z-Richtung).

Die Auftriebskraft drückt die Zellen aus der Kanalmitte, in der hohe Fließgeschwindigkeiten herrschen, zu den Kanalwänden mit niedrigeren Fließgeschwindigkeiten, während die Trägheitskraft die Zellen von der Kanalwand in die Kanalmitte drückt. Wenn diese Kräfte gleich stark sind, befindet sich die Zelle in ihrer individuellen Gleichgewichtsposition, welche mit einer entsprechenden Gleichgewichtsgeschwindigkeit assoziiert ist [79, 80, 81, 82]. Da unterschiedlich große Zellen sich an verschiedenen Gleichgewichtspositionen anordnen, besitzen sie auch unterschiedliche Geschwindigkeiten, über die die Zellen dann differenziert werden können [83].

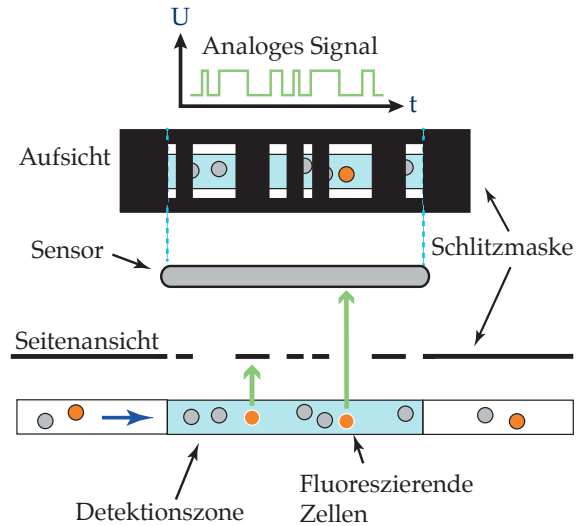


Abbildung 1.9.: Bei der räumlich modulierten Fluoreszenzemission wird das Fluoreszenzsignal der Zellen durch die Schlitzmaske moduliert, dadurch kann mehr als eine Zelle gleichzeitig detektiert werden. Abbildung modifiziert nach [75]

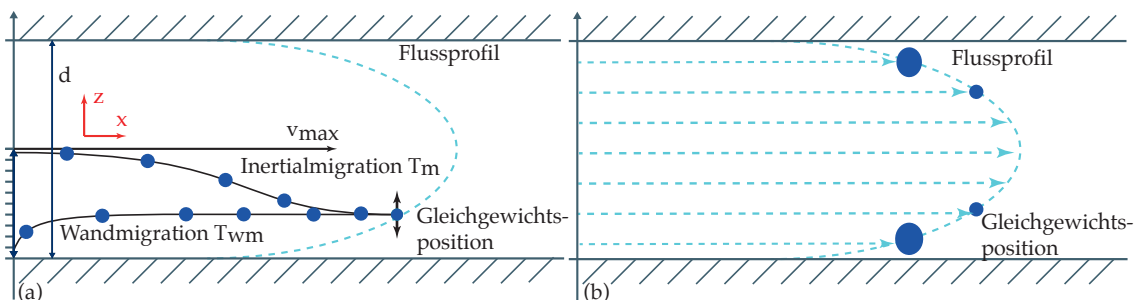


Abbildung 1.10.: Querschnitt eines mikrofluidischen Kanals mit einem parabolischen Flussprofil. (a) Zwei konkurrierende Kräfte wirken auf die suspendierten Zellen ein. Die Auftriebskraft bewirkt eine Inertialmigration und drückt die Zelle zur Wand (negative z-Richtung in der unteren Kanalhälfte), die Trägheitskraft löst eine Wandmigration in z-Richtung aus und drückt die Zelle in die Kanalmitte (positive z-Richtung in der unteren Kanalhälfte). (b) Gleichgewichtsposition unterschiedlich großer Zellen. Abbildungen modifiziert nach [84].

Ein Vorteil der Methode ist, dass die Detektionszone mit der Schlitzmaske im Gegensatz zu einer Detektionszone in einem konventionellen Durchflusszytometer viel größer ist. Dies führt dazu, dass das Gerät robuster gegenüber Fehlern in der

Laserausrichtung ist. Außerdem kann durch das modulierte Signal einer Zelle bestimmt werden, ob sich zum Zeitpunkt der Detektion mehr als eine Zelle in der Detektionszone war [85]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Elimination einer Kreuzkontamination von Patientenproben durch Verwendung von Einweg-Mikrofluidik-Chips gegenüber einer Mehrwegküvette aus Glas oder Quarz, die gespült werden muss bei konventionellen Durchflusszytometern.

1.6. Fluoreszenzmarkierung von CTCs

Um die zirkulierenden Tumorzellen im Durchflusszytometer detektieren zu können, müssen diese nach der Anreicherung immunohistochemisch (ICC) markiert werden. Auch hier stellt die Heterogenität der Zellen eine Herausforderung dar, da die Zellen spezifisch angefärbt werden müssen, um falsch positive Ereignisse zu vermeiden. Wie zuvor schon geschildert, besitzen zirkulierende Tumorzellen spezifische Oberflächenantigene, die zur Differenzierung von CTCs und Leukozyten verwendet werden können. Diese finden auch bei der ICC-Färbung Verwendung. CTCs werden häufig als EpCAM, Muc1, Cytokeratin-8 -18 oder -19 positiv und als CD45-negativ beschrieben [51].

Die Oberflächenmarkierung ist eine schonende Art Zellen zu markieren. Die spezifischen Oberflächenantikörper wie beispielsweise EpCAM oder Muc1 werden dafür mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und können über Antikörper-Antigen-Bindung an die Zielzellen binden. Als Farbstoff können Proteine, organische oder anorganische Fluorophore eingesetzt werden. Häufig werden organische Fluorophore zur Markierung von Zellen verwendet wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Fluorescein-Derivate oder neuere Fluorophore wie Alexa.

Neben den organischen Fluorophoren sind in den letzten Jahren neue anorganische Fluorophore entwickelt worden, die immer häufiger in der Zelldetektion Anwendung finden. Die sogenannten Quantum Dots (QDs) sind Halbleiternanokristalle die beispielsweise aus Cadmiumselenid (CdSe), Cadmiumtellurid (CdTe), Cadmiumsulfid (CdS) oder Zinksulfid (ZnS) bestehen [86]. Quantum Dots können in einer Größe von 1-10 nm hergestellt werden. Die spektralen Eigenschaften können über die Größe und chemische Zusammensetzung der QDs bestimmt werden (siehe Abbildung 1.11).

Mit zunehmender Größe der Quantum Dots wird längerwelliges Licht emittiert. Außerdem besitzen die QDs ein breites Absorptionsspektrum, d.h. sie können mit jeder Wellenlänge unterhalb ihres Emissionsspektrums angeregt werden. Neben dem Vorteil der flexiblen Anregung der Nanokristalle besitzen sie weitere positive Eigenschaften wie beispielsweise eine höhere Fotostabilität, Quantenausbeute und Fluoreszenzintensität im Vergleich zu organischen Farbstoffen im gleichen Wellenlängenbereich [87, 89, 90]. Über Oberflächenbeschichtungen können QDs mit Antikörpern funktionalisiert werden, welche dann spezifisch an das Antigen binden können.

Neben der Oberflächenfärbung kann auch eine intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung durchgeführt werden. Beim „CellSearch“ System werden die Zellen beispielsweise durch den Einsatz des organischen Fluorophors DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindo) angefärbt. Dieser Farbstoff färbt die DNA im Zellkern an um Zellkernlose Zellen von CTCs unterscheiden zu können. Der Farbstoff bindet jedoch unspezifisch an die DNA und RNA und durch die mutagenen und toxischen Eigenschaften des Farbstoffes wird die Zelle zusätzlich geschädigt. Damit die CTCs spezifisch angefärbt werden, verwendet „CellSearch“ zudem die intrazellulären Tumormarker Cytokeratin-8 -18 oder -19 [91].

1.6.1. Realisierung der automatisierten Anreicherung, Markierung und Detektion im Rahmen des CTC-Projektes

Aufgrund der hohen prognostischen Relevanz, die zirkulierenden Tumorzellen bei der Krebsprogression zugeschrieben wird, hat die Anreicherung, Detektion und Isolierung solcher Zellen in der Forschung einen hohen Stellenwert [29]. Durch

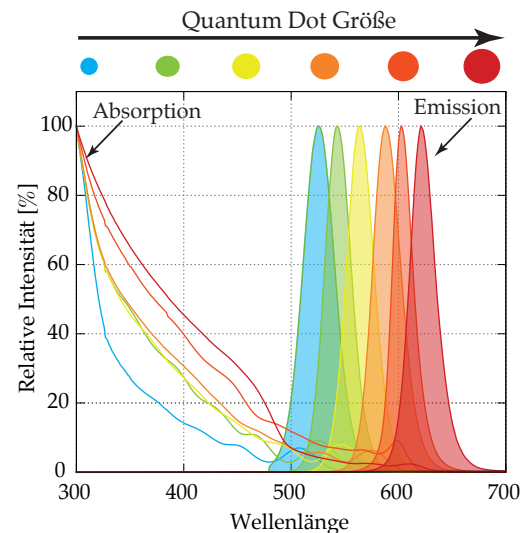


Abbildung 1.11.: Die spektralen Eigenschaften von Quantum Dots werden über ihre Größe und Zusammensetzung bestimmt. QDs können durch jede Wellenlänge unterhalb ihres Emissionsspektrums angeregt werden [87]. Die Daten zum Erzeugen der Grafik wurden dem „Fluorescence SpectraViewer“ von Thermofisher entnommen [88]

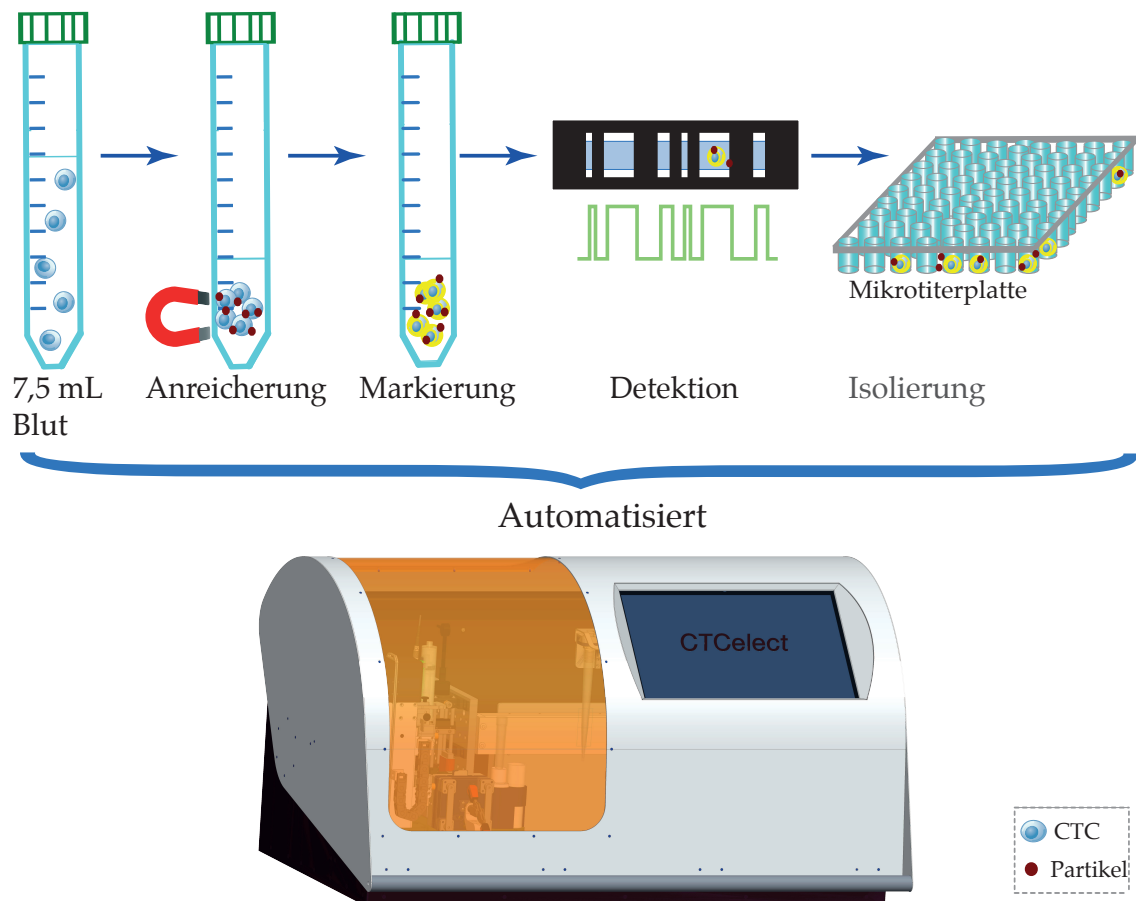


Abbildung 1.12.: Ablauf der automatisierten immunmagnetischen Anreicherung, Markierung, Detektion und Isolierung.

die Möglichkeit der Flüssigbiopsie bei Patienten mit Krebs eröffnen sich viele neue Perspektiven in der Diagnostik, Therapie und Tumorforschung. Derzeit werden die Therapieansätze noch nach der histochemischen und molekularen Analyse von Biopsieproben des Primärtumors ausgewählt. Die Tumorbiopsie hat jedoch einige Nachteile wie z.B. der invasive Eingriff am Patienten zur konventionellen Biopsie des Gewebes. Ferner stellt die Probe nur den Zustand des Tumors zum Zeitpunkt der Biopsie dar [17]. Durch die intratumorale und intermetastatische Heterogenität kann durch eine Tumorbiopsie nur begrenzt Aussagen über die optimale Therapie getroffen werden [92].

Durch die Verwendung von zirkulierenden Tumorzellen und Einsatz der Flüssigbiopsie entfällt der hoch-invasive Eingriff beim Patienten. Die Flüssigbiopsie kann regelmäßig wiederholt werden und die Zellanalyse ist nicht auf den Primärtumor beschränkt. Folglich kann der „Echtzeitstatus“ des Patienten ermittelt werden,

welcher zur Optimierung der Therapie beiträgt [93].

Um die im CTC-Projekt festgelegten Ziele zu erreichen, wurde wie zuvor schon erwähnt eruiert welche Anreicherungsmethode für die Automatisierung in Frage kommt. Die Anreicherung basierend auf den physikalischen Eigenschaften einer Zelle wurde für diese Arbeit ausgeschlossen, da die physikalischen Eigenschaften von CTCs stark variieren. Auch die Verwendung von mikrofluidischen Chips mit Mikrostrukturen wurden nicht in Betracht gezogen, da die Herstellung solcher Chips kostenintensiv ist. Die Verwendung von immunomagnetischen Partikeln ist hingegen eine flexible und im Vergleich zu einer Chipherstellung kostengünstige Variante der CTC-Anreicherung.

Um die zuvor beschriebenen Anforderungen zu erfüllen, musste zuerst eruiert werden, welche Anreicherungsmethode ohne hohen Zell- und Vitalitätsverlust die Zellen anreichert. Dafür wurden drei technische Lösungen entwickelt (siehe Kapitel 2.2.7), die alle auf einer immunomagnetischen Anreicherung basieren. Die technischen Lösungsansätze wurden zuerst auf den Vitalitätsverlust der Zellen überprüft. Das System mit dem geringstem Zellverlust wurde für die Automatisierung ausgewählt. Parallel dazu wurden verschiedene magnetische Partikel funktionalisiert und bezüglich der Fangraten im Standardversuch evaluiert. Die Partikel mit der höchsten Fangrate wurden weiter optimiert und im halb-automatisierten und anschließend im voll-automatisierten System getestet.

In dieser Arbeit wurde daher ein Pipettierroboter entwickelt, der funktionalisierte immunomagnetische Partikel und eine 7,5 mL Blutprobe durch wiederholtes aspirieren und dispensieren schonend durchmischt. Die Separation beruht auf einer Positiv-Anreicherung (siehe Abbildung 1.2), durch die die CTCs mit magnetischen Partikeln markiert werden und durch Anlegen eines magnetischen Feldes von den restlichen Blutzellen getrennt werden können. Die normalen hämatopoetischen Zellen können daraufhin verworfen und die CTCs durch verschiedene Waschschriffe weiter gereinigt werden. Im Anschluss an die Aufreinigung, werden die Zellen automatisiert mit QDs fluoreszenzmarkiert, um sie dann in einem mikrofluidischen Detektionschip überführen zu können. In der Detektionseinheit können die Zellen durch die räumlich modulierte Fluoreszenzemission detektiert und daraufhin vereinzelt in einer Mikrotiterplatte abgelegt werden (siehe Abbildung 1.9 und Abbildung 1.12). Die Realisierung der Isolation war jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

Die Anreicherungsmethode musste mit der bestehenden Detektionseinheit kompatibel sein, da diese parallel im CTC-Projekt entwickelt wurde. Für die Fluoreszenzmarkierung der Zellen wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe getestet, die mit dem in der Detektionseinheit verbauten Laser mit 445 nm Wellenlänge kompatibel waren. Der Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellen am intensivsten fluoreszenzmarkieren konnte, wurde weiter verwendet. Das Protokoll für die Fluoreszenzmarkierung konnte daraufhin optimiert und an die automatisierte Anreicherungseinheit angepasst werden.

Da die verwendeten Wasch- und Färbepuffer ebenfalls noch an das System angepasst werden mussten, wurden auch hier verschiedene Puffer getestet um eine möglichst hohe Fangrate erreichen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

2.1.1. Zelllinien

Tabelle 2.1.: Zelllinie

Zelllinie	Typ	Ursprungsgewebe
MCF-7	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss

2.1.2. Blutproben

Für die verschiedenen Testreihen wurde peripher-venöses Blut von freiwilligen Spendern ohne bekannte Tumorerkrankung entnommen.

Tabelle 2.2.: Blutproben

Blut	Herkunft	Lagerung
500 mL Vollblut	Deutsches Rotes Kreuz	2-4 °C max. 1 Woche
EDTA Eigenblut	Entnahme durch Berufsärztlichen Dienst Mainz	RT im Überkopfmischer max. 1 Tag

2.1.3. Bioreagenzien und Chemikalien

Die verwendeten Bioreagenzien und Chemikalien wurden alle nach Herstellervorgaben gelagert und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.3.: Bioreagenzien und Chemikalien

Bioreagenzie/Chemikalie	Hersteller
Accutase	Capricorn Scientific, Deutschland
Atto 465	Atto-Tec, Deutschland
Biotin	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Carboxyl-Adembeads coupling Kit	Ademtech, Frankreich
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Life Technologies, Deutschland
CASYton	Roche, Deutschland
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Capricorn Scientific, Deutschland
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, USA
Inulin (Human)	Merk Millipore, Deutschland
Isotypkontrolle Maus IgG1 Biotin	ebioscience, USA
Kohlenstoffdioxid Monoklonaler Maus anti-Human Mucl	Linde, Deutschland
MEM (Minimum Essenzielles Medium) nicht essentielle Aminosäuren	Capricorn Scientific, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-Human EpCAM (Klon: Ber-EP4, Bestellnummer: M080429-2)	Dako, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-Human EpCAM Biotin (Klon: 1B7, Bestellnummer: 13-9326)	ebioscience, USA

2.1 Material

Bioreagenzie/Chemikalie	Hersteller
Monoklonaler Maus anti-Human Muc1 (Klon: S1D12D7, Bestellnummer: MA1-35690)	Thermo Scientific, Deutschland
Monoklonaler Maus anti-Human Muc1 (Biotin) antibody (No. ABIN865557)	Antibodies-online, Deutschland
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS, <i>Phosphat buffered saline</i>)	Capricorn Scientific, Deutschland
PD MidiTrap G-25	GE Healthcare, Schweden
Quantum dots (QDs) Streptavidin 625 (Bestellnummer: A10196)	Invitrogen, Deutschland
Reinstwasser	Haus-interne Anlage
RPMI-Medium RPMI	Capricorn Scientific, Deutschland
Silicon-Antischaumemulsion	Carl Roth, Deutschland
Trypsin/EDTA 10x	Sigma-Aldrich, USA
Xanthan	ADM, Niederlande

2.1.4. Magnetische Partikel

Tabelle 2.4.: Magnetische Partikel

Magnetische Partikel	Bestellnummer	Hersteller
Dynabeads® 4,5 µm Ziege anti Maus	1033	Invitrogen, Deutschland
Dynabeads®1 µm MyOne Streptavidin T1	65602	Invitrogen, Deutschland
500 nm Carboxyl Adembeads	02820	Ademtech, Frankreich
SpeedBeads Carboxylated	45152105050250	GE Healthcare Life Sciences, Deutschland
4,5 µm Adnagen Breast Cancer Beads	T-1-508	Adnagen AG, Deutschland

2.1.5. Geräte

Tabelle 2.5.: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	AB104	Mettler Toledo, Deutschland
Analysewaage	LP1200S	Sartorius AG, Deutschland
Autoklav	55À 195 L	Laboklav
CO ₂ -Zellinkubator	Heracell 150i	Thermo Scientific, Deutschland
Durchflusszytometer	BD Accuri C6	BD, Deutschland
Einfriergerät	Mr.Frosty	Thermo Scientific, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus xc60	Olympus, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus CKX41	Olympus, Deutschland

2.1 Material

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Magnetrührer	MR 3003	Heidolph, Deutschland
Magnetischer Zellseparator	MPC-S	Thermo Scientific, Deutschland
Magnetischer Zellseparator	Adna Mag-L	AdnaGen, Deutschland
Spritzenpumpe	neMESYS	Cetoni, Deutschland
Spritzenpumpe	78971213	KdScientific
Spannungsquelle	Typ 2225	Statron, Deutschland
Stickstoff-Gefrierbehälter	Locator JR Plus	Thermo Scientific, Deutschland
Tischzentrifuge	Micromax RF	Thermo Scientific, Deutschland
Tischzentrifuge	Multifuge 3s	Heraeus, Deutschland
Überkopfmischer	Intelli Mixer	ELMI, Lettland
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin, Deutschland
Vortexer	TopMix FP15024	Fisher-Scientific, Deutschland
Wasserbad	WNB7	Memmert, Deutschland
Zählkammer	improved Neubauer	Paul Marienfeld GmbH, Deutschland
Zellkulturbank	Safe 2020	Thermo scientific, Deutschland
Zellzähler	Casy Counter	Schärfe System GmbH

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.6.: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläschen	Roth, Deutschland
Kanüle, Neolus	Terumo, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt, Deutschland
Blutsammelgefäß S Monovette	Sarstedt, Deutschland
Petrischale Cellstar	Sigma-Aldrich, USA
Pipettenspitzen 10 mL	Eppendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 mL	Sarstedt, Deutschland
Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Device	Thermo Scientific, Deutschland
Zellkulturflasche	Sarstedt, Deutschland

2.1.7. Verbaute Materialien

Tabelle 2.7.: Verbaute Materialien

Material	Hersteller
Dreiwege Ventil (Stopcocks 3-way)	Cole-Parmer
HPLC-Anschluss	IDEX
Magnet-Trapezoid TR 1.5x25x10x11.75Ni-N4	HKCM Engineering e.k.
Schlauchverbinder	IDEX
Schlauchpumpe SR10/30	THOMAS
Spritzenpumpe	Fraunhofer ICT-IMM
XDrive 55-1 Motor	MotoraXX Elektrogeräte GmbH

2.1.8. Verwendete Software

Tabelle 2.8.: Verwendete Software

Software	Hersteller
Accuri c6 Analyse	BD
Diadem 12	National Instruments
Excel 2010	Microsoft
Gnuplot 4.6	Thomas Williams & Colin Kelley
Labview12	National Instruments
Python(x,y) 2.7	Python Software Foundation

2.1.9. Puffer, Lösungen und Medien

Die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung sind im nachfolgenden aufgeführt. Puffer die Bestandteile von kommerziell erhältlichen Kits waren, wurden in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

Tabelle 2.9.: Angesetzte Puffer

1xPBS	9,55 g	PBS - 1150,0 mg/L Dinatrium- hydrogenphosphat - 200,00 mg/L Kaliumchlorid - 200,00 mg/L Kaliumphosphat - 8000,00 mg/L Natriumchlorid
	1 L	destilliertes Wasser
1xPBS/0,1 %BSA	100 mL 0,1 g	1xPBS BSA

0,2 M Natriumbikarbonat-Puffer	100 mL 1,68 g	destilliertes Wasser Natriumbikarbonat mit Natriumhydroxid auf pH 9 einstellen
Markierungspuffer	19 mL 1 mL	1xPBS 0,2 M Natriumbikarbonat- Puffer auf pH 8,3 einstellen
Atto 465 NHS-Ester Lösung	1 mg 200 µL	Atto 465 NHS-Ester DMSO
6%BSA Lösung	3 g 50 mL	BSA PBS
CFSE Lösung	18 µL 50 µg	DMSO CFSE
Trypsin/EDTA	1 mL 9 mL	Trypsin/EDTA PBS
EDTA/FCS-Waschpuffer	38 mL 10 mL 2 mL	PBS FCS 0,05 M EDTA
0,125% Xanthan PBS Lösung	125 mg 99,875 g	Xanthan PBS-Lösung
Färbepuffer	90 µL 10 µL	6%BSA Lösung Antischaum

Tabelle 2.10.: Zellkulturmedium

RPMI-Medium pro 100 mL	90 mL	RPMI 1640 mit L-Glutamin
	10 mL	FCS
	1 mL	MEM Noness. Aminosäuren
	1 mL	Natriumpyruvat
	500 µL	Human Insulin
Einfriermedium pro mL	100 µL	DMSO
	200 µL	FCS
	700 µL	RPMI 1640 mit L-Glutamin

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Dabei wurde auf die Anwendung von sterilen Arbeitstechniken geachtet, um die Zellkulturen nicht zu kontaminieren. Für die Arbeit unter der Sterilwerkbank kam ausschließlich sterilisiertes Zellkulturmaterial zum Einsatz, das entweder vom Hersteller steril geliefert oder vor Gebrauch mittels Autoklaven sterilisiert wurden. Die Zellkultivierung erfolgte in einem Brutschrank, der auf die zell-spezifischen Wachstumsbedingungen eingestellt wurde. Bei einer kontrollierten Kohlenstoffdioxidzufuhr von 5 %, einer konstanten Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C konnten die Zellen in einer Zellkulturflasche proliferieren.

2.2.1.2. Auftauen der Zellen

Da die Zellen für die längerfristige Lagerung kryokonserviert wurden, mussten die Zellen vor der Kultivierung aufgetaut werden. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend musste die Suspension sofort in 4 mL vorgewärmtes Medium (37 °C) überführt werden. Pro Kulturflasche konnten dann 0,5 - 1x10⁶ Zellen ausgesät und mit RPMI-Medium (siehe Tabelle 2.9) auf 5 mL

aufgefüllt werden. Die Kulturflasche wurde anschließend im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ gelagert.

2.2.1.3. Subkultivierung der Zellen

Zur Kultivierung der Zellen mussten die adhärennten Zellen vom Kulturboden gelöst werden, sobald sich ein konfluenter Zellrasen von 80 % ausgebildet hat. Dafür wurde das überstehende Medium entfernt und die Zellen mit 3 mL PBS vorsichtig gewaschen. Durch zweiminütige Inkubation mit 0,5 mL Trypsin/EDTA oder 0,5 mL Accutase im Brutschrank konnten die Zellen von der Kulturfläche abgelöst werden. Diese wurden daraufhin mit 4,5 mL Medium aufgenommen und resuspendiert. Zur erneuten Aussaat wurden dann 2×10^5 Zellen/mL verwendet, die in neue Kulturflaschen mit 5 mL frischem RPMI-Medium überführt wurden.

2.2.1.4. Kryokonservierung

Für die längerfristige Lagerung wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dafür wurde das Zellkulturmedium aus der Kulturflasche entfernt. Dann wurden die Zellen mit 3 mL PBS gespült und der Überstand konnte verworfen werden. Die Zellen konnten dann durch die Inkubation mit 0,5 mL Trypsin-Lösung vom Flaschenboden gelöst und anschließend in 9,5 mL Medium resuspendiert werden. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 200 × g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet konnte dann in 1-2 mL Einfriermedium resuspendiert werden. Pro Kryoröhrchen sollten 2×10^6 Zellen/mL eingefroren werden. Die Kryoröhrchen mit der Zellsuspension wurden dann für 24 h bei -80 °C in ein mit 250 mL Isopropanol gefülltem Einfriergerät (Mr. Frosty), eingefroren. Danach konnten die Kryoröhrchen in den Stickstoff-Gefrierbehälter zur längerfristigen Lagerung überführt werden.

2.2.2. CFSE Färbung

Um Zellen nach einer immunomagnetischen Separationen detektieren zu können, wurden die MCF-7 Zellen mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. CFSE ist ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, der von Zellen in

das Zytoplasma aufgenommen und durch Esterasen kovalent an Proteine gebunden wird. Der Farbstoff besitzt sein Anregungsmaximum bei 492 nm und sein Emissionsmaximum bei 517 nm [94].

Damit die Zellen mit CFSE gefärbt werden konnten, wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung (siehe Kapitel 2.2.1.3) vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Daraufhin konnte das gewünschte Volumen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 37 °C warmen PBS im Ausgangsvolumen resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden dann 2 µL/mL der 5 mM CFSE-Lösung hinzugegeben (siehe Tabelle 2.9). Die Suspension inkubierte dann für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde in RPMI-Medium (Ausgangsvolumen) resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin erfolgte nochmals ein Waschschrift mit Medium bei den oben genannten Parametern.

2.2.3. Manuelle Einzelaufnahme der Zellen

Um standardisierte Bedingungen bei der Durchführung der Anreicherungsversuche zu gewährleisten, wurde bei jedem Anreicherungsversuch eine definierte Menge von 20 CFSE gefärbten Einzelzellen eingesetzt. Dafür mussten die zuvor CFSE gefärbte Zellen (siehe Kapitel 2.2.2) durch starkes Resuspendieren vereinzelt werden. Anschließend wurden 10 µL der Zellsuspension entnommen und diese in einer mit RPMI-Medium gefüllten Petrischale (55 mm Durchmesser) verteilt. Diese wurde dann unter das Fluoreszenzmikroskop gestellt und 5 Minuten ruhen gelassen, damit sich die Zellen auf dem Boden der Petrischale absetzen. Die Zellen konnten dann im Fluoreszenzmikroskop mit einer 10 µL Pipette vereinzelt aufgenommen werden.

2.2.4. Referenzmethode für die immunomagnetische Separation

Als Positivkontrolle wurde bei jedem Testdurchlauf ein Standardversuch durchgeführt. Für den Standardversuch wurden 20 CFSE gefärbte Einzelzellen in 1 mL Medium suspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 20 µL magnetische Partikel

mit der Ausgangskonzentration von 10 mg/mL hinzugegeben. Die Inkubation der Zell-Partikel-Suspension erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Überkopfmischer bei 5 rpm. Nach der Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß für 5 Minuten in einen Magnetseparationsständer gestellt. Der Überstand konnte danach verworfen werden und die angezogenen magnetischen Partikel und Zellen wurden in 1 mL PBS resuspendiert. Daraufhin erfolgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Nach dem dritten Waschschrte wurden die magnetischen Partikel und Zellen in 70 µL PBS resuspendiert und anschließend in mehreren Aliquots in die Neubauer-Zählkammern überführt. Zum Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurde der gesamte Bereich unter dem Deckgläschen betrachtet.

2.2.5. Bestimmung der Fangrate

Die Effizienz der Aufreinigung wurde über die Fangrate definiert. Um diese zu berechnen wurde die aufgereinigte Probe im letzten Reinigungsschrte in 70 µL PBS aufgenommen. Die Auszählung der Zellen erfolgte dann in einer Neubauer-Zählkammer, indem mit einer 20 µL Pipette die Probe in mehreren Aliquots in die Neubauer-Zählkammer pipettiert wurde. Aus der Anzahl der gefundenen Zellen konnte daraufhin die Fangrate wie folgt berechnet werden [95, 96]:

$$\frac{\text{Wiedergefundene Zellen}}{\text{Eingebrachte Zellen}} \times 100 = \text{Wiederfindungsrate \%}$$

2.2.6. Vitalitätsbestimmung mittels CASY Counter

Die Vitalität der Zellen konnte durch den CASY Counter bestimmt werden. Dieser kann durch elektrische Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Pore analysieren, welchen physiologischen Zustand eine Zelle besitzen. Vitale Zellen haben eine intakte Zellmembran, welche den elektrischen Strom ausschließen kann. Dadurch wird ein Signal erzeugt, welches vom Zellvolumen abhängt. Diesen Vorgang nennt man Electrical Current Exclusion (ECE). Tote Zellen besitzen hingegen eine poröse Membran, welche den Strom nicht ausschließen kann. Der Strom kann daher die Zelle auf direktem Wege durchdringen, das wiedergegebene Signal entspricht dann dem Volumen des Zellkerns [97]. Um eine Probe analysieren zu können, wurden 100 µL der Zellsuspension in 9,9 mL Casyton pipettiert

und im CASY Counter gemessen. Die Vitalität der Zellen wird bestimmt, indem die Anzahl der lebenden Zellen durch die Gesamtzahl der Detektierten Zellen dividiert wird.

$$\frac{\text{lebende Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100 = \text{Vitalität \%}$$

2.2.7. Vitalitätsbestimmung in verschiedenen Anreicherungssystemen

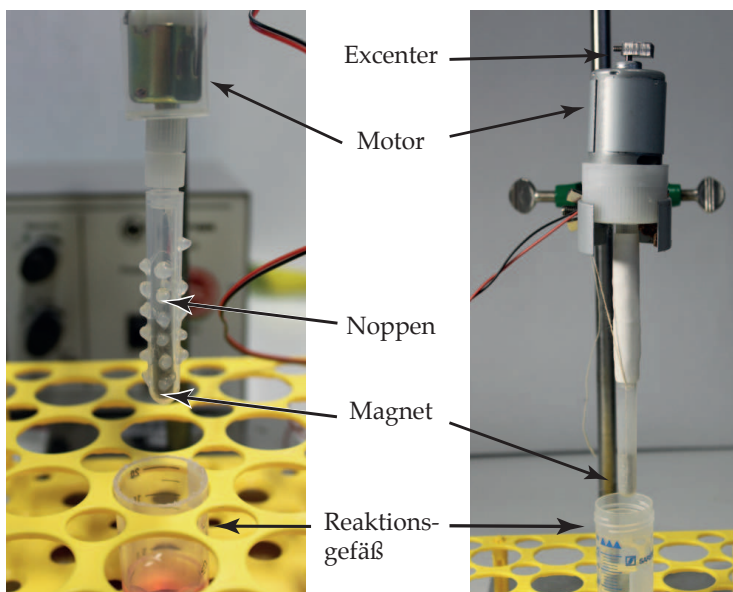


Abbildung 2.1.: Die linke Abbildung zeigt den Noppenrührer, die rechte Abbildung den Excenter. Die Durchmischung der Suspension fand bei diesen Geräten in einem 50 mL Reaktionsgefäß statt. Die Magnete in den beiden Geräten konnten über ein Seil per Hand im Röhrchen herabgelassen werden, oder während der Durchmischung im Röhrchen nach oben gezogen werden.

Eine Anforderung an das Aufreinigungssystem ist die schonende Durchmischung der Zellen und magnetischen Partikel. Daher wurde bei jedem Anreicherungssystem die Vitalitätsraten der Zellen nach der Durchmischung bestimmt. Die verschiedenen Anreicherungssysteme Excenter, Noppenrührer (siehe Abbildung 2.1) und Pumpsystem (siehe Abbildung 2.9) wurden jeweils mit 4 mL Medium, 1 mL Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL und 100 μ L Speedbeads von Thermo Scientific getestet. Die Vitalität der Zellen wurde bei jedem Test vor und nach einer 20-minütigen Durchmischung bestimmt, indem 100 μ L der Zellsuspension in 10 mL Casyton pipettiert wurden. Durch Invertieren wurden die Zellen mit dem Casyton vermischt. Daraufhin konnte die Vitalität der Zellsuspension mit dem CASY Counter bestimmt werden.

2.2.8. Funktionalisierung der Magnetpartikel mit Antikörpern

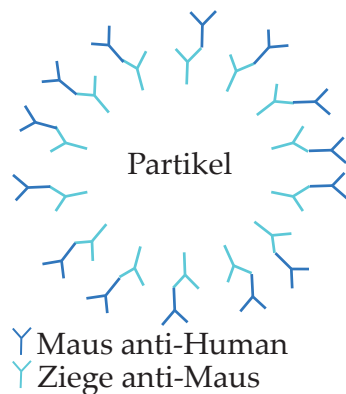


Abbildung 2.2.: Magnetpartikel beschichtet mit Ziege anti-Maus Antikörpern. Diese binden an die FC-Region eines Maus Antikörpers.

In den folgenden Abschnitten sind die Protokolle zur Funktionalisierung der verschiedenen magnetischen Partikel aufgeführt.

2.2.8.1. Ziege anti-Maus-Partikel

Prinzip der Funktionalisierung: Die 4,5 μm großen Ziege anti-Maus-Partikel von Dynabeads® wurde mit einem Ziege anti-Maus Antikörper beschichtet, der gegen alle Maus Immunglobulin G-Subklassen gerichtet ist (siehe Abbildung 2.2). Der Ziege anti-Maus Antikörper bindet dabei unspezifisch an die FC-Region (engl. fragment crystallisable) des Antikörpers [98].

Protokoll der Funktionalisierung: Die antikörperbeschichteten Partikel wurden 30 Sekunden gevortext. 100 μL der Partikeluspension wurden dann in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 1 mL PBS/BSA hinzupipettiert und resuspendiert. Das Gefäß wurde anschließend für eine Minute in ein Magnetseparationsständer gestellt. Als nächstes konnte der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß aus dem Magnetseparationsständer entfernt werden. 100 μL der Antikörperlösung (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wurden dann zu den Partikeln pipettiert und für eine Stunde bei 4 °C im Überkopfmischer inkubiert. Anschließend wurden die Partikel zweimal gewaschen. Dafür wurden die Partikel eine Minute magnetisch angezogen. Dann konnte der Überstand verworfen und die Partikel wieder in 1 mL PBS/0,01%BSA resuspendiert werden. Beim letzten Waschschrift wurden die Partikel in 100 μL PBS/0,01%BSA aufgenommen.

2.2.8.2. Carboxylbeschichtete Partikel

Prinzip der Funktionalisierung Die Carboxyl-Adem-beads (siehe Abbildung 2.4) sind monodisperse und supermagnetische Nanopartikel bestehend aus einem magnetischen Kern, ummantelt mit einer hochgradig kreuzvernetzte hydrophile Polymerhülle mit freien Carboxylgruppen. Die Carboxylgruppen werden durch

EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochlorid) aktiviert und binden über primäre Amine kovalent an die Carboxylgruppen [99].

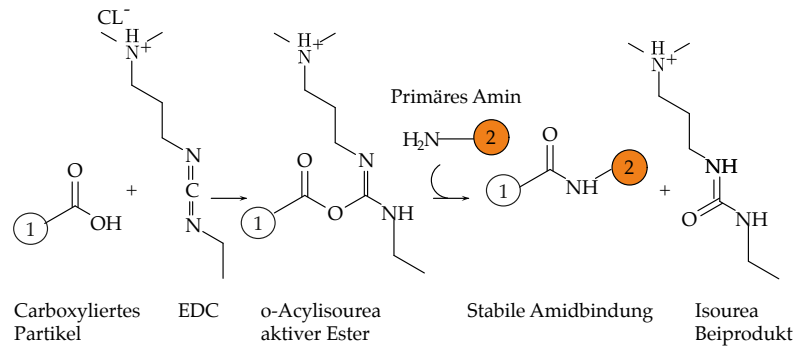


Abbildung 2.3.: Magnetische Partikel (1) funktionalisiert mit Carboxylgruppen, welche durch Zugabe von EDC aktiviert werden und mit Proteinen (2) die primären Aminen besitzen eine stabile Amidbindung ausbilden können.

Protokoll der Funktionalisierung Für die Funktionalisierung der 500 nm großen carboxylbeschichteten Partikel wurde das kommerziell erhältliche Kit von Ademtech verwendet. Diese wurden mit einem monoklonalen Maus anti-Human EpCAM Antikörper gekoppelt. Zur Vorbereitung der Funktionalisierung wurden zuerst der im Kit enthaltenen „activation buffer“ und der „storage buffer“ jeweils 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dann wurden 200 µL der magnetischen Partikel in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und eine Minute in einen Magnetseparationsständer gestellt. Der Überstand konnte daraufhin verworfen, der Magnet entfernt und die Partikel vorsichtig in 200 µL „storage buffer“ resuspendiert werden. Dieser Schritt wurde 3

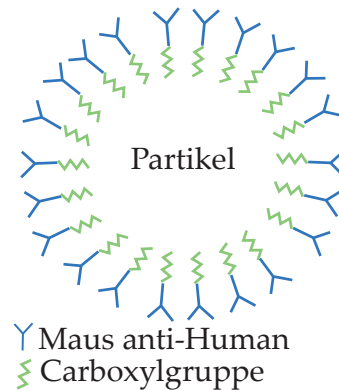


Abbildung 2.4.: Carboxylbeschichtete Partikel kovalent über primäre Amine mit Antikörpern gekoppelt

mal wiederholt. Anschließend wurde 1 mg EDC in 250 µL „activation buffer“ gelöst und 160 µL der EDC-Lösung zu den Partikeln pipettiert. Diese wurden dann für 20 Sekunden gevortext und für 10 Minuten bei 37° C und 200 rpm für 10 Minuten auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Daraufhin konnten 50 µg Antikörper pro 100 µL Partikel zu den aktivierten Partikeln pipettiert und für 2 Stunden bei 37° C auf dem Horizontalschüttler mit 200 rpm inkubiert werden. Währenddessen konnten 1 mg BSA in 2 mL „activation buffer“ gelöst werden.

400 μL dieser Lösung wurden dann den Partikeln zugeführt. Die Partikel-Lösung wurde dann 20 Sekunden gevortext um die Partikel-Lösung zu vermischen. Diese Lösung inkubierte dann weitere 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler bei 37°C und 200 rpm. Im Anschluss wurden die Partikel zweimal mit 400 μL „storage buffer“ gewaschen, indem die Partikel eine Minute in einem Magnetseparationsständer angezogen wurden. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und die Partikel im „storage buffer“ resuspendiert. Im letzten Waschschriff erfolgte das resuspendieren in 200 μL „storage buffer“.

2.2.8.3. Streptavidinpartikel

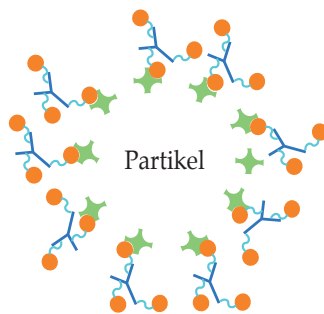


Abbildung 2.5.: Immuno-magnetische Streptavidinpartikel gekoppelt mit biotinmarkiertem Antikörper. Die freien Bindungsstellen wurden mit Streptavidin geblockt.

Prinzip der Funktionalisierung Die Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 Magnetpartikel haben einen Durchmesser von 1 μm und sind einschichtig mit rekombinantem Streptavidin beschichtet. Biotinmarkierte Antikörper binden kovalent mit hoher Affinität an das Streptavidin auf dem Magnetpartikel kovalent gebunden werden (siehe Abbildung 2.5) [100].

Protokoll der Funktionalisierung Die Streptavidinpartikel (siehe Abbildung 2.5) wurden durch diverse Versuche optimiert. Im Folgenden ist beispielhaft die Funktionalisierung beschrieben, die zu den höchsten Fangraten geführt hat. Zur Funktionalisierung von 100 μL Streptavidinpartikeln in Lösung wurden 100 μL monoklonaler biotinkoppelter anti-EpCAM Antikörper mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS angesetzt.

Die Partikel wurden zuerst für eine Minute magnetisch separiert, dann wurde der Überstand verworfen und anschließend erfolgte die Resuspendierung der Partikel in 1 mL PBS/0,01 % BSA.

Danach wurden die Partikel erneut für eine Minute magnetisch angezogen, der Überstand verworfen und in 100 μL Antikörperlösung resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten im Überkopfmischer. Nach der Inkubation wurden die Partikel erneut für eine Minute magnetisch separiert, der Überstand verworfen und in 200 μL 0,01 % Biotin-Lösung resuspendiert. Diese Suspension

inkubiert wiederum 30 Minuten im Überkopfmischer. Anschließend wurden die Partikel wieder für eine Minute magnetisch separiert und mit 1 mL PBS/0,01 % BSA gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei beim letzten Waschschrift die Partikel in 100 μ L PBS/BSA aufgenommen wurden.

2.2.9. Anreicherungsprotokoll

Die Abläufe der Anreicherungsprotokolle wurden beim halb-automatisierten sowie beim voll-automatisierten System stetig verbessert. Bei beiden Anreicherungs-systemen wurde die Blutprobe zuerst durch Resuspendieren mit magnetischen Partikeln inkubiert. Anschließend wurde die Probe in die Pipettenspitze aufgenommen (Abbildung 2.6).

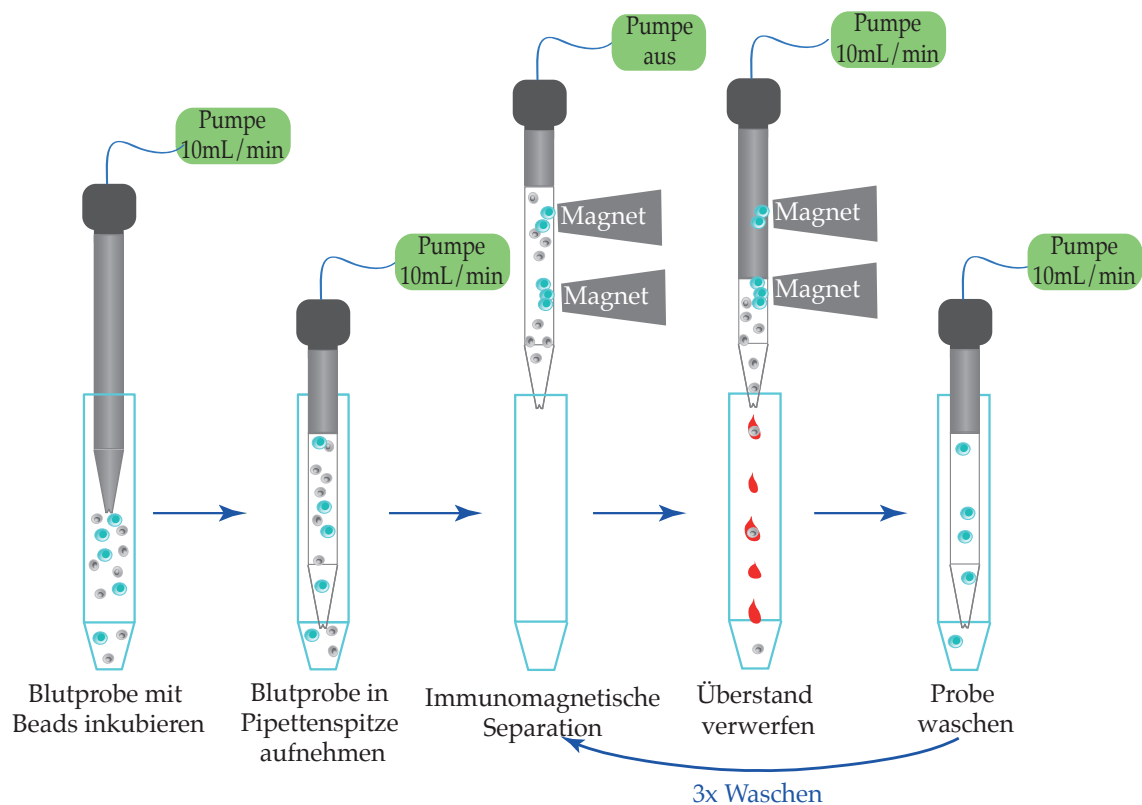


Abbildung 2.6.: Ablauf der halb-automatisierten Anreicherung. Die Blutprobe wurde zuerst mit den immunomagnetischen Partikeln durch Resuspendieren inkubiert. Daraufhin wurde die Probe in die Pipettenspitze aufgenommen und durch magnetische Separation konnten die Krebszellen von den Blutzellen getrennt werden. Der Überstand wurde verworfen und die Probe im Anschluss dreimal gewaschen.

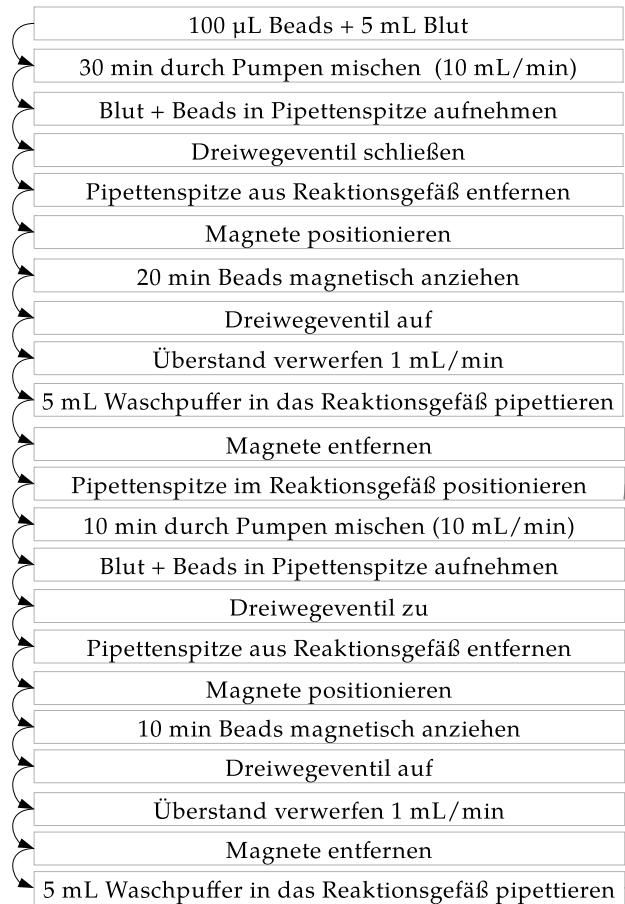


Abbildung 2.7.: Ablauf der Anreicherung

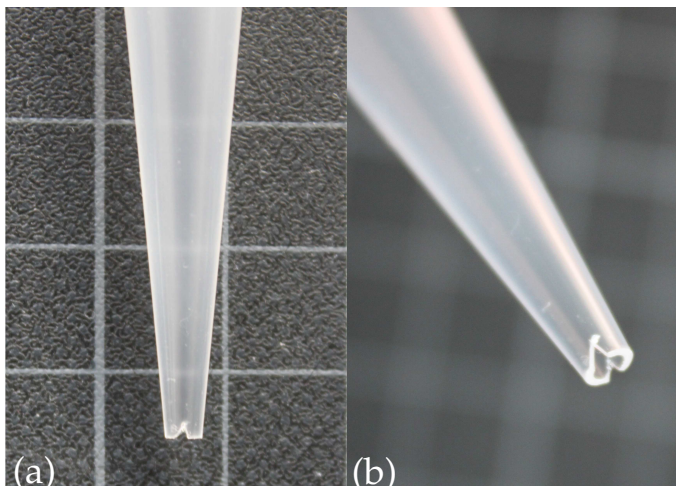


Abbildung 2.8.: Für die optimale Flüssigkeitsaufnahme wurde die Pipettenspitze mit einem Skalpell eingekerbt.

Durch die Positionierung von Magneten an die Außenseite der Pipette wurde eine immunomagnetische Separation innerhalb der Pipettenspitze durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und durch dreimaliges Waschen der Probe mit Waschpuffern konnte die Probe gereinigt und anschließend analysiert werden. Dieser Grundablauf wurde bei beiden Anreicherungssystemen beibehalten und optimiert. Die Protokolle, bei denen die Wiederfindungsrate der CTCs am höchsten waren, sind im Folgenden dargestellt.

2.2.9.1. Halb-automatisierte Anreicherung

Bei der halb-automatisiert Anreicherung von Krebszellen kamen 20 CFSE-gefärbte MCF-7 Zellen zum Einsatz (siehe Kapitel 2.2.2 - Kapitel 2.2.3). Eine 10 mL Pipettenspitze wurde mit einem Skalpell zweimal eingekerbt (Abbildung 2.8), damit die Flüssigkeit im Reaktionsgefäß optimal aufgenommen werden kann, ohne dass in der Pipettenspitze ein Unterdruck entsteht.

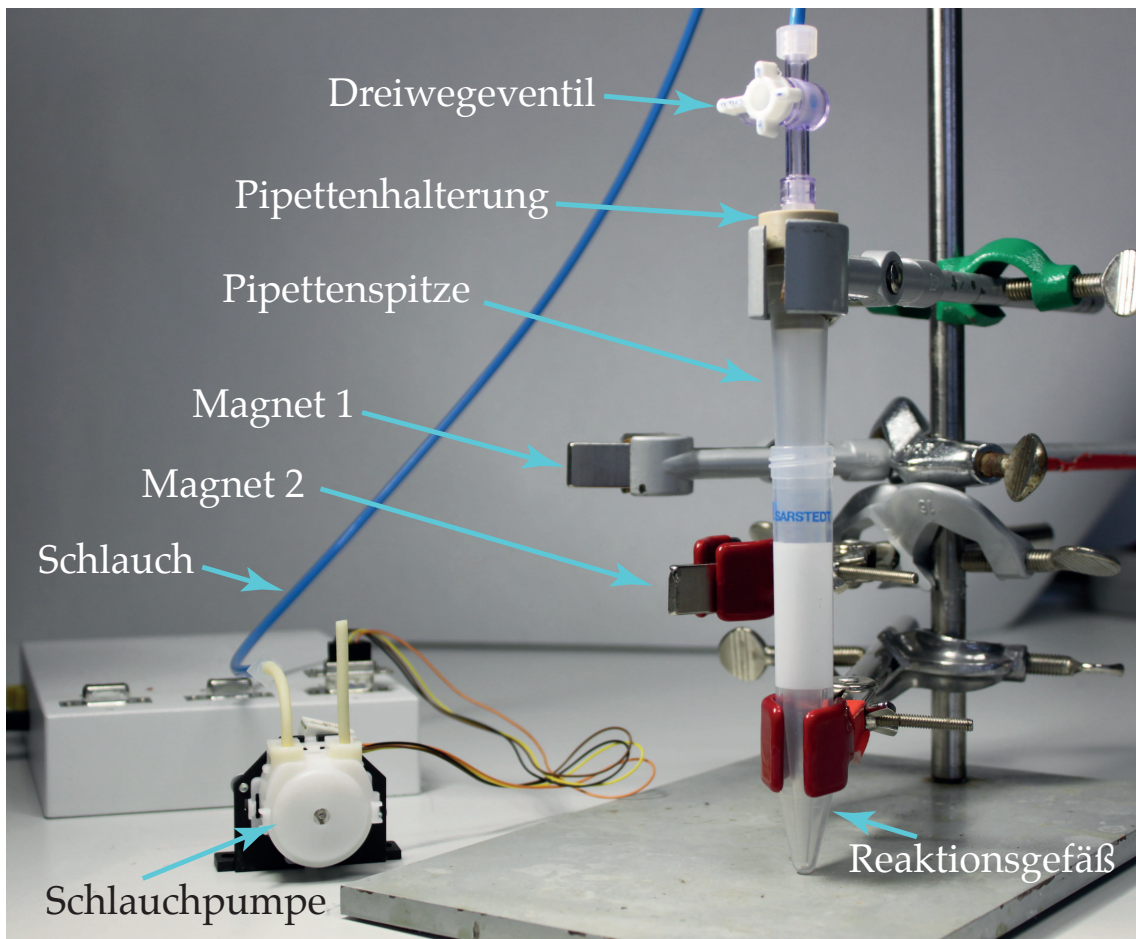


Abbildung 2.9.: Halb-automatisiertes Anreicherungsmodul mit Schlauchpumpe, Dreibeinventil und Pipettenhalterung. Die Magnete, Pipetten- und Ventilpositionen wurden manuell eingestellt.

In Abbildung 2.7 ist der generelle Protokollablauf dargestellt; die dazugehörigen Parameter sind in Tabelle A.1 auf Seite 125 aufgelistet. Die Pipettenspitze wurde in einer speziell gefertigten Pipettenhalterung mit pneumatischem Anschluss zur Schlauchpumpe aufgenommen und wie in Abbildung 2.9 zu sehen im Reaktionsgefäß positioniert. In das 15 mL Reaktionsgefäß wurden vorher je nach Versuch 5 mL Blut oder RPMI-Medium, sowie 20 CFSE gefärbte MCF-7 Zellen und 100 μL Streptavidinpartikel pipettiert.

Die Ansteuerung der Schlauchpumpe erfolgte über ein LabVIEW Programm, welches in Zusammenarbeit mit Programmierern vom Fraunhofer ICT-IMM entwickelt wurde.

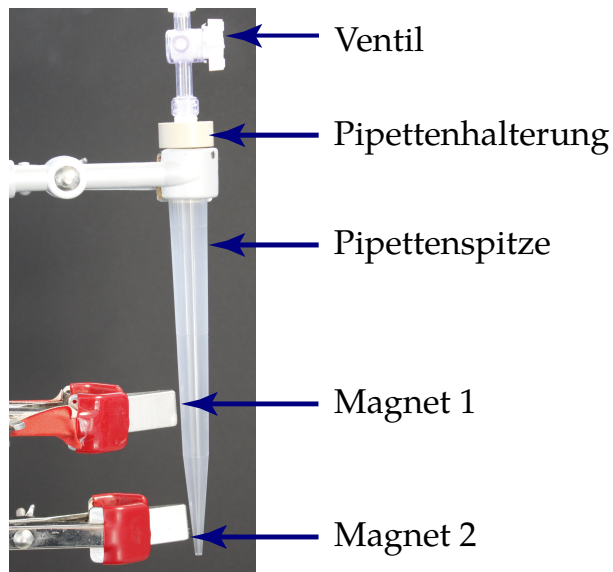


Abbildung 2.10.: Seitliche Darstellung des halb-automatisierten Anreicherungsmoduls

Der Ablauf des Programms ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Nach dem Protokoll durchlauf wurde das Probenvolumen für die Auszählung reduziert, indem ein 15 mL Reaktionsgefäß für 10 Minuten in einen Magnetseparationsständer gestellt wurde. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und die Zellen in 70 μ L PBS/0,1 % BSA resuspendiert. Die Auszählung der Zellen fand mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop statt. Der Pufferwechsel, die Ventilstellung sowie die Pipettenaufnahme und -ausrichtung wurden manuell durchgeführt.

2.2.9.2. Voll-automatisierte Anreicherung

Geräteaufbau Auf Grundlage des zuvor getesteten halb-automatisierten Anreicherungsmoduls wurde in Zusammenarbeit mit Konstrukteuren und Programmierern vom Fraunhofer ICT-IMM ein voll-automatisiertes System entwickelt (siehe Abbildung 2.11). Die Schlauchpumpe (siehe Abbildung 2.15) wurde durch eine Spritzenpumpe ersetzt und die Magnete an einem Y-förmigen Magnetarm befestigt.

Der Magnetarm (siehe Abbildung 2.15) wurde wiederum an einer in X- und Z-Richtung fahrbaren Halterung angebracht, an der auch die Pipettenhalterung befestigt wurde. Diese wurde über eine Luer-Lock Verbindungen und einem Schlauch mit der Spritzenpumpe verbunden. Der Schlauch und die Kabel für die Elektronik wurden zum Schutz durch eine Energiekette geführt.

Damit der Pufferwechsel automatisch ablaufen konnte, wurde ein Probenkarussell mit sechs Positionen genutzt (siehe Abbildung 2.11 und Abbildung 2.12). Dieses konnte vor einem Anreicherungsablauf mit der Blutprobe (Position 1), den 5 mL

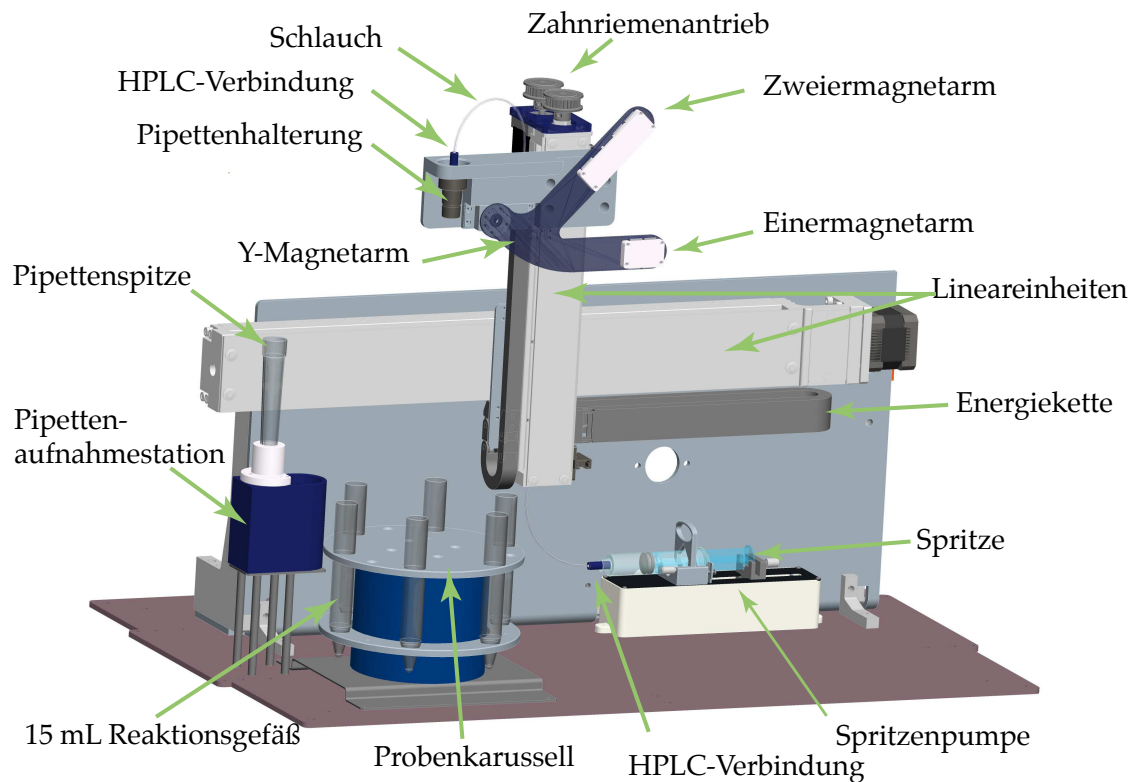


Abbildung 2.11.: Parallelperspektivische Zeichnung des Anreicherungsmoduls. Durch die vertikal und horizontal verfahrbare Pipetten- und Magnethalterung kann die Pipettenaufnahmestation oder das Probenkarussell angefahren werden. Die verschiedenen Flüssigkeiten werden durch Verwendung einer Spritzenpumpe gemischt.

Waschpuffern (Position 2&3), dem 4 mL Waschpuffer (Position 4) und dem 1 mL Fluoreszenzfarbstoff (Position 5) bestückt werden. Die Aufnahme der eingekerbte Pipettenspitze durch die Pipettenhalterung erfolgte ebenfalls automatisiert am Anfang jedes Programmdurchlaufs.

Um die verschiedenen Volumina von Waschpuffern, Blut und der Quantum Dot Suspension automatisiert pipettieren zu können, wurden unterschiedliche vertikale und horizontale Pipettenpositionen programmiert (siehe Abbildung 2.14). Die unterschiedlichen Pipettenpositionen und deren Funktion werden im Folgenden dargestellt und erläutert.

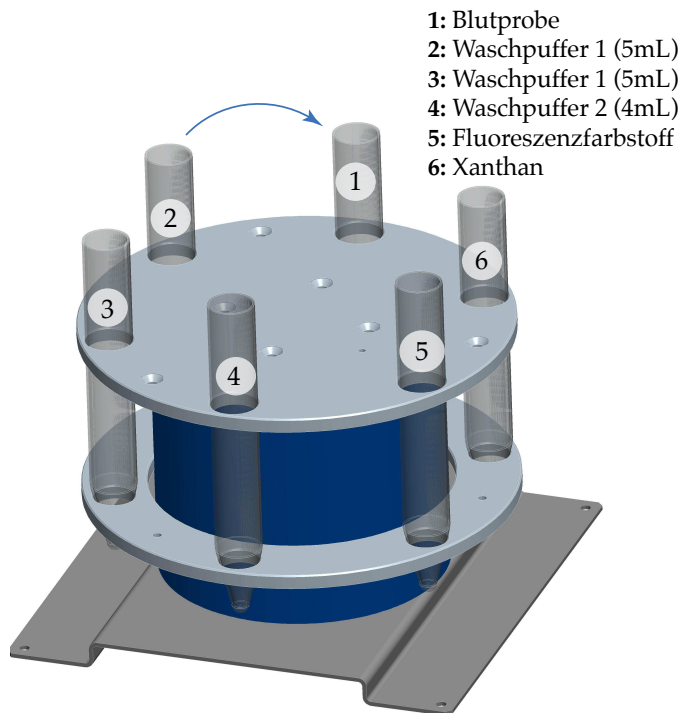


Abbildung 2.12.: Die Abbildung zeigt das Probenkarussell mit den Sechs Positionen für verschiedene Puffer. In Position 1 wurde die Blutprobe mit den Partikeln gestellt, Position 2 und 3 wurden jeweils mit 5 mL Waschpuffer beladen. In Position 4 wurden 4 mL Waschpuffer benötigt und in Position 5 wurde der Fluoreszenzfarbstoff vorgelagert. Das Karussell rotierte im Uhrzeigersinn um die Reagenzien in der richtigen Reihenfolge unter der Pipette zu platzieren.

Ablauf der automatisierten Anreicherung

Mischen der Blutprobe Beim Start des Gerätes befand sich die Magnet- und Pipettenhalterung in der Ausgangsposition, welche sich horizontal am rechten Rand des Gerätes und in der höchsten vertikalen Position (Z-Max) befindet, dargestellt in Abbildung 2.13 (a). Im Anschluss wurde die Magnet- und Pipettenhalterung zur „Pipettenposition“ gefahren (b). Über der Pipettenaufnahmestation angekommen wurde die Magnet- und Pipettenhalterung auf die vertikale Position „Pipettenspitze“ verfahren (c), sodass die Pipettenspitze durch die Pipettenhalterung aufgenommen werden konnte. Dieses Verfahren garantierte eine einheitliche Position der Pipettenspitze bei allen Versuchen.

Die Magnet- und Pipettenhalterung musste anschließend wieder zur Z-Max-Position (d) verfahren werden, damit die aufgenommene Pipettenspitze nicht beim Verfahren der Halterung am Karussell hängen blieb. Daraufhin konnte die Halterung mit der Pipettenspitze zur horizontalen Position „Karussell“ gefahren werden (e). Diese Position befand sich über dem ersten Röhrchen des Probenkarusselles. Anschließend wurde die Pipettenspitze vertikal auf die Position „Blutprobe“ (f) gefahren.

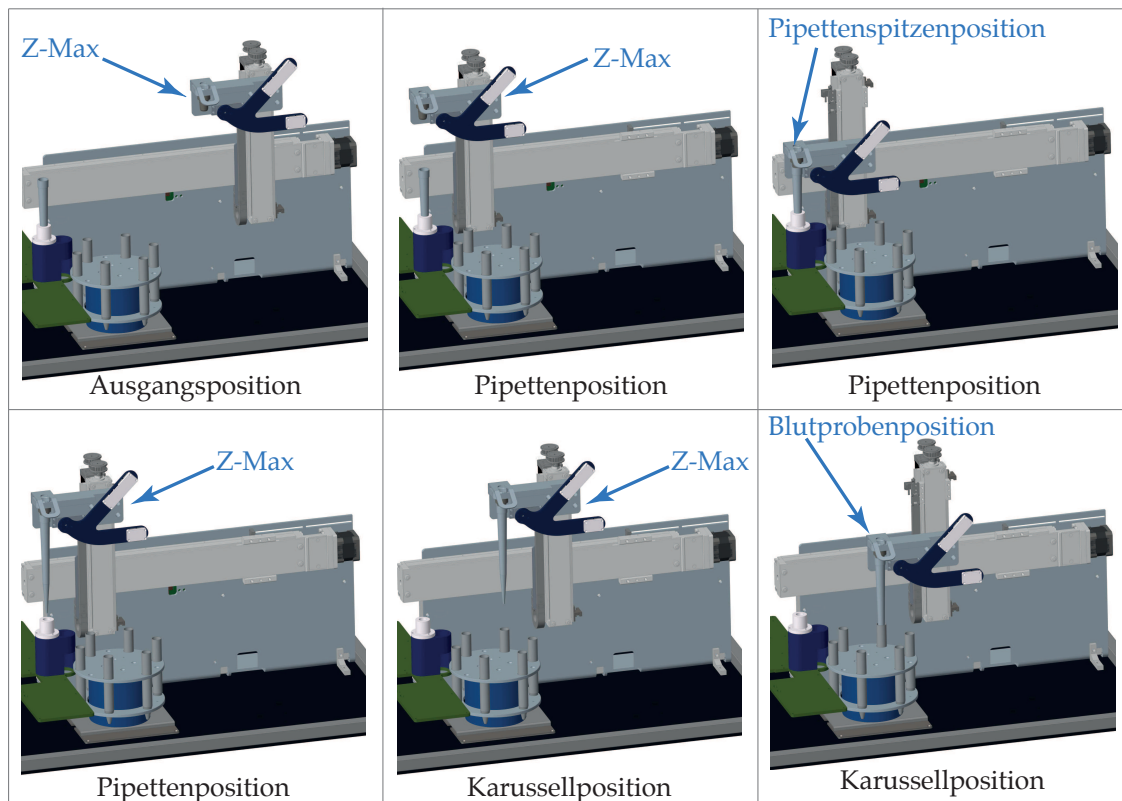


Abbildung 2.13.: Die blau geschriebenen Positionen geben die vertikale Position der Magnet- und Pipettenhalterung an, während die schwarz geschriebenen Positionen die horizontalen Positionen angeben.

Da die Pipette über einen Zahnriemenantrieb vertikal verfahren wurde, sind die Geschwindigkeiten, mit der die Pipettenhalterung die unterschiedlichen Positionen eingenommen hatte in „mm/s“ angegeben.

Die Pipettenspitze wurde beim Verfahren auf die Position „Blutprobe“ 0,5 cm in die 7,5 mL Blutprobe getaucht (siehe Abbildung 2.14). Ausgehend von der Blutprobenposition wurde die Pipettenspitze für 30 min zwischen den vertikalen Positionen „Blutprobe“ und „Mischposition“ mit 1,1 mm/s verfahren (siehe Abbildung 2.14), während mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min die Probe von der Spritzenpumpe aspiriert und dispensiert wurde.

Die Verfahrensgeschwindigkeit der Pipettenhalterung wurde so gewählt, dass die Pipettenspitze sich immer in der Blutprobe befand, sodass keine Blasen in die Pipettenspitze aufgesaugt werden konnten und die Oberfläche der Pipettenspitze nur minimal mit der Blutprobe in Kontakt kam. Die Wiederholrate und die Flussgeschwindigkeit wurden so gewählt, dass eine optimale Durchmischung der

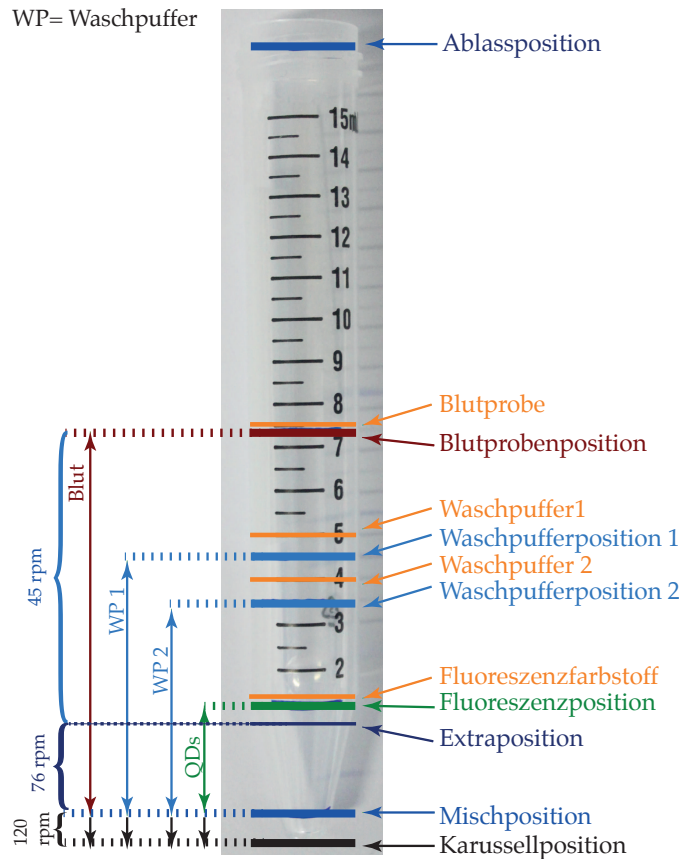


Abbildung 2.14.: Die orangenen Markierungen zeigen den Füllstand des Reaktionsgefäßes für die unterschiedlichen Medien (Blutprobe, Waschpuffer oder Fluoreszenzfarbstoff) an. Während die Pufferpositionen die Position der Pipettenspitze im Reaktionsgefäß anzeigt. Die Pfeile auf der linken Seite geben den Wdeg der Pipettenspitze während des Resuspendierens beim jeweiligen Puffer an. Weiterhin sind die Geschwindigkeiten angegeben, mit der die Pipettenspitze zwischen den verschiedenen Positionen hin und her gefahren werden.

immunomagnetischen Partikel mit der Blutprobe, ohne dass sich Partikel ablagern konnten. Andererseits wurde die Flussrate aber auch so niedrig wie möglich eingestellt, um Schaumbildung und Zerstörung der Zellen durch Scherkräfte zu minimieren.

Zum Aufnehmen der kompletten Probe wurde die Pipettenspitze bis zur vertikalen Position „Mischposition“ mit 1,1 mm/s verfahren. Ab der „Mischposition“ wurde die Pipettenspitze mit 3 mm/s verfahren (siehe Abbildung 2.14). Die Geschwindigkeit im Konus des Reaktionsgefäß wurde erhöht, da im Bereich der konischen Form des Reaktionsgefäßes bei konstanter Pumprate die Eintauchtiefe nur konstant gehalten werden konnte, wenn die Hubgeschwindigkeit der Pipettenspitze entsprechend nachgeregelt wurde. Zur Vereinfachung wurden hier allerdings nur zwei Flussraten gewählt, die sicherstellen, dass immer eine Mindesteintauchtiefe gewährleistet war.

Zusätzlich zu den verschiedenen vertikalen und horizontalen Positionen wurden noch ein oder zwei Magnete zur Volumenreduktion vorgesehen. Diese wurden

benötigt, um das Volumen der ursprünglich 7,5 mL Probe auf 1 mL zu minimieren (siehe Abbildung 2.14).

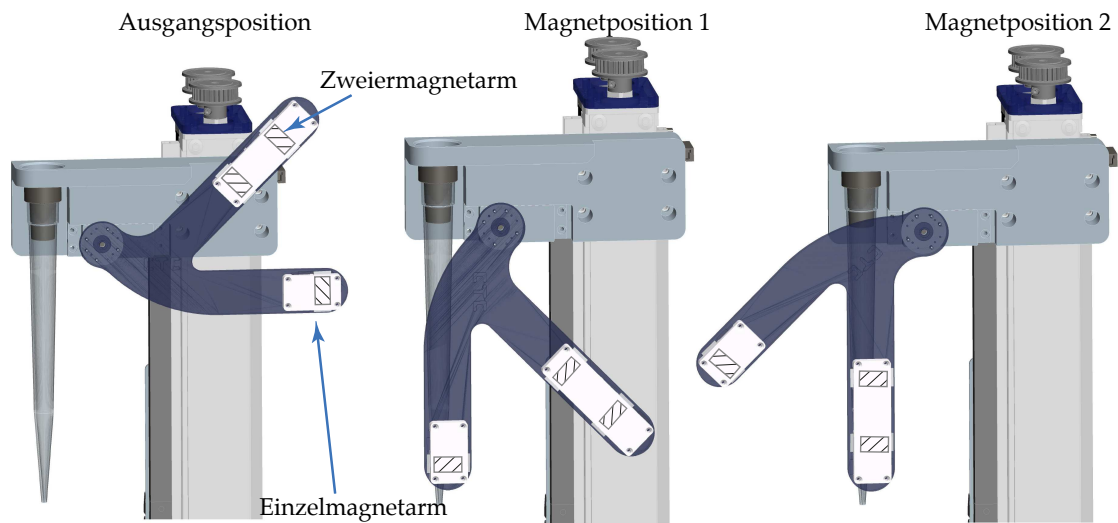


Abbildung 2.15.: Verschiedene Positionen des Magnetarmes. Während des Mischens wird der Magnetarm in die Ausgangsposition gefahren. Magnetposition 2 kommt während des Anreicherns von Zellen im großen Volumen (7,5 mL und 5 mL) zum Einsatz. Beim letzten Waschschrift mit 4 mL wird Magnetposition 1 verwendet um die angezogenen Partikel danach in 1 mL resuspendieren zu können. Die grau schraffierten Rechtecke zeigen die Positionen der Magnete.

Separation der Partikel Nachdem die Probe in die Pipettenspitze aufgenommen wurde, konnte die Pipettenspitze, in der sich die Probe befand, mit 22,5 mm/s auf die vertikale Position „Ablassposition“ (siehe Abbildung 2.14) gefahren werden. Dort konnte der Magnetarm auf die Magnetposition 2 gefahren werden (Einzelmagnetarm) (siehe Abbildung 2.15). Diese Position wurde für 200 Sekunden gehalten, danach konnte der Zweiermagnetarm (Magnetposition 3) zur Pipettenspitze gefahren werden und weitere 400 Sekunden gehalten werden. Auf diese Weise konnten sich die Partikel in der Probe an die Innenseite der Pipettenspitze anlagern. Der Einzelmagnetarm wurde zuerst angefahren, damit sich an der unteren Magnetposition mehr Partikel anlagern als an der oberen Magnetposition, da sich gezeigt hat, dass sich die Partikel an der unteren Position leichter lösen lassen als bei der oberen Position. Nachdem sich die Partikel zuerst an der unteren Position anlagern konnten, wurde der Zweiermagnetarm zur Pipettenspitze gefahren, damit auch die Partikel vom Magneten angezogen werden konnten, die sich im oberen Volumen der Probe befinden.

Nachdem sich die Partikel an der Innenseite der Pipettenspitze anlagern konnten, wurde der Überstand mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/Minute in das Ausgangsröhrchen abgelassen. Die Dispensionsgeschwindigkeit des Überstandes wurde so eingestellt, dass die Partikel nicht durch zu hohe Scherraten vom Magnet abgelöst werden konnten. Nachdem der Überstand dispensiert wurde, konnte die Pipettenspitze zur Position „Z-Max“ verfahren und das Karussell auf die „Position 2“ gedreht werden. In Position 2 befand sich ein Reaktionsgefäß mit 5 mL Waschpuffer. Der Magnetarm wurde anschließend in die Ausgangsposition gefahren. (siehe Abbildung 2.15)

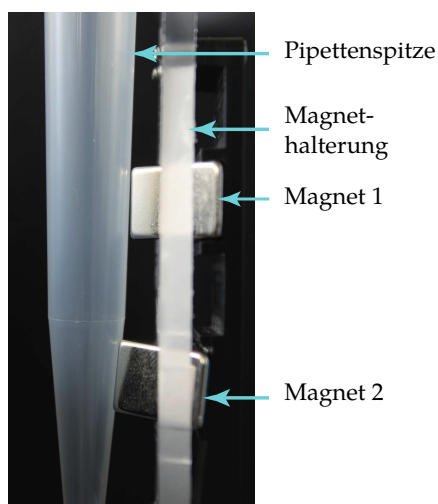


Abbildung 2.16.: Seitliche Aufnahme der Magnethalterung.

Waschschritt 1 Nach der Separation konnte die Pipettenspitze auf die vertikale „Waschpufferposition 1“ gefahren werden (siehe Abbildung 2.14). Im Anschluss daran wurden die Partikel, die sich an der Innenseite der Pipette angelagert hatten, durch den Waschpuffer resuspendiert. Indem die Pipettenspitze 10 Minuten von der vertikalen Position „Waschpufferposition 1“ zur „Extraposition“ mit 1,1 mm/s und von der „Extraposition“ zur „Mischposition“ mit 1,9 mm/s verfahren wurde (siehe Abbildung 2.14) sodass die Probe 10 mal aspiriert und dispensiert wird. Bevor der Puffer mit den Partikeln nach den 10 Minuten vollständig

aufgenommen wurde, erfolgt noch ein Mischschritt im Konus des Reaktionsgefäßes um möglicherweise dort abgelagerte Partikeln zu resuspendieren. Dabei wurde die Pipette mit einer Geschwindigkeit 3,0 mm/s von der „Fluoreszenzposition“ zur „Karussellposition“ gefahren (siehe Abbildung 2.14). Dabei wurde die Flüssigkeit 3 mal mit einer Flussrate von 10 ml/min aspiriert und dispensiert.

Die Probe konnte daraufhin vollständig in die Pipettenspitze aufgenommen werden. Die Separation der Partikel wurde dann unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Separation durchgeführt.

Waschschritt 2 Der Waschschritt 2 wurde mit den gleichen Parametern durchgeführt, die auch beim Waschschritt 1 zur Anwendung kamen. Auch die Separation

nach dem 2. Waschschritt liefen wie oben aufgeführt ab.

Waschschritt 3 Nach der 2. Separation wurde das Karussell auf Position 3 verfahren, in der sich ein Reaktionsgefäß mit 4 mL Waschpuffer befand. Das Volumen des Waschpuffers wurde auf 4 mL verringert, um sukzessiv das Volumen der Probe zu verringern. Die Pipettenspitze wurde daher auf die vertikale „Waschpufferposition 2“ gefahren. Anschließend wurden die Partikel durch Resuspendieren aus der Pipette gelöst und gewaschen, indem die Pipettenspitze zwischen den Positionen „Waschpufferposition 2“ und Extraposition“ mit 1,1 mm/s und von der „Extraposition“ zur „Mischposition“ mit 1,9 mm/s verfahren wurde. Der aspirier- und dispensiervorgang wurde 12 mal für 10 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min durchgeführt. Daraufhin folgte ein erneuter Mischschritt im Konus des Reaktionsgefäßes unter den oben genannten Bedingungen (siehe Abbildung 2.2.9.2).

Separation der Partikel und Verkleinern des Probenvolumens Im Anschluss daran konnte die Probe in die Pipettenspitze aufgenommen werden und mit 22,5 mm/s auf die Ablassposition gefahren werden. Der Magnetarm wurde auf die Magnetposition 1 (Einzelmagnetarm) gefahren, sodass die Magnetpartikel sich 400 Sekunden an der Innenseite der Pipettenspitze anlagern konnten. Der Überstand konnte verworfen werden. Die Pipettenspitze wurde in die vertikale Position „Z-Max“ gefahren und das Karussell auf Position 5 eingestellt.

Fluoreszenzkopplung In Position 5 befand sich 1 mL Fluoreszenzlösung. Die Partikel wurden durch die Fluoreszenzlösung resuspendiert, indem die Pipettenspitze für 15 Minuten zwischen der Position „Fluoreszenzposition“ und „Karussellposition“ mit einer Geschwindigkeit von 2,8 mm/s und einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min verfahren wurde. Zur Aufnahme der Probe wurde die Pipettenspitze bis zur Position „Karussell“ verfahren. Der Magnetarm wurde auf Magnetposition 1 gedreht und die Partikel für 400 Sekunden angezogen.

Aufnahme in Xanthan In Position 6 des Probenkarussells befand sich 1 mL 0,125 % Xanthan/PBS. Die Zellen wurden in Xanthan für 15 Minuten resuspendiert und anschließend in den Chip überführt.

2.2.10. Optimierung der Waschpuffer für die immunomagnetische Separation

Um die Fangraten weiter steigern zu können, wurden verschiedene Waschpuffer getestet. Zum Einsatz kam RPMI-Medium, PBS/0,1 % BSA-Puffer und der Isolationspuffer. Die Puffer wurden wie in Tabelle 2.9 angesetzt und im Standardversuch (Kapitel 2.2.4) getestet.

2.2.11. Antikörper Fluoreszenzkopplung

Die immunhistochemische Färbung wurde mittels direkter Antikörperkopplung durchgeführt. Es wurden Atto 465-gekoppelte Antikörper und Quantum Dot-gekoppelte Antikörper (Emission bei 625 nm) für die Immunfärbung verwendet. Da die Antikörper nicht fluoreszenzgekoppelt kommerziell zu erwerben waren, mussten diese zuvor selbst gekoppelt werden. Im Folgenden sind die Funktionalisierungsprotokolle der verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen beschrieben.

2.2.11.1. Atto 465 NHS Kopplung

Die Struktur der Atto 465 NHS Farbstoffes leitet sich von dem bekannten Farbstoff Acriflavin ab. Die Anregung des Stoffes erfolgt im Bereich von 420 und 465 nm [101]. Der Farbstoff ist mit N-hydroxysuccinimidyl (NHS)- Ester gekoppelt, welche über primäre und sekundäre Aminogruppen eine chemisch stabile Verbindung zwischen dem Farbstoff und dem Antikörper ausbilden kann [102]. Der zu kopplende Antikörper musste deshalb frei von Amin beinhaltenden Substanzen sein.

Schritt 1: Dialyse

Daher wurden der monoklonale Maus anti-Human EpCAM Antikörper und der monoklonale Maus anti-Human Muc1 Antikörper jeweils vor der Kopplung dialysiert. Dafür wurde eine Slide-A-Lyzer Mini Dialyseeinheit von Thermo Scientific verwendet. Die Dialyseeinheit wurde aus dem 15 mL Reaktionsgefäß entfernt in dem sie vom Hersteller geliefert wird. Anschließend konnte das Reaktionsgefäß mit 14 mL PBS Puffer gefüllt und die Dialyseeinheit mit 1 mL PBS-Puffer befeuchtet werden. Der Puffer zum Befeuchten wurde anschließend verworfen und die 500 µL Antikörper mit einer Konzentration von 1 mg/mL konnte in die Dialyseeinheit pipettiert werden. Die Dialyseeinheit wurde dann in das mit PBS-Puffer

gefüllte Reaktionsgefäß gesteckt. Dies musste daraufhin für zwei Stunden bei 4° C auf einem Horizontalschüttler dialysiert werden. Danach wurde der Puffer mit 14 mL frischem PBS ausgetauscht und die Antikörper wurden über Nacht weiter dialysiert. Der Antikörper konnte daraufhin aus der Dialyseeinheit entnommen werden und in ein Reaktionsgefäß pipettiert werden.

Schritt 2: Atto 465 Antikörperkopplung

Für die Antikörperkopplung mit dem Atto 465 NHS Fluoreszenzfarbstoff wurde 0,2 M Natriumbikarbonat-Puffer, Markierungspuffer und Atto 465 NHS-Ester Lösung wie in Tabelle 2.9 beschrieben angesetzt. Der dialysierte Antikörper wurde dann um optimale Bedingungen für die Kopplung zu erhalten mit dem Markierungspuffer auf pH 8,3 eingestellt. Anschließend wurde zu den 500 µL Antikörper, mit einer Konzentration von 1 mg/mL, ein dreifach molarer Überschuss (4,85 µL Farbstoff) an Fluoreszenzfarbstoff gegeben (Atto 465 NHS-EsterLösung). Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte lichtgeschützt für 60 Minuten im Überkopfmischer bei Raumtemperatur.

Schritt 3: Konjugat Aufreinigung

Aufgrund der unvermeidbaren Hydrolysisierung von N-Hydroxysuccinimid (NHS) während der Kopplungsreaktion kommt es zu ungebundenen Farbstoffmolekülen. Zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffes kam eine Ausschlusschromatographie durch Verwendung von Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen zum Einsatz. Die Ausschlusschromatographie bedient sich dem größenbasierten Ausschluss von unterschiedlichen Molekülen durch eine poröse Matrix. Die Matrix ist ein Gel (Gelchromatographie), welches ein dreidimensionales Porensystem ausbildet und die Moleküle so nach Größe auftrennt. Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in das Porensystem eindringen, daher wandern diese mit der mobilen Phase relativ schnell durch das Gel. Kleinere Moleküle können in die Gelporen eindringen, dadurch ergibt sich ein längere Strecke die die Moleküle durch das Gelbett wandern müssen. Je kleiner die Moleküle, desto länger ist die Verweildauer im Gelbett [103].

Die Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen wurden in ein 50 mL Reaktionsgefäß gesteckt und vor Gebrauch mit 5 mL PBS-Puffer equilibriert. Die Säule musste dann bei 1000 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule unter gleichen Bedingungen erneut äquilibriert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit einem frischen 50 mL

Reaktionsgefäß getauscht und 504,85 μL des Antikörper-Farbstoffgemisches mittig auf die Festphase der Säule pipettiert. Zum Eluieren der Antikörper-Fluoreszenzfarbstoffkonjugate musste die Säule bei $100 \times g$ zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde in ein lichtgeschütztes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Schritt 4: Immun-Fluoreszenzfärbung

Die optimale Atto465-Fluoreszenzfärbung wurde ermittelt, indem verschiedene Konzentrationen des Antikörpers zu 3 mL Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL pipettiert wurden. Die Fluoreszenzmarkierung mit der höchsten Fluoreszenzintensität ist hier exemplarisch beschrieben. Die Zellen wurden bei $400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,5 mL Antikörperlösung mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g/mL}$ resuspendiert und 60 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Zum Entfernen der ungebundenen Antikörper musste das Reaktionsgemisch nach der Inkubation bei $400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert und in 3 mL PBS resuspendiert werden [101].

2.2.11.2. Quantum Dot Funktionalisierung

Das vom Hersteller (Molecular Probes™ [104]) vorgeschriebene Protokoll wurde an die für das System vorgegebenen Parameter angepasst, da das Protokoll eine Fixierung der Zellen vorsieht. Für das hier entwickelte System sollten die Zellen allerdings nicht fixiert isoliert werden können. Daher wurde das Protokoll ohne Fixierung durchgeführt. Weiterhin sieht das Protokoll eine separate Inkubation von Antikörpern und Quantum Dots vor. Um Platz im Probenkarussell und Zeit zu sparen, wurde daher versucht, aus dem ursprünglichen Zwei-Schritt-Protokoll ein Ein-Schritt-Protokoll zu entwickeln.

Zwei-Schritt-Protokoll Um die Quantum Dot-Färbung analysieren zu können, wurden die MCF-Zellen wie in Kapitel 2.2.1.3 trypsiniert. Diese wurden dann auf eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit PBS verdünnt und anschließend mit $2,5 \mu\text{g/mL}$ biotinkoppeltem Antikörper für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei $450 \times g$ für 5 Minuten und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und die Zellen mit einer Lösung aus Quantum Dots (20 nM) gelöst in 6 % BSA/PBS (siehe Tabelle 2.9)

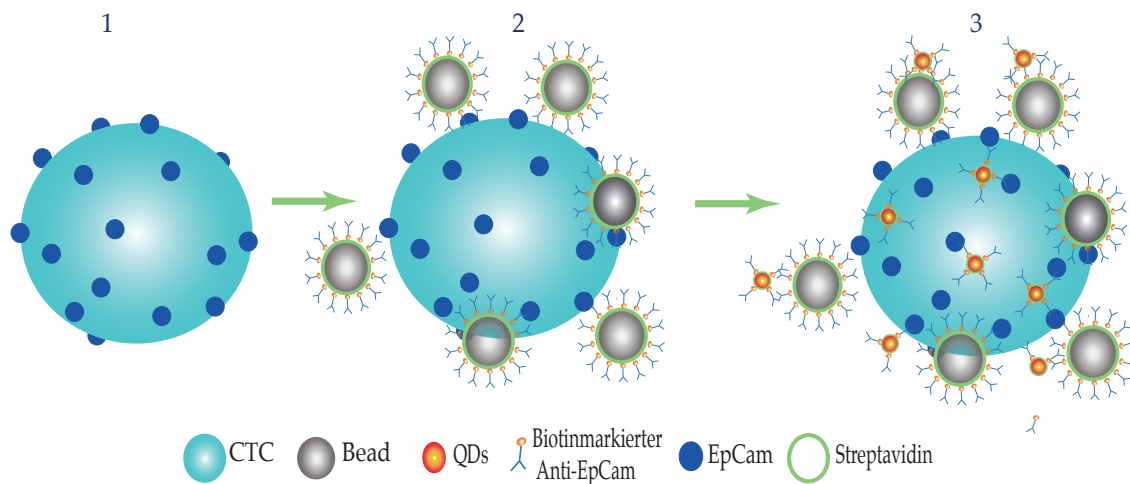


Abbildung 2.17.: Ablauf des Anreicherungs- und Markierungsprozesses der zirkulierenden Tumorzellen mit biotinmarkierten anti-EpCAM Antikörpern, gekoppelt an Streptavidinbeschichtete magnetische Partikel und Quantum Dots.

resuspendiert werden. Die Quantum Dot-Zell-Suspension wurde dann erneut 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran konnten die Zellen analysiert werden.

Ein-Schritt-Protokoll Für die Ein-Schritt-Quantum Dot-Funktionalisierung wurden verschiedene Antikörper und Quantum Dot Konzentrationen getestet. Die beste Kombination hinsichtlich der Fluoreszenzintensität ist hier beispielhaft beschrieben. MCF-7 Zellen (mit oder ohne Magnetischepartikel) wurden in einer Lösung mit 1 µg/mL biotinkoppeltem Antikörper (EpCAM oder Muc1) und QDs (5 nM) für 15 Minuten im Überkopfmischer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder durch 5-minütige Separation, durch Zentrifugation (Zellen ohne Magnetpartikel) oder magnetische Anreicherung (Zellen mit Magnetpartikel) von ungebundenen QDs getrennt und in 0,125 % Xanthan im Ausgangsvolumen resuspendiert. Das scherviskose Xanthan verhindert die Sedimentation der Zellen (siehe Kapitel 2.2.15).

2.2.12. Zelldetektion

Die Zellen wurden mit den oben beschriebenen Methoden magnetisch- und/oder fluoreszenzmarkiert. Die Detektion der Zellen erfolgte mittels BD Accuri C6 oder

dem Prototypen der Detektionseinheit durch die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz. Die eingestellten Parameter sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

2.2.12.1. Messungen mit dem BD Accuri C6

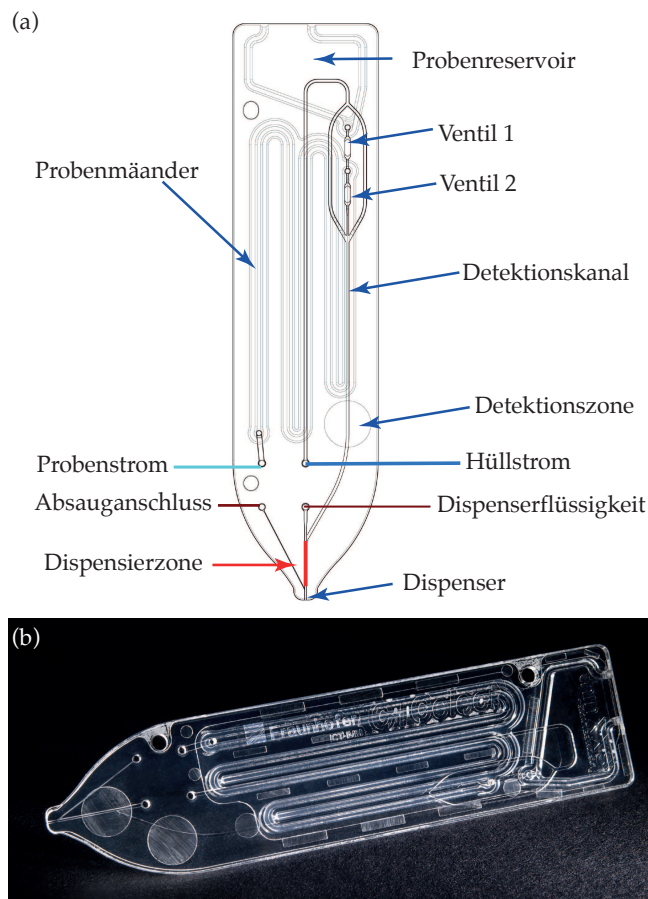


Abbildung 2.18.: (a) Schema und (b) Foto des spritzgegossenen Chips aus TOPAS COC (Cyclic Olefin Copolymer) 8007 mit Probenreservoir, Probenmäander, Detektionskanal, Dispensierzone, Dispenseierausgang und den Ventilen.

(Zellen in 0,125 % Xanthan/PBS) hatte eine Geschwindigkeit von 2 $\mu\text{L}/\text{sek}$. Die

Die Durchführung aller Messungen mit dem BD Accuri C6 Durchflusszytometer fanden unter gleichen Bedingungen statt. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen gemessen mit einem Schwellwert von 80.000 a.u. (arbitrary units/relative Einheiten) Vorwärtsstreulichtintensität (FSC-H) und einer Flussgeschwindigkeit von 66 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Anregung der Zellen erfolgt durch einen 488 nm Laser im Kanal FL2.

2.2.12.2. Messungen basierend auf der Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz

Alle Messungen der Zellen in der Detektionseinheit (siehe Abbildung 2.19) wurden zur besseren Vergleichbarkeit unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Der Hüllstrom

Leistung des 445 nm Lasers wurde auf 80 % (ca 1,1 W) eingestellt. Für einen Testdurchlauf wurde ein Einwegchip (wie in Abbildung 2.18) zu sehen verwendet. Der Chip hat zwei Zuläufe zum Detektionskanal, einen Probenstrom und einen für den Hüllstrom (siehe Abbildung 2.18). Die Maße des Detektionskanals betragen in der Höhe 60 μm und in der Breite 500 μm .

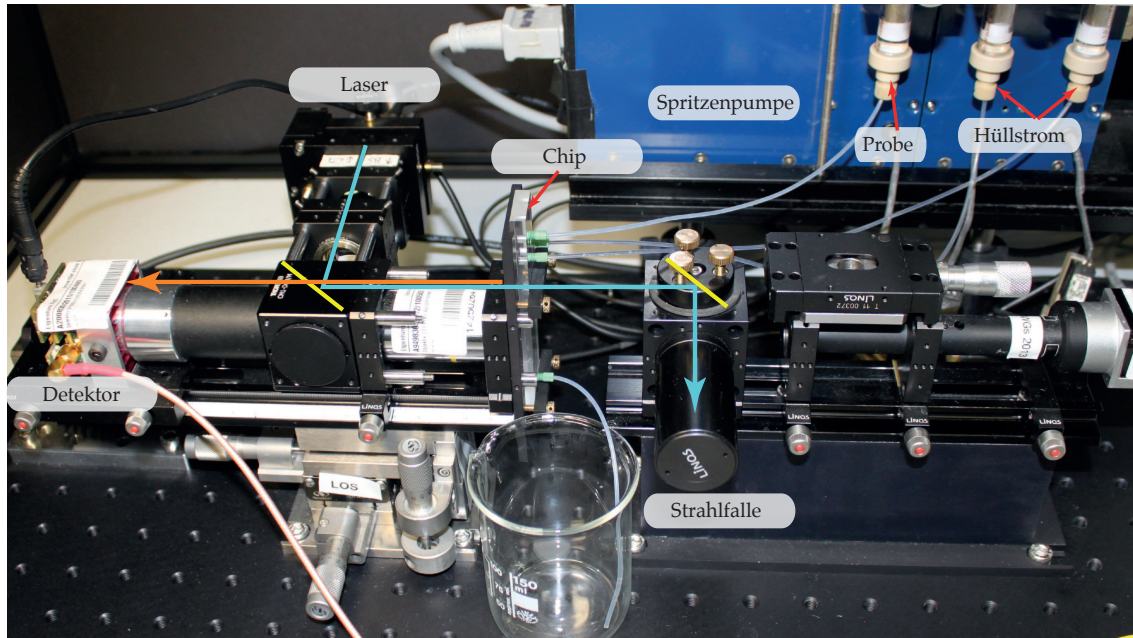


Abbildung 2.19.: Versuchsaufbau der Detektionseinheit basierend auf der Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz. Der 445 nm Laser wird durch einen dichroitischen Strahlteiler (gelbe Linie) auf die modulierte Maske und die Detektionsregion des Chips gelenkt. Der Laserstrahl wird durch einen weiteren dichroitischen Strahlteiler in eine Strahlfalle geleitet. Das Fluoreszenzlicht der passierenden Objekte wird in entgegengesetzter Richtung (orange Linie) durch den Strahlteiler auf den Detektor gelenkt. Der Chip ist über HPLC Anschlüsse mit der Spritzenpumpe verbunden.

2.2.13. Optimierung des Färbepuffers

Im Laufe der Versuche zeigte sich, dass sich durch den 6 % BSA/PBS Puffer während des Färbeprozesses im automatisierten Aufbau Schaum bildet. Damit die Schaumbildung verhindert werden konnte, wurde eine Silicon-Antischaumemulsion (Carl Roth) in verschiedenen Konzentrationen zu dem Färbepuffer hinzugegeben. Da dies die Zellvitalität und den Färbeprozess beeinträchtigen kann, wurden die Zellen nach der Färbung hinsichtlich Vitalität und Fluoreszenzintensität begutachtet. Das Antischaummittel wurde mit 6 % BSA Puffer (siehe Tabelle 2.9) auf die

jeweilige Konzentration (0,0004 %, 0,004 % und 0,04 % Antischaum) titriert. Die Zellen wurden dann für 15 Minuten bei 5 rpm im Überkopfmischer mit dem Puffer inkubiert und anschließend im BD Accuri C6 analysiert (siehe Kapitel 2.2.12.1).

2.2.14. Fluidikablauf

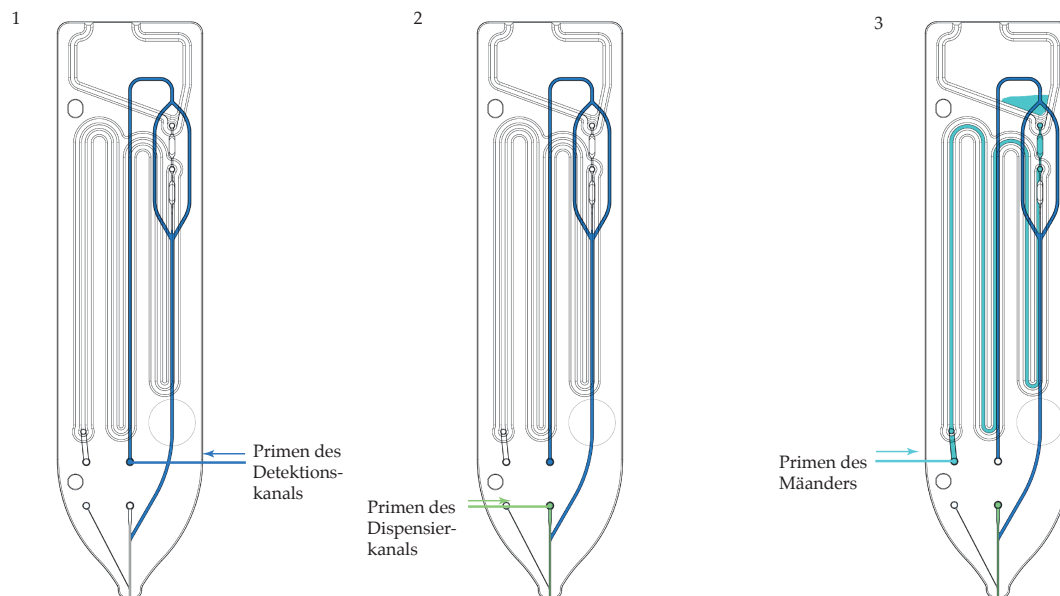


Abbildung 2.20.: Die Schritte 1-3 zeigen das vorbereiten (Primen) des Chips. 1) Priming des Detektionskanals durch PBS. 2) Priming des Dispensierkanals mit PBS 3) Priming des Probenmäanders mit 0,125 % Xanthan/ PBS.

Damit die Detektion im Chip nicht durch Luftblasen gestört wird, muss der Chip vorbereitet werden indem er mit Flüssigkeit luftblasenfrei befüllt wird (*engl. priming*). Dafür wurde PBS mit 360 $\mu\text{L}/\text{min}$ in den Detektionskanal gepumpt wie in Abbildung 2.20 (1) dargestellt. Anschließend konnte über den Dispenseranschluss (siehe Abbildung 2.20 (2)) der Dispensierkanal befüllt werden. Daraufhin erfolgte das Priming des Mäanders mit 0,125 % Xanthan (siehe Abbildung 2.20 (3)) ebenfalls mit 360 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Nachdem die Kanäle des Chips vollständig mit Flüssigkeit befüllt waren (siehe Abbildung 2.21 (4)), wurde durch ein Stößel, bestehend aus einer Teflonkugel das untere Quetschventil (Ventil 2 siehe Abbildung 2.18) des Chips abgedrückt (siehe Abbildung 2.21 (5)) und das Probenreservoir mit 500 μL Probe befüllt. Durch Abdrücken des unteren Quetschventils konnte der Zufluss zum Detektionskanal

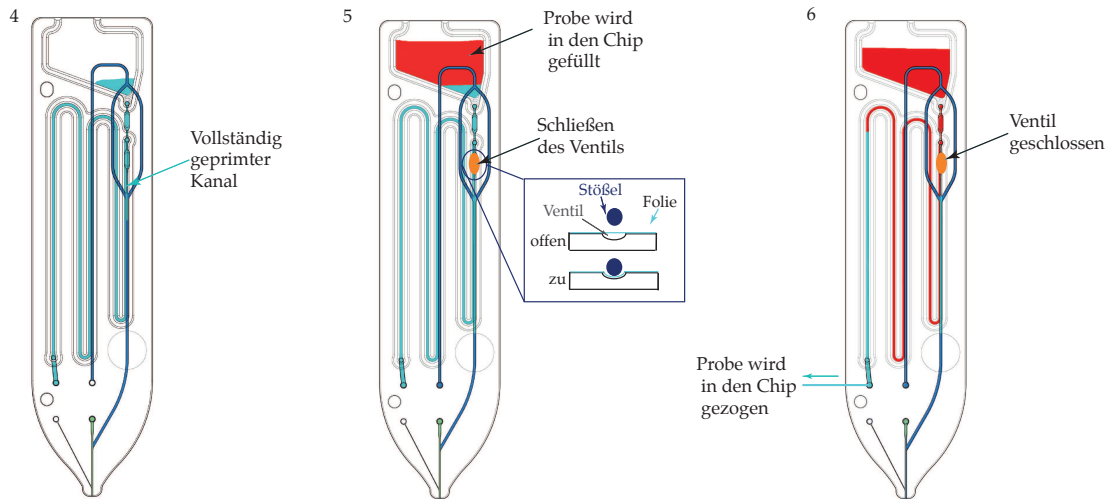


Abbildung 2.21.: Schritt 4-6 Zeigt wie die Probe in den Probenmäander gelangt. (4) Der Detektionskanal und Probenmäander sind vollständig mit Flüssigkeit befüllt. (5) Das Ventil zum Detektionskanal wird verschlossen und (6) die Probe aus dem Probenreservoir in den Mäander gezogen.

verschlossen werden. Daher konnte durch Saugen am Probenmäanderanschluss ein Teil der Probe aus dem Reservoir in den Probenmäander mit $200 \mu\text{L}/\text{min}$ gelangen (siehe Abbildung 2.21 6). Nachdem $330 \mu\text{L}$ der Probe in den Mäander gesogen worden waren, wurde das obere Ventil (Ventil 1 siehe Abbildung 2.18) abgedrückt. Dadurch wurde der Zufluss zum Reservoir verschlossen und die Probe konnte über den Anschluss des Probenmäanders mit $120 \mu\text{L}/\text{min}$ aus dem Probenmäander in den Detektionskanal gedrückt werden. Währenddessen wurde über den Hüllstromanschluss PBS mit $360 \mu\text{L}/\text{min}$ in den Detektionskanal gepumpt, sodass die Probe durch den Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert wurde (siehe Abbildung 2.23 (7)). Nachdem der erste Teil der Probe prozessiert wurde, musste der Druck im Chip über 6 Minuten abgebaut werden, bevor die restliche Probe prozessiert werden konnte.

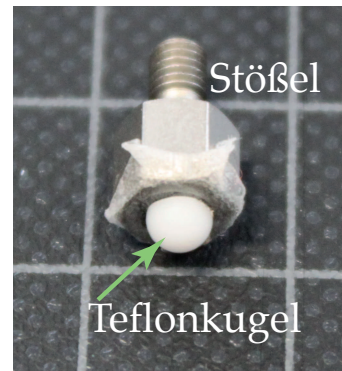


Abbildung 2.22.: Stößel mit einer Teflonhalbkugel zum Abdrücken der Quetschventile

2.2.15. Sedimentationstest mit Xanthan

Die Zellen mussten im Chip in einem Mäander zwischengelagert werden, bevor sie in den Detektionskanal geführt werden konnten.

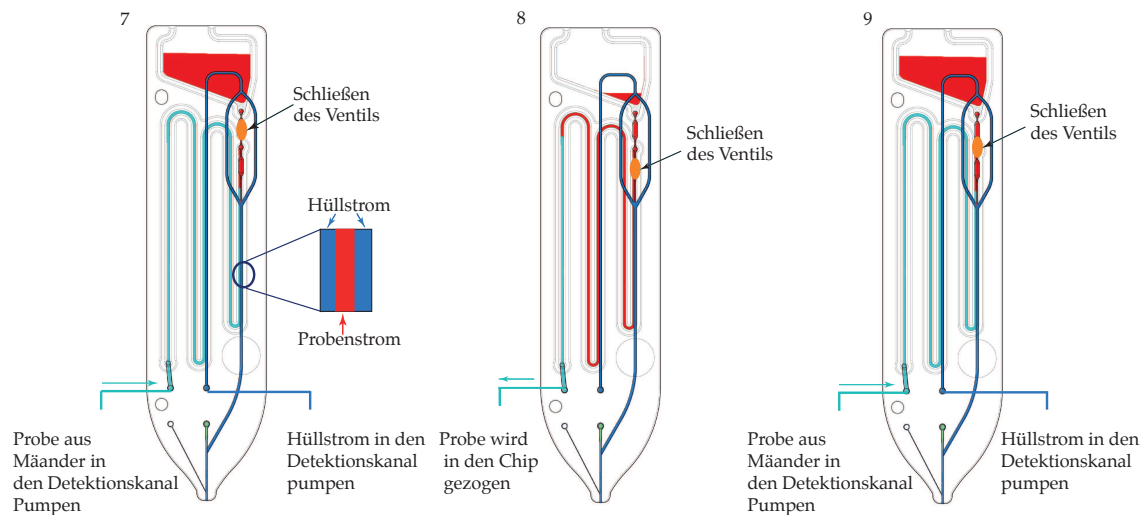


Abbildung 2.23.: Schritte 7-9 stellen dar, wie die Probe in den Detektionskanal gelangt. (7) Das Ventil zum Probenreservoir wird verschlossen und das Ventil zum Detektionskanal geöffnet. Die Probe wird aus dem Mäander in den Detektionskanal gedrückt, während gleichzeitig Hüllstrom in den Probenkanal gedrückt wird. (8) Nachdem der erste Teil der Probe prozessiert wurde, wird das Ventil für den Detektionskanal geschlossen, das Ventil für das Probenreservoir geöffnet und ein weiteres Aliquot der Probe wird in den Mäander aufgezogen. (9) Die restliche Probe wird dann unter den in Punkt (7) beschriebenen Schritten prozessiert.

Da es während dieser Lagerung zu Sedimentation kommen kann, wurde das scherverdünnde Medium Xanthan eingesetzt und wie in Tabelle 2.9 angesetzt. Xanthan ist ein scherverdünndes Medium, wirken keine Scherkräfte auf das Medium besitzt es eine hohe Viskosität und kann so Zellen oder Partikel in Suspension halten. Unter Einwirkung von Scherkräften hat es hingegen eine geringere Viskosität und die Zellen können durch mikrofluidische Kanäle transportiert werden.

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, wurden die MCF-7 Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL CFSE gefärbt. Die Suspension der CFSE gefärbten MCF-7 Zellen wurde dann auf zwei Proben aufgeteilt und anschließend für 5 Minuten bei $400 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend verworfen und die Zellen in gleicher Konzentration in 0,125 % Xanthan in PBS (Probe 1) sowie auch in reinem PBS (Probe 2) resuspendiert werden. Diese Suspension wurde nacheinander in eine 10 mL Glasspritze überführt und in die Spritzenpumpe eingespannt. Für den Hüllstrom wurde PBS verwendet. Die Flussgeschwindigkeit für den Probenfluss wurde auf $2 \mu\text{L}/\text{sek}$ eingestellt, während der Hüllstrom jeweils auf $3 \mu\text{L}/\text{sek}$ eingestellt war. Die Spritzen waren dann eine

Stunde bei Raumtemperatur in der Spritzenpumpe eingespannt und alle 15 Minuten erfolgte eine Messung für 30 Sekunden. Die Zellzahl wurde daraufhin durch die Methode räumlich modulierten Fluoreszenz bei 80 % Laserleistung bestimmt.

2.2.16. Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Um Leukozyten aus Vollblut zu gewinnen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dafür wurde ein 15 mL Reaktionsgefäß mit 3 mL Histopaque-10771 gefüllt. Anschließend wurden 3 mL Blut aus einer 7,5 mL EDTA Monovette entnommen und langsam auf 3 mL Histopaque®-10771 (SigmaAldrich) geschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden dann bei $400 \times g$ für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Histopaque-10771 wirkt während der Zentrifugation wie ein Sieb, je nach Dichte der verschiedenen Blutanteile ist Histopaque-10771 mehr oder weniger durchlässig. Die mononukleären Zellen bleiben nach der Zentrifugation in der Interphase auf dem Ficoll zurück. Diese konnten dann durch die Pipette vorsichtig aufgenommen und in ein frisches 15 mL Reaktionsgefäß mit 10 mL PBS gefüllt und resuspendiert werden. Daraufhin wurden die Zellen erneut bei $250 \times g$ für 10 Minuten und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Die Bestimmung der Leukozytenanzahl erfolgte durch den Zellzähler (CASY Counter), indem 100 μL der Zellsuspension in 10 mL Casyton suspendiert und anschließend gemessen wurden.

2.2.17. Bestimmung der Kreuzreaktionen

Um zu überprüfen, ob die Leukozyten durch Kreuzreaktionen fluoreszenzmarkiert werden können, wurden die Zellen mit QDs inkubiert. Da die hier verwendeten immunomagnetischen Partikel jedoch auch von den QDs markiert werden, musste auch überprüft werden, ob die Leukozyten auch durch die immunomagnetischen Partikel indirekt fluoreszenzmarkiert werden können.

Daher wurde aus einer Vollblutprobe unter Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 2.2.16) Leukozyten isoliert. Die Zellzahl der Leukozyten konnte daraufhin durch den CASY Counter bestimmt werden (siehe Kapitel 2.2.6). Anschließend wurden drei Proben mit jeweils 3 mL und einer Konzentration von 1×10^6 Leukozyten/mL angesetzt. Probe (1) wurde nach Protokoll mit CFSE gefärbt

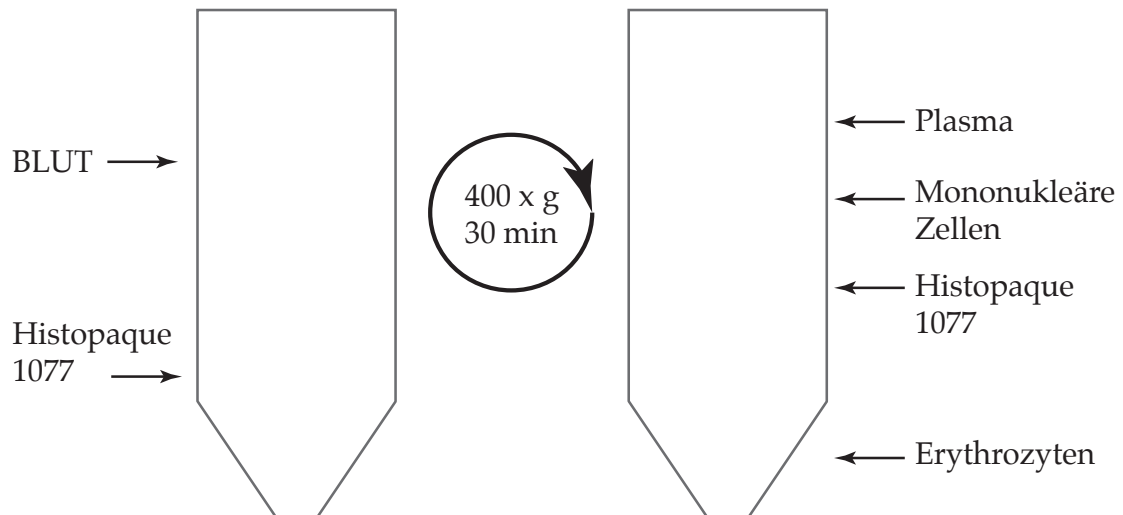


Abbildung 2.24.: Unter Verwendung des Dichtegradienten Histopaque1077 (Sigma-Aldrich, München) können mononukleäre Zellen aus einer Blutprobe isoliert werden. Durch Zentrifugation werden die Erythrozyten vom Plasma und den mononukleären Zellen durch das Histopaque1077 getrennt.

(siehe Kapitel 2.2.2), Probe (2) wurde wie in Kapitel 2.2.11.2 beschrieben mit QDs markiert und Probe (3) wurde vor der Inkubation mit den QDs noch mit 60 μ L immunomagnetischen Partikeln inkubiert.

Anschließend erfolgt eine Messung der Zellen durch die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz unter den in Kapitel 2.2.12.2 genannten Bedingungen.

2.2.18. Bestimmung des Leukozytenhintergrunds

Damit der Beifang an Leukozyten ermittelt werden konnte, wurden zwei 7,5 mL Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe Abschnitt Kapitel 2.2.16) in ihre unterschiedlichen Bestandteile aufgetrennt. Das Plasma der beiden Proben wurde mit einer Pipette vorsichtig entnommen und separat für jede Probe in einem Reaktionsgefäß zwischengelagert. Die mononukleären Zellen wurden in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und wie oben beschrieben (siehe Abschnitt Kapitel 2.2.16) gewaschen. Währenddessen wurde das Histopaque-10771 von den Erythrozyten getrennt und verworfen. Anschließend konnte das Plasma wieder zu den Blutzellen hinzugegeben und durch resuspendieren vermischt werden. Die Leukozyten wurden nach der Aufreinigung mit CFSE gefärbt (siehe Kapitel 2.2.2). Danach konnten die gefärbten Leukozyten zu der einen Probe hinzugegeben

werden, sodass eine 7,5 mL Blutprobe mit CFSE gefärbten Leukozyten zur Anreicherung zur Verfügung stand. Die Leukozyten der zweiten Probe wurden in 7,5 mL PBS resuspendiert, damit die Leukozytenanzahl ohne Aufreinigung durch die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz bestimmt werden konnte.

Die Blutprobe mit den gefärbten Leukozyten wurde im automatisierten Anreicherungsmodul prozessiert unter den in Abschnitt Kapitel 2.2.9.2 aufgeführten Einstellungen. Nach der Aufreinigung konnte die Probe entnommen werden durch die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz analysiert werden. Die Depletion der Leukozyten wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Leukozytendepletion} = \frac{100 \times (\text{Zellzahl/mL vor der Aufreinigung} - \text{Zellzahl/mL nach der Aufreinigung})}{\text{Zellzahl/mL vor der Aufreinigung}}$$

2.2.19. Einstellung des Hüllstroms zur Verringerung der Leukozytenkontamination

Wie schon zuvor dargestellt, ist für die spätere molekulare Charakterisierung der nach der Isolation gewonnenen CTCs die hohe Reinheit eine essentielle Voraussetzung. Beifang bei der Isolation ist von Nachteil für nachfolgende Analysemethoden.

Um dieses Ziel der hohen Reinheit der isolierten CTCs zu erreichen, muss die Wahrscheinlichkeit für Leukozytenbeifang minimiert werden. Für die im vollautomatisierten Gerät eingesetzte Vereinzelnung durch Dispensierung in einzelne Kavitäten einer Mikrotiterplatte bedeutet das konkret, dass sich zum Zeitpunkt des Auswurfs möglichst keine weiteren Zellen in dem Volumen des Probenkanals befinden sollten, das dispensiert wird. Dieses Volumen ist im unteren Bereich des Chips erkennbar (siehe Abbildung 2.18).

Die Beifangwahrscheinlichkeit kann auf einfache Weise durch die Erhöhung des insgesamt durch den Detektionskanal strömenden Volumens verringert werden. Bei der Bestimmung der Beifangwahrscheinlichkeit kann die Anzahl der CTCs vernachlässigt werden, solange deutlich mehr Leukozyten in der Probe sind als CTCs. Eine Erhöhung des Flussvolumens durch einen größeren Hüllstrom vergrößert also die räumliche Trennung zwischen zwei Objekten (CTCs oder Leukozyten) im Detektionskanal. Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines

oder mehrerer Leukozyten im Dispensiervolumen. Jedoch kann der Hüllstrom nicht beliebig vergrößert werden: die Volumen der verbauten Spritzen setzen den möglichen Flussraten für den Hüllstrom nach oben hin Grenzen. Auch die Anpassung des Probenstroms ist nach unten hin begrenzt.

Um den optimalen Wert für die Flussrate des Hüllstroms zu ermitteln, wurde der folgende Zusammenhang betrachtet. Die nach der Aufreinigung in der Probe verbleibenden Objekte sind zufällig im Probenvolumen verteilt und diese Verteilung bleibt auch für die „Serialisierung“ der Probe während des Transports durch den Detektionskanal erhalten. Anschaulich werden alle CTCs und Leukozyten nach der Aufreinigung mit einer zufälligen Verteilung der Abstände durch den Detektionskanal transportiert. Die mittlere Anzahl von Objekten pro Längeneinheit ist über den ganzen Kanal konstant, da durch das Xanthan die Sedimentation verhindert wird. Mit diesen Voraussetzungen wird die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Anzahl von CTCs und Leukozyten unabhängig voneinander in einem festgelegten Teilstück des Kanals vorzufinden, durch die Poisson-Verteilung beschrieben. Über sie kann also berechnet werden, wie wahrscheinlich es ist, zwei oder drei oder vier Objekte zu finden.

Anhand der gemessenen Leukozytenkontamination nach der Aufreinigung und weiterer Parameter wie z.B. den Kanalabmessungen (siehe Tabelle 2.11) wurde mit Hilfe der Poisson-Verteilung die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der ein weißes Blutkörperchen (engl. white blood cell, WBC) zusammen mit einer CTC in eine Isolationskavität dispensiert wird.

Tabelle 2.11.: Parameter die zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit für Leukozytenbeifang verwendet wurden.

Anzahl der CTCs (N_{CTC})	20 Zellen/mL
Verbleibende Leukozyten nach der Aufreinigung (N_{WBC})	8500 Zellen/mL
Probenvolumen nach der Anreicherung (V_{Probe})	1 mL
Hüllstromvolumen ($V_{Hüll}$)	3 mL
Breite des Messkanals (b)	500 μm
Höhe des Messkanals (h)	60 μm
Querschnittsfläche des Messkanals (A)	30.000 μm^2
Flußrate im Messkanal (Q)	480 $\mu\text{l}/\text{min}$
Volumen der Dispensierzone V_D	0,7 μL

Für die Berechnung sei angenommen, dass sich die gesamte Probe in einem Messkanal einheitlichen Querschnittes befindet. Um seine Länge zu berechnen,

muss zunächst die Querschnittsfläche bestimmt werden:

$$A = b \times h$$

Aus dem bekannten Gesamtvolumen $V = V_{\text{probe}} + V_{\text{Hüll}}$ kann dann die (virtuelle) Länge berechnet werden:

$$l = V/A$$

Der mittlere Abstand zwischen zwei Objekten (also CTCs oder Leukozyten) berechnet sich dann einfach über:

$$\bar{d} = l/N \text{ mit } N = N_{\text{CTC}} + N_{\text{WBC}}$$

Um den Grenzabstand zwischen zwei Objekten – also den Abstand den eine Zielzelle zu einer unerwünschten Leukozyte mindestens haben muss – zu bestimmen, wird das mittlere Volumen benötigt, das eine Zelle umgibt (mittleres Umgebungsvolumen):

$$\bar{V}_u = V/N$$

Über das Verhältnis zwischen dem Volumen der Dispensierzone und dem mittleren Umgebungsvolumen kann dann in Verbindung mit dem mittleren Abstand der gesuchte Grenzabstand ermittelt werden:

$$d_G = V_D/\bar{V}_u \times \bar{d} = \dots = V_D/A$$

Der Grenzabstand hängt letztlich rein von der Geometrie des Kanals und der Dispensierzone ab.

Damit sind die beiden für die Berechnung der Kontaminationswahrscheinlichkeit relevanten Parameter bestimmt. Optimierungen können erfolgen durch eine Änderung der Verdünnung (d.h. Änderung des Hüllstromvolumens) sowie der Flußrate. Dabei sollte die Strömungsgeschwindigkeit im Kanal und die Gesamt-messzeit jedoch in einem praktikablen Rahmen bleiben. Die Messdauer berechnet sich über:

$$T = V/Q$$

3. Ergebnisse

Im ersten Teil des Kapitels wird die automatisierte magnetische Anreicherung der MCF-7 Zellen durch verschiedene Anreicherungsverfahren untersucht. Die Methoden wurden bezüglich der Vitalitätsraten der MCF-7 Zellen vor und nach dem Anreichern bewertet. Anschließend wurden die Fangeffizienzen von unterschiedlichen magnetischen Partikeln in Blut und in Medium im Standardversuch ermittelt. Die Magnetpartikel mit der höchsten Fangeffizienz wurden anschließend einem Systemtest im halb-automatisierten und automatisierten Anreicherungsmodul unterzogen.

Der zweite Teil des Kapitels behandelt die Optimierung der Fluoreszenzfärbung. Die Fluoreszenzfärbung musste hinsichtlich der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörperkonzentrationen, Inkubationspuffer und -zeiten auf den vorhandenen Laseraufbau und auf das Anreicherungsmodul angepasst werden. Der letzte Teil zeigt die Ergebnisse der Detektion von MCF-7 Zellen nach einer vollständig automatisierten Anreicherung.

3.1. Automatisierte immunomagnetische Zellanreicherung

Die Fangeffizienz des automatisierten Zellanreicherungssystems spielt eine entscheidende Rolle. Aufgrund dessen wurden verschiedene technische Anreicherungsverfahren getestet. Die Methoden wurden bezüglich des Vitalitätsverlustes der Zellen, bedingt durch die Art der Anreicherung begutachtet. Neben der technischen Realisierung, wurden auch verschiedene magnetische Partikel getestet und optimiert.

3.1.1. Auswahl des Anreicherungssystems

Eine Aufreinigung möglichst ohne Vitalitätsverlust der Zellen ist essenziell, da ein Zellverlust aufgrund der geringen Anzahl der CTCs zu einem falsch negativen Ergebnis führen kann. Daher wurden drei technische Lösungen zur Zellanreicherung entwickelt, die zuerst bezüglich des Vitalitätsverlustes charakterisiert wurden. Getestet wurde ein mit Silikonkuppen beschichteter Rührer, welcher die Durchmischung der Zell-Partikel-Suspension über Rotation ermöglicht. Die Silikonkuppen fungieren dabei als Paddel. Des Weiteren wurde ein Exzenterbasiertes System, welches über Vibration die Suspension durchmischt und ein Pumpen-basiertes System, das durch wiederholtes Aspirieren und Dispensieren der Magnetpartikel- und Zellesuspension vermischt (siehe Seite Abbildung 2.1 auf Seite 41 und Abbildung 2.9 auf Seite 47), getestet.

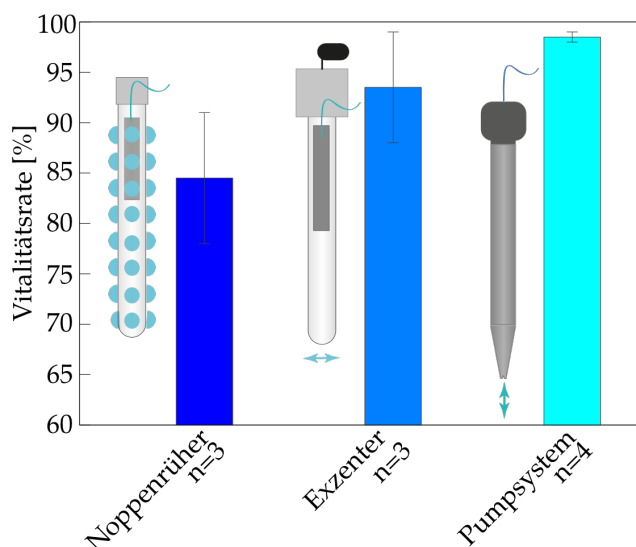


Abbildung 3.1.: Verbleibende prozentuale Zellvitalität nach 20-minütigem Mischen durch verschiedene Anreicherungssysteme, bezogen auf die Vitalität vor dem Mischen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, während die „n“ die Anzahl der Versuche angibt.

In Abbildung 3.1 sind die Vitalitätsverluste der Zellen nach 20-minütigem Durchmischen in Bezug auf die Vitalitätsrate vor dem Mischen dargestellt. Die Vitalität wurde dabei jeweils vor und nach 20-minütiger Durchmischung durch den CASY Counter bestimmt. Die Daten spiegeln im Mittel die Vitalitätsraten von jeweils vier verschiedenen Messungen wieder. Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, findet der größte Vitalitätsverlust bei der Durchmischung mit dem Noppenrührer statt. Bei dieser Methode nimmt die Vitalität um 16 % ab. Ein geringerer Vitalitätsverlust findet bei der Homogenisierung mittels Exzenter statt. Dort sinkt die Vitalität der Zellen um 6,6 %. Der geringste Vitalitätsverlust wurde mit dem Pumpsystem erreicht, hier sinkt die Vitalität nur um 1,5 %. Da das Pumpsystem

die Zellen mit dem geringsten Vitalitätsverlust mischen konnte, wurde dieses System ausgewählt, um die Anreicherung zu automatisieren.

Außerdem wurden nach der Anreicherung auf der Oberfläche von Noppenrührer und Excenter unlösliche Magnetpartikelrückstände festgestellt Abbildung 3.2. Die Rückstände können zu einer niedrigeren Wiederfindungsrate führen, da magnetpartikelgebundene Zellen eventuell ebenfalls nicht mehr gelöst werden könnten.

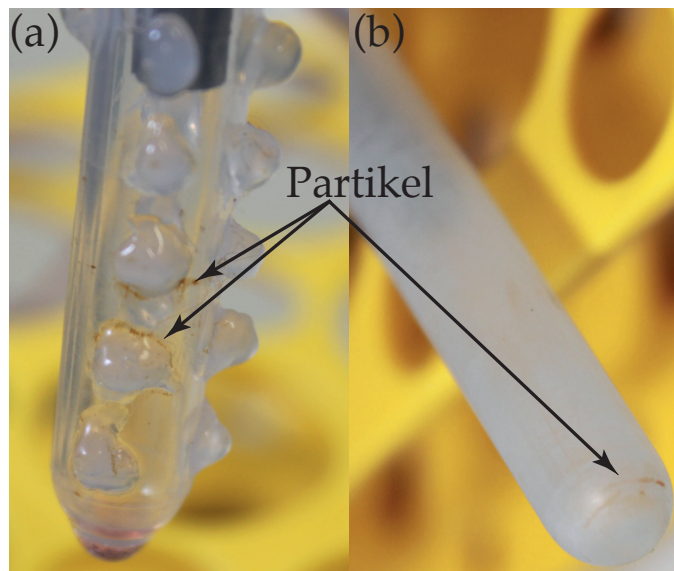


Abbildung 3.2.: Ablagerungen der magnetischen Partikeln auf dem Noppenrührer (a) und dem Exzenter (b) nach einer Aufreinigung.

3.1.2. Fangeffizienz unterschiedlicher Magnetpartikel

Die in der Tabelle 2.4 aufgelisteten magnetischen Partikel wurden für die in diesem Kapitel beschriebenen Messreihen verwendet und hinsichtlich der Sensitivität miteinander verglichen. Die Magnetpartikel wurden zuerst mit Anti-EpCAM Antikörpern gekoppelt und dann im Standardversuch (siehe Kapitel 2.2.4 auf Seite 39) mit RPMI-Medium und anschließend in Vollblut getestet. Standardmäßig wurden für die Fangversuche 20 CFSE gefärbte MCF-7 Zellen in das jeweilige Medium gegeben und mit 20 μL Magnetpartikel/mL Medium inkubiert.

Die höchste Fangrate (siehe Abbildung 3.3) mit 85 % erreichten die mit anti-EpCAM gekoppelten 1 μm Streptavidinpartikel im Standardversuch mit Zellkulturmedium. Im Vergleich dazu konnten die 4,5 μm großen Maus anti-Human

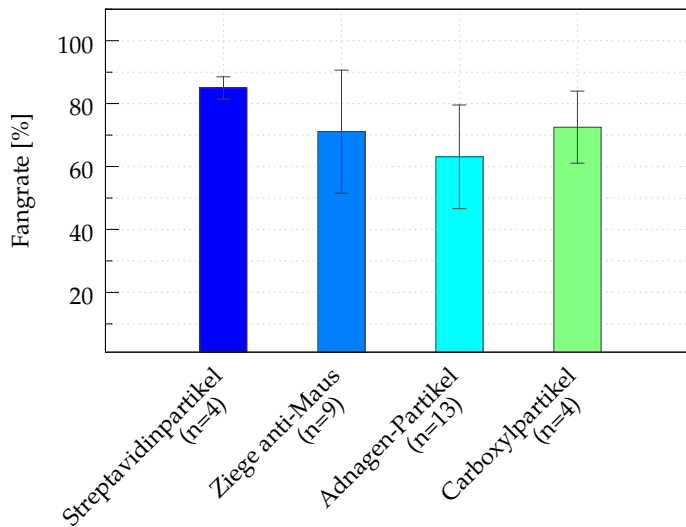


Abbildung 3.3.: Prozentuale Fangraten der 1 μm Streptavidinpartikel, der 4,5 μm Ziege anti Maus (ZAM) Partikel, kommerziell erhältlichen Adnagen-Partikeln und der 500 nm ademtech Carboxylpartikel. Alle zu koppelnde Magnetpartikel wurden mit einem anti-EpCAM Antikörper funktionalisiert. Die Fehlerbalken geben die Streuung zwischen verschiedenen Messungen wieder während „n“ der Anzahl der Versuche entspricht.

gekoppelten Ziege anti-Maus Partikel (ZAM) nur 71 % der Zellen anreichern und zeigten außerdem eine schlechte Reproduzierbarkeit. Die Adnagen-Partikel konnten 63 % der Zellen fangen und die 500 nm anti-EpCAM gekoppelten Carboxylpartikel erreichen eine Fangrate von 73 %.

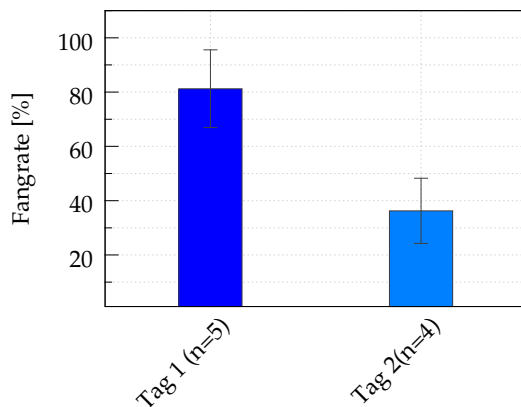


Abbildung 3.4.: Altersabhängigkeit der Fangrate der funktionalisierten ZAM-Partikel. Die Fehlerbalken geben die Streuung zwischen verschiedenen Messungen wieder, während „n“ die Anzahl der Versuche angibt.

Da sich in diesen Experimenten gezeigt hat, dass die Streptavidinpartikel mit dem biotinylierten anti-EpCAM Antikörper die MCF-7 Zellen mit der größten Reproduzierbarkeit und Effizienz anreichern konnten, wurde die Funktionalisierung der Magnetpartikel mit Antikörpern für die weitere Verwendung optimiert.

Die Ziege anti-Maus Partikel zeigten eine hohe Abweichung der Fangraten in Abhängigkeit vom Alter der Funktionalisierung der Magnetpartikel mit den Antikörpern. In Abbildung 3.4 sind exemplarisch Versuche zur Stabilität der Magnetpartikel dargestellt. Die

Magnetpartikel wurden mit Antikörpern funktionalisiert und am Tag der Funktionalisierung im Standardversuch auf deren Wiederfindungsraten untersucht. Anschließend wurden die Magnetpartikel bei 4 °C im Kühlschrank verwahrt und am folgenden Tag erneut unter gleichen Bedingungen getestet. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen liegen die Fangraten am Tag der Funktionalisierung bei 81 % während die Fangrate am Tag nach der Funktionalisierung auf 36 % sinkt.

3.1.3. Optimierung der Magnetpartikelfunktionalisierung

Bei den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass die Streptavidinpartikel durch das vom Hersteller vorgegebene Protokoll (20 µg/mL Antikörper) zu Aggregatbildung neigten (siehe Abbildung 3.5). Um die Aggregatbildung zu eliminieren, wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen getestet. Neben den Konzentrationen wurden die Magnetpartikel auch mit Biotin geblockt, um mögliche freie Bindungsstellen zu besetzen.

Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, haben alle Magnetpartikel im Medium (eingefärbte Balken) eine höhere Fangrate als im Blut (schraffierte Balken). Mit einer geringen Antikörperkonzentration von 10 µg/mL konnte eine Fangrate von 77 % im Medium und 65 % im Blut erreicht werden. Erhöht man die Konzentration auf 20 µg/mL, kann die Fangrate im Medium um 8 % gesteigert werden. Durch die weitere Erhöhung auf 30 µg/mL konnte ein weiterer Anstieg auf 90 % in Medium und 74 % im Blut gemessen werden. Die Aggregatbildung konnte dadurch jedoch nicht vermieden werden. Erst durch das Blocken mit Biotin wurde die Aggregatbildung vermieden.

(a) (b)

Abbildung 3.5.: (a) Aggregatbildung der Streptavidinpartikel nach einer Kopplung mit 20 µg/mL biotinkoppelten anti-EpCAM Antikörper ohne anschließendes Blocken mit Biotin. Abbildung (b) homogen gelösten Streptavidinpartikel nach einer Inkubation mit biotinkoppelten anti-EpCAM Antikörpern und anschließendem Blocken mit Biotin.

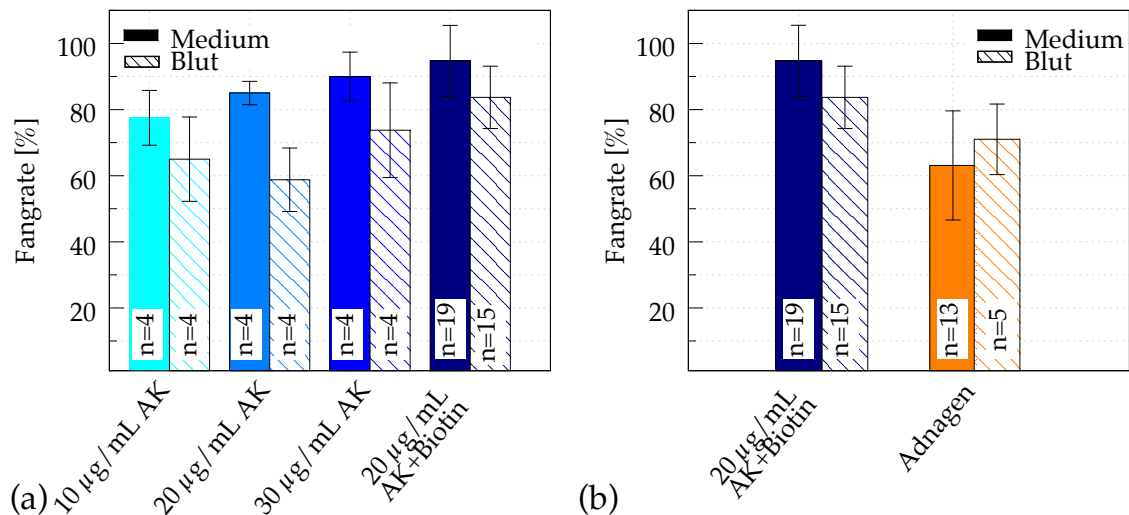


Abbildung 3.6.: Abbildung (a) Zeigt die Fangeffizienz im Standardversuch der Streptavidinpartikel in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kopplungsprotokollen. Abbildung (b) Zeigt die ermittelte Fangeffizienz im Standardversuch von kommerziell erhältlichen Adnagen-Partikel und den biotingeblockten Partikel in Medium und Blut. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, während „n“ die Anzahl der Versuche angibt.

Der Vergleich der Streptavidinpartikel mit den kommerziell erhältlichen Adnagen-Partikel zeigt, dass die Adnagen-Partikel eine durchschnittlich schlechtere Fangrate haben. Im Medium erreichen die Adnagen-Partikel 63 %, während sie in Blut 71 % der Zellen anreichern können. Die biotingeblockten Streptavidinpartikel wiesen hingegen nach der Optimierung eine Fangrate von 95 % im Medium und 84 % im Blut auf.

3.1.4. Optimierung der Flüssigkeitsaufnahme

Um die Probe vollständig in die Pipettenspitze aufnehmen zu können, muss die Pipettenspitze bis zum Boden des Reaktionsgefäßes gefahren werden. Durch den dichten Kontakt der Pipettenspitze mit dem Boden des Reaktionsgefäßes kommt es zu einem Unterdruck im Pipettiersystem. Wird die Pipettenspitze anschließend aus dem Reaktionsgefäß herausgefahren, löst sich der Unterdruck abrupt und Luft wird in die Pipettenspitze gesogen. Durch die einströmende Luft entstehen Blasen in der Pipettenspitze und die Flüssigkeit kann nicht optimal aufgenommen werden werden, exemplarisch dokumentiert in Abbildung 3.7 (a). Im Reaktionsgefäß bleiben circa 100 µl Flüssigkeit zurück, in der sich auch seltene Zellen befinden

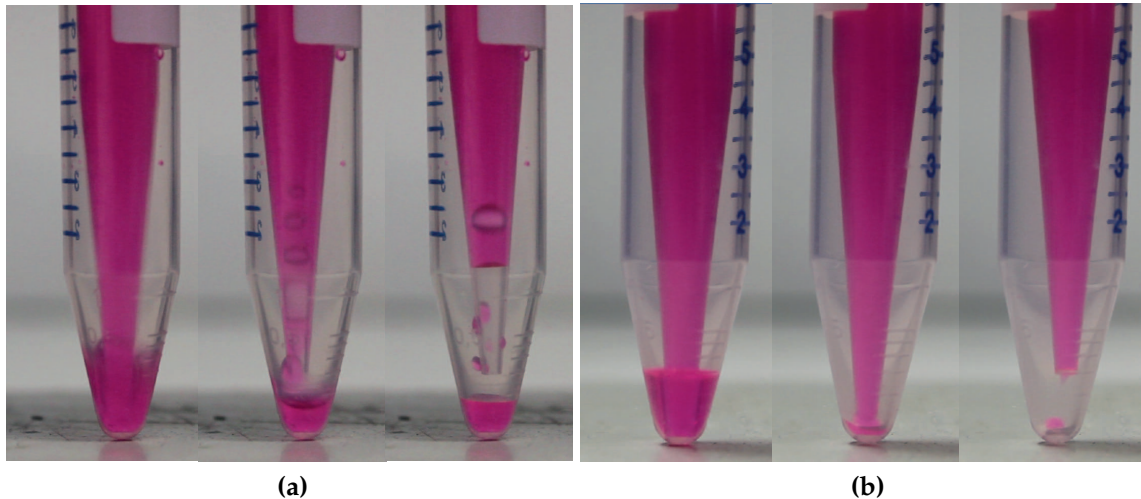


Abbildung 3.7.: Flüssigkeitsaufnahme der nicht modifizierten Pipettenspitze (a) im Vergleich zur eingekerbten Pipettenspitze (b).

können. Um diese Fehlerquelle zu verhindern, wurde die Pipettenspitze eingekerbt. Durch die Einkerbung der Pipettenspitze konnte eine Flüssigkeitsaufnahme ohne Unterdruckaufbau in der Pipette erreicht werden. Die durch den Unterdruck entstandenen Blasen konnten vermieden und die Flüssigkeitsaufnahme optimiert werden, wie in Abbildung 3.7 (b) gezeigt. Die verbleibende Flüssigkeit hat nun ein Volumen unter 5 μL .

3.1.5. Systemtest mit Streptavidinpartikel

Da die Streptavidinpartikel im Standardversuch die höchste Fangeffizienz gezeigt haben, wurden diese einem Systemtest unterzogen (siehe Abbildung 3.8), bei dem die Magnetpartikel zuerst im halb-automatisierten Anreicherungsmodul getestet wurden. Bei diesem System wurde die Durchmischung mit Hilfe einer Schlauchpumpe realisiert, die restlichen Einstellungen und Prozessschritte (Pufferwechsel, Magnet und Ventilposition) wurden per Hand eingestellt. In dem halb-automatisierten System konnte eine Fangeffizienz von 73 % erreicht werden. Bei dem voll-automatisierten System wurde die Schlauchpumpe durch eine Spritzenpumpe ersetzt, um die pulsierende Bewegung der Schlauchpumpe zu eliminieren. Im voll-automatisierten System musste das Gerät nur noch mit den Waschpuffern und der Probe bestückt werden. Die restlichen Schritte wurden voll-automatisiert durchgeführt. Dadurch konnte die Fangeffizienz auf 89 % gesteigert werden.

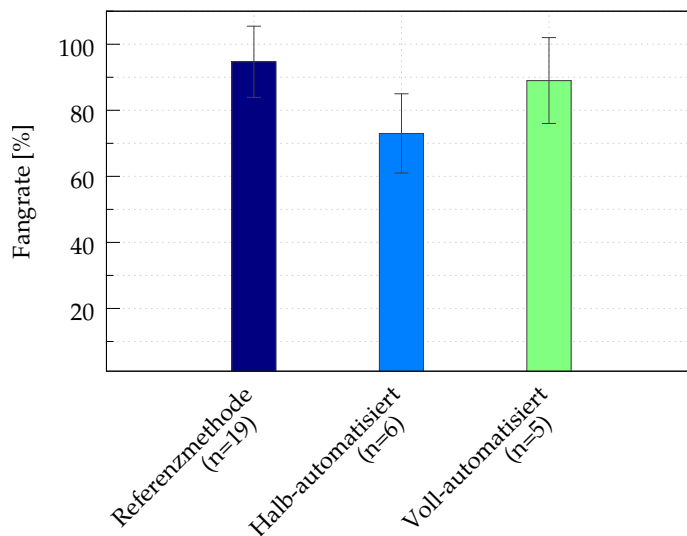


Abbildung 3.8.: Magnetische Anreicherung von MCF-7 Zellen mittels Streptavidinpartikel in unterschiedlichen Systemen. Die Magnetpartikel wurden im Standardversuch, im halb-automatisierten System und im voll-automatisierten System in Medium getestet. Die Fehlerbalken zeigen die dazugehörige Streuung, berechnet auf Basis der Standardabweichung.

3.1.6. Pufferoptimierung

Um die Fangeffizienz weiter steigern zu können, wurden verschiedene Waschpuffer getestet. Zum Einsatz kam ein PBS/0,1 % BSA-Puffer, RPMI Medium und ein EDTA-FCS-PBS Puffer. Alle Puffer wurden wie in Tabelle 2.9 beschrieben angesetzt und im Standardversuch mit Vollblut (Kapitel 2.2.4), MCF-7 Zellen und EpCAM gekoppelten Streptavidinpartikel getestet.

In Abbildung 3.9 sind Ergebnisse der Experimente zur Ermittlung der Fangrate in verschiedenen Waschpuffern dargestellt. Wie zu sehen, besitzt der PBS+2 nM EDTA+20 %-FCS-Puffer mit 92,1 % und einer Standardabweichung von 3,7 % die höchste Fangrate mit der niedrigsten Standardabweichung. Der PBS/BSA-Puffer erreicht eine Fangrate von 86 % und das RPMI Medium eine Fangrate von 81 %. Da der EDTA/FCS Puffer der Puffer mit der höchsten Fangrate im Standardversuch mit Blut war, wurde dieser im automatisierten Anreicherungssystem getestet.

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, kann die Fangrate im voll-automatisierten System mit dem EDTA/FCS-Puffer auf 96 % gesteigert werden. Im Vergleich zum PBS/0,1 % BSA-Puffer ist das eine Steigerung um 7 %.

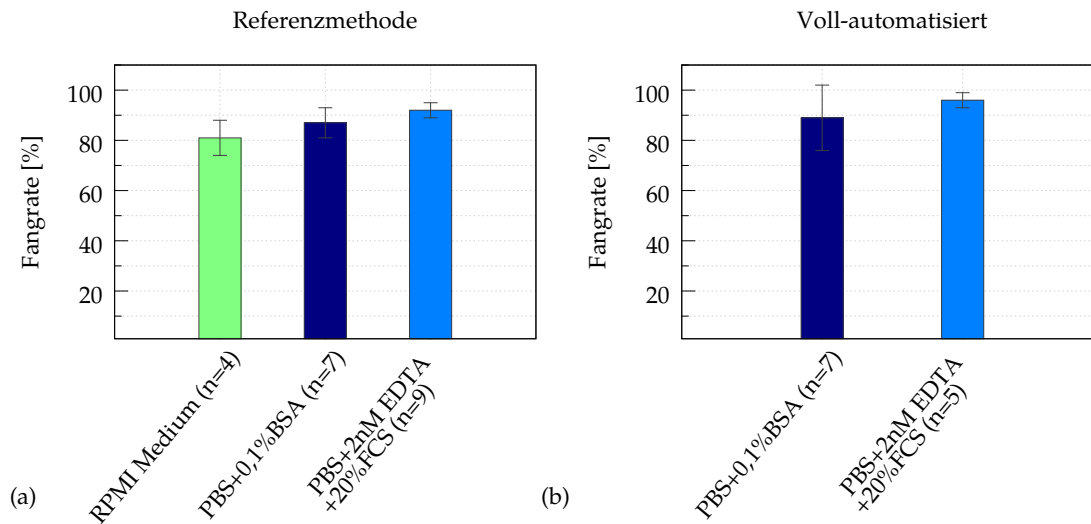


Abbildung 3.9.: Fangrate der magnetischen Streptavidinpartikel unter Verwendung von verschiedenen Waschpuffern. (a) Im Standardversuch wurde RPMI Medium, PBS/BSA-Puffer und PBS+2 nM EDTA+20 % FCS Puffer getestet. (b) Im voll-automatisierten System wurde der PBS/BSA-Puffer und PBS+2 nM EDTA+20 % FCS Puffer in Vollblut getestet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, während „n“ die Anzahl der Versuche angibt.

3.2. Verminderung der Zellverluste

Um die Zellen detektieren zu können, werden die Zellen nach der Anreicherung in einen mikrofluidischen Chip überführt (siehe Abbildung 2.18 auf Seite 60). Die Zellen werden zuerst ins Probenreservoir überführt, um anschließend ein Aliquot in den Probenmäander ziehen zu können (siehe Fluidikplan Abbildung 2.20, Abbildung 2.21 und Abbildung 2.23). In der Zeit, in der der erste Teil der Probe prozessiert wird, muss die restliche Probe im Probenreservoir zwischengelagert werden. Während verschiedener Experimente stellte sich heraus, dass die MCF-7 Zellen während der Lagerung im Probenreservoir zu Sedimentation neigen, siehe Seite 60 Abbildung 2.18. Dies hat zu Folge, dass die abgelagerten Zellen sich nur schwer wieder lösen lassen und im Chip zurück bleiben. Um dies zu verhindern, wurde das scherviskose Additiv Xanthan eingesetzt.

Exemplarisch ist dazu eine Messung von CFSE gefärbten MCF-7 Zellen dargestellt, welche in 1xPBS sowie in 0,125 % Xanthan/1xPBS resuspendiert wurden. Die jeweilige Suspension wurde diese in eine Spritze überführt und in die Spritzenpumpe der Detektionseinheit eingespannt. Die Zellen wurden daraufhin 60

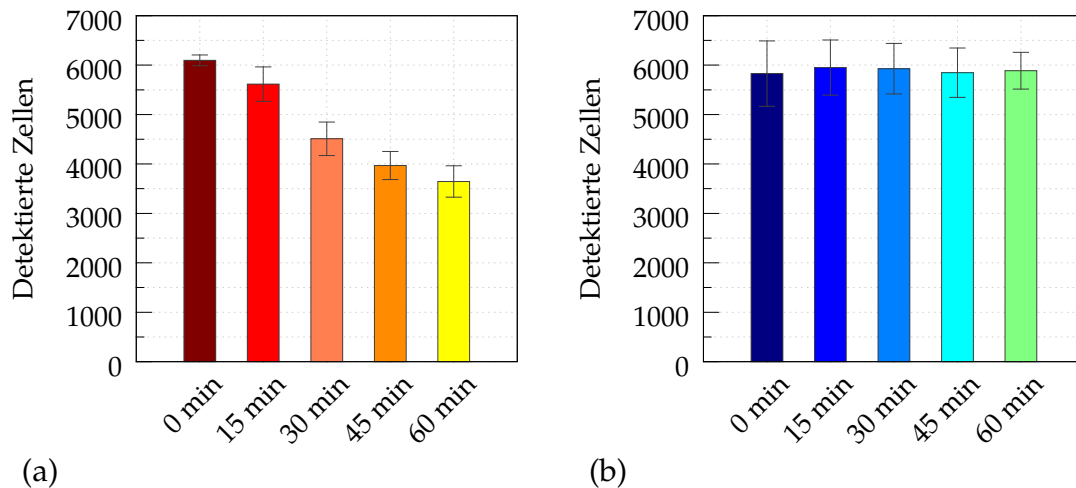


Abbildung 3.10.: Sedimentationsverhalten von MCF-7 Zellen in PBS und Xanthan. a) Sedimentation von MCF-7 Zellen in RPMI Medium und b) Sedimentationsverhalten von MCF-7 Zellen in 0,125 % Xanthan/1xPBS über einen Zeitraum von 60 Minuten. Beide Messungen wurden im Doppelversuch durchgeführt.

Minuten in der Spritze zwischengelagert. Alle 15 Minuten wurde aus dieser Spritze für kurze Zeit Probe in das fluidische System abgegeben und mit der Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz gemessen. Die dabei im Doppelversuch erkannten Zellzahlen sind abhängig von der Dauer der Zwischenlagerung in der Spritze (siehe Abbildung 3.10). Wie man in Abbildung 3.10 a) erkennen kann, nimmt die Zellzahl bei einer Lagerung über 60 Minuten in PBS um 40 % ab, d.h. 40 % der Zellen sind sedimentiert, während die Zellzahl bei einer Lagerung für 60 Minuten in 0,125 % Xanthan/1xPBS konstant bleibt.

3.3. Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung der Zellen wird nach der Anreicherung der Zellen realisiert und muss spezifisch die seltenen Tumorzellen markieren. Um eine optimale Fluoreszenzmarkierung voll automatisiert durchzuführen, wurden deshalb verschiedene Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe getestet. Beide Reagenzien wurden hinsichtlich der eingesetzten Konzentration, der Inkubationszeit und dem Protokollablauf optimiert.

3.3.1. Fluoreszenzintensität verschiedener Fluoreszenzkopplungen

Die hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden jeweils mit monoklonalen Maus anti-Human EpCAM und monoklonalen Maus anti-Human Muc1 Antikörpern getestet.

In Abbildung 3.11 sind exemplarisch die Fluoreszenzintensitäten von drei Zellfärbungen dargestellt. Diese Messreihe wurde im Prototypen der Detektionseinheit durchgeführt. Die mit CFSE (5 μ M) gefärbten Zellen weisen die höchste Fluoreszenzintensität mit 0,07 [a.u.] auf. Da diese Zellen jedoch nicht mehr für molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden können, diente diese Färbung nur als Positivkontrolle.

Der Atto 465-gekoppelte anti-Muc1 Antikörper wurde zuvor in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, in dieser Messung wurde 1 μ g/mL gekoppelter Antikörper eingesetzt. Des Weiteren wurde eine Quantum Dot-Färbung durchgeführt, bei der die Zellen zuerst mit 2,5 μ g/mL Biotin markierten anti-EpCAM inkubiert und anschließend mit 20 nM streptavidinbeschichteten 625 nm Quantum Dots markiert wurden.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Färbeprozesse, zeigt sich, dass die Quantum Dot-markierten Zellen mit 0,007 [a.u.] eine höhere Fluoreszenzintensität besitzen als die Atto 465-markierten Zellen, die eine Fluoreszenzintensität von circa 0,0015 [a.u.] besitzen. Da die QD markierten Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität gezeigt haben, wurde dieses Kopplungsverfahren weiter optimiert und in den folgenden Versuchen verwendet.

3.3.2. Fluoreszenzintensitäten verschiedener Antikörper-basierter Oberflächenmarkierungen

Die weiteren Optimierungen der Fluoreszenzfärbung wurde in dem kommerziell erhältlichen Durchflusszytometer AccuriTM C6 von BD durchgeführt. Mit dem Durchflusszytometer wurde überprüft, welcher der tumorassoziierten Oberflächenantikörper zu einer höheren Fluoreszenzintensität führt. Für diese Tests wurden MCF-7 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von biotinmarkierten anti-Muc1 und anti-EpCAM Antikörper inkubiert und mit Quantum Dots

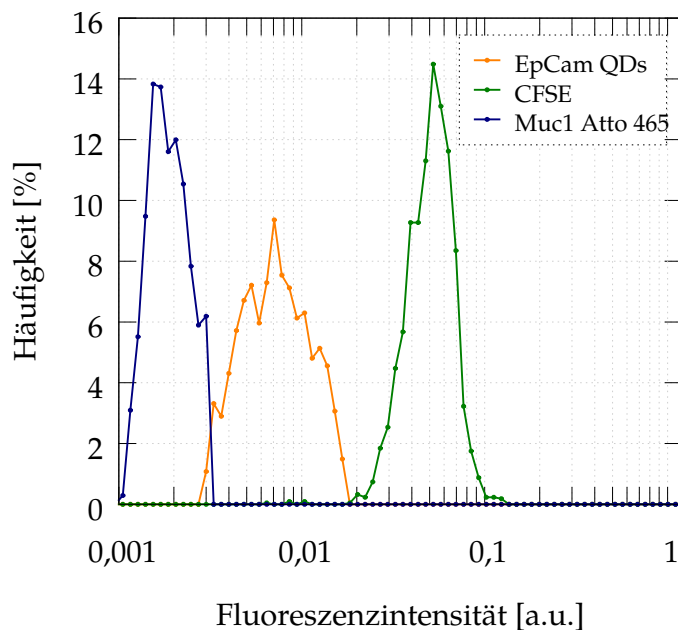


Abbildung 3.11.: In der Detektionseinheit gemessene Fluoreszenzintensitäten von unterschiedlich angefärbten MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden mit CFSE, Atto 465-gekoppeltem monoklonalen anti Muc1 Antikörper und mit biotinmarkiertem monoklonalen anti-EpCAM Antikörper und 625 nm Quantum Dots angefärbt.

gekoppelt. Es wurde jeweils eine 300 μL Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL angesetzt. Exemplarisch ist eine Messung in Abbildung 3.12 dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass die anti-Muc1 gekoppelten Zellen schwach fluoreszieren. Die Antikörperkonzentration mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeigt im Vergleich zu den ungefärbten Zellen keinen Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Erst bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erfolgt ein leichter Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von 728 [a.u.] (ungefärbte Zellen) auf 900 [a.u.].

Vergleicht man diese mit den anti-EpCAM inkubierten MCF-7 Zellen, ist zu erkennen, dass die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Zellen weit über der Eigenfluoreszenz der ungefärbten Zellen liegen. Die anti-EpCAM-markierten Zellen erreichen bei den unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen eine Fluoreszenzintensität im Bereich zwischen $2,43 \times 10^4$ und $2,48 \times 10^4$ [a.u.]. Des Weiteren zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensität der Zellen mit abnehmender Antikörperkonzentration des anti-EpCAM Antikörpers steigt. Da die Fluoreszenzmarkierung durch den anti-EpCAM Antikörper eine höhere Fluoreszenzintensität erreicht, wurde dieser Antikörper in den folgenden Versuchen verwendet und weiter optimiert.

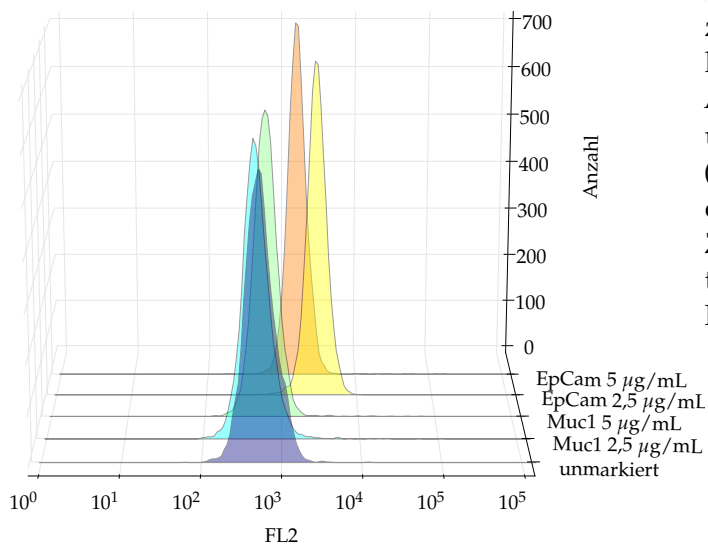


Abbildung 3.12.: Fluoreszenzintensität der MCF-7 Zellen im Fluoreszenzkanal FL2 in Abhängigkeit vom Antikörper und dessen Konzentration (a) Fluoreszenzintensitäten der anti-Muc1 gefärbten MCF-7 Zellen (b) Fluoreszenzintensitäten der anti-EpCAM gefärbten MCF-7 Zellen

3.3.3. Quantum Dot-Konzentration

Neben dem Vergleich von verschiedenen Antikörpern und deren Konzentrationen, wurden verschiedene Konzentrationen an Quantum Dots bei gleich bleibender Antikörperkonzentration getestet. In Abbildung 3.13 ist die Fluoreszenzintensität der Zellen in Abhängigkeit von der QD Konzentrationen dargestellt. Die Aufnahme der Messung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Durchflusszytometer.

Es zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensitäten der QD Konzentrationen 20 nM, 10 nM und 5 nM im Bereich von circa $2,09 \times 10^4$ und $2,03 \times 10^4$ [a.u.] liegen. Nur bei einer QD Konzentration von 1 nM liegt die Fluoreszenzintensität um circa das 1,7-fache unter der Fluoreszenzintensität der anderen Konzentrationen. Da die Fluoreszenzunterschiede zwischen den verschiedenen QD Konzentrationen gering waren, wurde für die weiteren Versuche eine QD Konzentration von 5 nM verwendet, um den Bedarf an von QDs zu minimieren.

3.3.4. Zeitliche Optimierung des Protokolls

Neben der Optimierung von Verbrauchsmaterialien spielt auch die Prozesszeit eine große Rolle bei automatisierten Systemen. Daher wurden die Protokolle bezüglich der Prozesszeit optimiert, indem Inkubationsschritte zusammengefasst und verkürzt wurden.

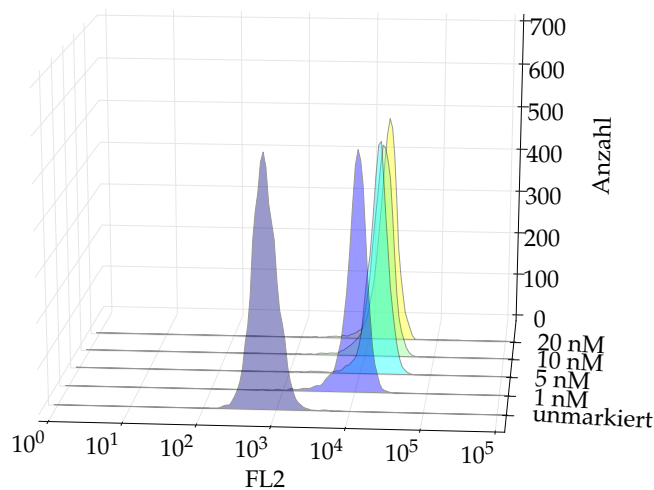


Abbildung 3.13.: Fluoreszenzintensität von MCF-7 Zellen in Abhängigkeit von der Quantum Dot Konzentration. Die Fluoreszenzfärbung wurde durch Kopplung von biotinmarkierten anti-EpCAM Antikörper und streptavidingekoppelten 625 nm QDs erreicht. Die QD-Lösung wurden in Konzentrationen von 5 nM, 10 nM und 20 nM eingesetzt und mit unmarkierten Zellen verglichen.

3.3.4.1. Optimierung des Quantum Dot-Protokolls

Um die Inkubationszeit der Fluoreszenzfärbung zu minimieren, wurde beim Ein-Schritt-Protokoll die Inkubation des Antikörpers und der Quantum Dots gleichzeitig durchgeführt, während beim Zwei-Schritt-Protokoll die Antikörper- und Quantum Dot- Inkubation zwei getrennte Vorgänge darstellten.

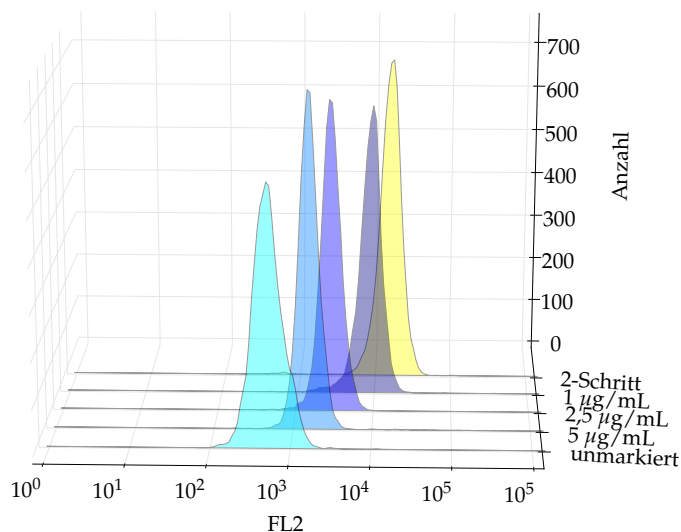


Abbildung 3.14.: Fluoreszenzintensität von MCF-7 Zellen in Abhängigkeit von Färbeprotokoll und Antikörperkonzentration. Die Zellen mit der Antikörperkonzentrationen 1 µg/mL, 2,5 µg/mL und 5 µg/mL wurden mit dem Ein-Schritt-Protokoll angefärbt. Die Antikörperkonzentration im Zwei-Schritt-Protokoll betrug 2,5 µg/mL.

Abbildung 3.14 zeigt die Fluoreszenzintensitäten der MCF-7 Zellen, die mit den unterschiedlichen Protokollen inkubiert wurden. Das Zwei-Schritt-Protokoll wurde mit 2,5 µg/mL anti-EpCAM Antikörper durchgeführt, während beim Ein-Schritt-Protokoll unterschiedliche Antikörperkonzentrationen Verwendung fanden. Die MCF-7 Zellen, die durch das Zwei-Schritt-Protokoll gefärbt wurden, zeigen die höchste Fluoreszenzintensität mit ca. 2×10^4 [a.u.]. Die Zellen, die über das Ein-Schritt-Protokoll gefärbt wurden, zeigen bei der gleichen Antikörperkonzentration eine deutlich niedrigere Fluoreszenzintensität von ca. 4×10^3 [a.u.]. Jedoch konnte mit einem geringeren Einsatz von Antikörper (1 µg/mL) die Fluoreszenzintensität auf ca. $1,3 \times 10^4$ [a.u.] gesteigert werden.

Das Zwei-Schritt-Protokoll führt also zu der höheren relativen Fluoreszenzintensität, jedoch muss beachtet werden, dass durch die Fluoreszenzkopplung der Zellen beim Zwei-Schritt-Verfahren alle sechs Probenröhrchen im automatisierten Endgerät besetzt wären. Da die Probe jedoch nach der Fluoreszenzfärbung noch in Xanthan aufgenommen werden muss, ist ein Zwei-Schritt-Protokoll aus Platzgründen nicht möglich. Durch die Verwendung des Ein-Schritt-Protokolls können die Zellen im Anschluss an die Färbung noch in Xanthan aufgenommen werden und die Prozesszeit konnte ebenfalls um 60 Minuten verringert werden, da einer der 60-minütigen Inkubationsschritte wegfällt.

3.3.4.2. Quantum Dot-Inkubationszeiten

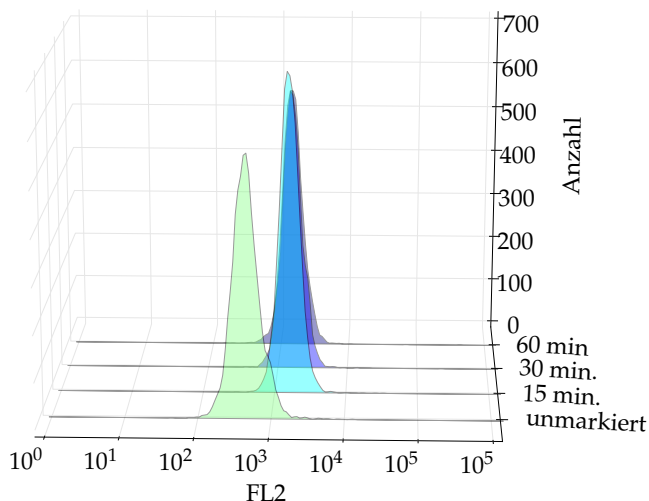


Abbildung 3.15.: Fluoreszenzintensität von MCF-7 Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Quantum Dots im Ein-Schritt-Verfahren.

Nach der Verkürzung des Protokolls durch Zusammenfassen von Inkubationsschritten wurde getestet, ob die Inkubationszeiten des Ein-Schritt-Protokolls ebenfalls optimiert werden können. Daher wurden wie in Abbildung 3.15 zu sehen, die Zellen unterschiedlich lang mit Quantum Dots und Antikörpern inkubiert. Wie zu sehen ist, kann die Inkubationszeit auf 15 Minuten reduziert werden, ohne dass sich die relative Fluoreszenzintensität der Zellen verändert. Dies bringt einen weiteren zeitlichen Vorteil von 45 Minuten gegenüber dem Originalprotokoll.

3.3.5. Quantum Dot-Kompatibilität mit magnetischen Partikeln

Da die Zellanreicherung und die Fluoreszenzmarkierung mit dem Biotin markierten anti-EpCAM Antikörper erfolgte, wurde überprüft, ob die Quantum Dots nach der Partikelinkubation noch an die Zellen binden können. In Abbildung 3.16 sind MCF-7 Zellen zu sehen, die zuerst mit Magnetpartikeln und anschließend mit Quantum Dots inkubiert wurden. Die Magnetpartikel markierten MCF-7 Zellen konnten erfolgreich durch Quantum Dots angefärbt werden. Jedoch ist auf dem Bild auch zu erkennen, dass die Magnetpartikel ebenfalls von den Quantum Dots angefärbt werden. Um zu überprüfen, ob die Magnetpartikel die Detektion der Zellen beeinträchtigt, wurden Magnetpartikel und Quantum Dot-markierte Zellen mit Quantum Dot-markierten Zellen gemessen.

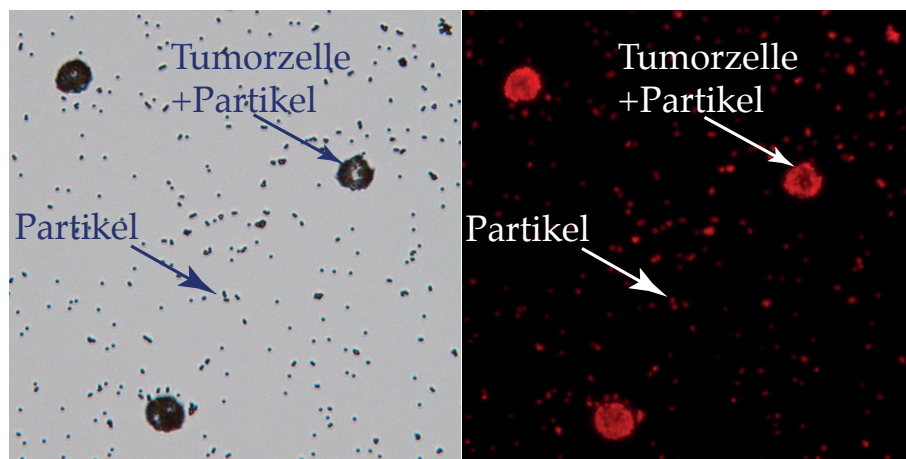


Abbildung 3.16.: Zeigt partikelmarkierte MCF-7 Zellen, die im Anschluss mit Quantum Dots inkubiert wurden. (a) MCF-7 Zellen an denen Magnetpartikel und Quantum Dots gebunden sind (siehe Pfeile). Im Hintergrund befinden sich ungebundene Magnetpartikel (kleine Punkte). Aufgenommen mit 20-facher Vergrößerung bei Auflicht. (b) zeigt die fluoreszierenden Magnetpartikel und Zellen bei einer 20-fachen Vergrößerung.

3.3 Fluoreszenzmarkierung

In Abbildung 3.17 sind exemplarisch zwei Messungen von MCF-7 Zellen mittels der Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz dargestellt. Messung (a) und (b) zeigen die Ergebnisse von Quantum Dot-markierten MCF-7 Zellen ohne magnetische Partikel. Die unteren Messungen (c) und (d) zeigen die Ergebnisse von

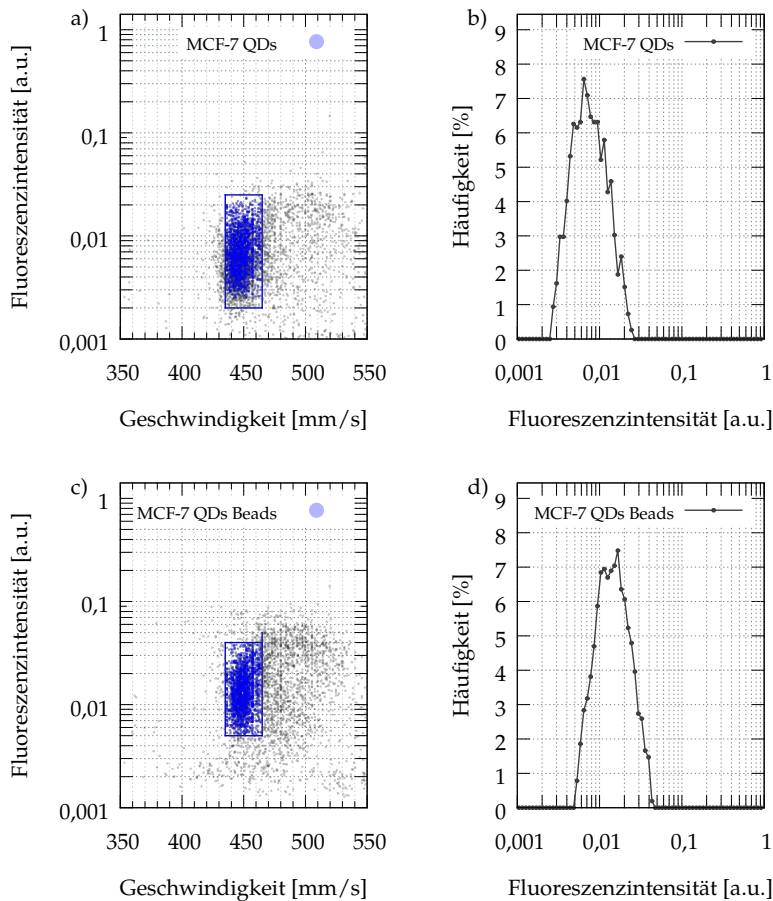


Abbildung 3.17.: Vergleich von QD-markierten Zellen und Magnetpartikel-markierten Zellen, die nach der Anreicherung mit QDs gekoppelt wurden. (a) Geschwindigkeit und Fluoreszenzintensität der QD-markierten MCF-7 Zellen im Punktdiagramm. Jeder blaue Punkt steht für eine detektierte Zelle. (b) Mittlere Fluoreszenzintensität der QD markierten MCF-7 Zellen aus dem selektierten Bereich des linken Punktdiagramms. (c) Geschwindigkeit der magnetisch angereicherten und QD-gefärbten MCF-7 Zellen und deren Fluoreszenzintensität. (d) Mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen aus dem selektierten Bereich des linken Punktdiagramms. Graue Punkte sind Artefakte der Messung und werden nicht als Zelle gezählt.

magnetisch markierten MCF-7 Zellen, die anschließend mit QD-markiert wurden. Die mittlere Fluoreszenzintensität liegt jedoch bei den Magnetpartikel markierten MCF-7 Zellen bei ca. 0,017 [a.u.] (Abbildung 3.17(b)) und bei den Zellen ohne Magnetpartikel bei ca. 0,006 [a.u.] (Abbildung 3.17 (d)). Die Fluoreszenzintensität konnte durch die Magnetpartikel somit sogar erhöht werden.

3.3.6. Optimierung des Färbepuffers

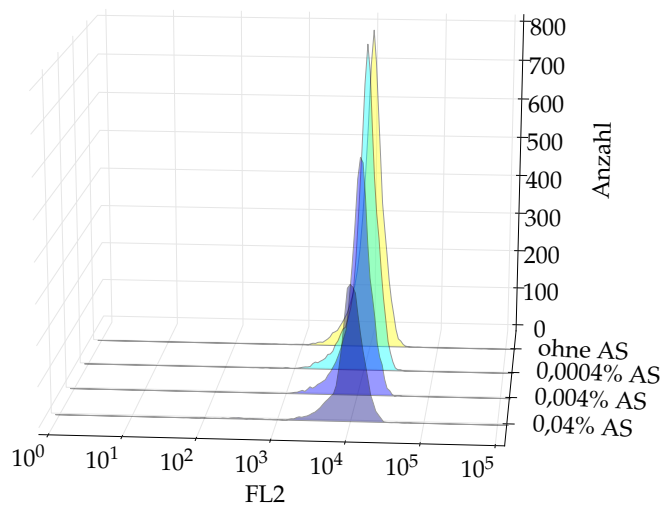


Abbildung 3.18.: Fluoreszenzintensität von MCF-7 Zellen in Abhängigkeit von der Antischaumkonzentration

Aufgrund der Schaumbildung während des Färbeprozesses, wurden die MCF-7 Zellen in 6%-BSA/Antischaumpuffer mit Quantum Dots gekoppelt.

Tabelle 3.1.: Gemessene Zellzahl nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit Antischaum

Antischaum Konzentration	gemessene Zellzahl	Volumen [μL]	Konzentration [Zellen/100 μL]
ohne	7488	118	6345
0,0004%	7340	113	6495
0,004%	5688	106	5366
0,04%	3511	77	4559

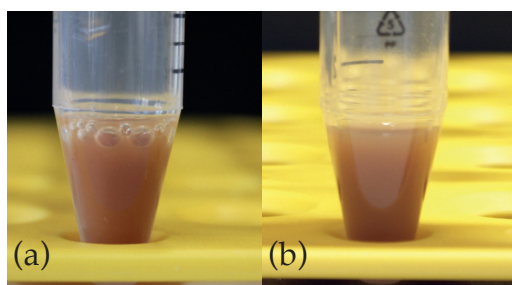


Abbildung 3.19.: Färbepuffer nach 15-minütigem durchmischen. (b) Blasenbildung ohne Antischaum. (a) Verhinderte Blasenbildung mit 0,004% Antischaum.

Die Fluoreszenzmarkierung wurde im Einzschritt-Verfahren (siehe Kapitel 2.2.11.2) durchgeführt.

In Abbildung 3.18 ist zu sehen, dass die Fluoreszenzintensität der Zellen durch die Inkubation mit dem Antischaummittel gleich bleibt. Die gemessene Zellzahl nimmt jedoch bei hohen Konzentrationen des Antischaummittels um 28 % ab.

In Tabelle 3.1 ist die gemessene Anzahl der Zellen zu sehen, bei 0,04 % konnten nur 4559 Zellen/100 μL gemessen werden. Die Konzentration der Zellen liegt bei einer Antischaumkonzentration von 0,0004 % bei 6495 Zellen/100 μL , während die Zellkonzentration bei der Probe ohne Antischaum bei 6345 Zellen/100 μL liegt. Die Antischaumkonzentration von 0,0004 % zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen, verhindert allerdings wie in Abbildung 3.19 zu sehen effektiv die Schaumentwicklung.

3.4. Detektion

Die Detektion von Quantum Dot-markierten MCF-7 Zellen durch die Methode der räumlich modulierte Fluoreszenzemission konnte wie in Abbildung 3.17 zu sehen erreicht werden. Nun musste noch abgeklärt werden, ob die Quantum Dots die Leukozyten fluoreszenzmarkieren. Die Markierung kann direkt, durch Kreuzreaktionen zwischen Leukozyten und Quantum Dots oder indirekt, durch die Kopplung an QDs-markierte immunomagnetische Partikel hervor gerufen werden.

3.4.1. Bestimmung der Kreuzreaktionen

Um zu überprüfen, ob die Leukozyten durch die Quantum Dots oder die Quantum Dot-markierten Magnetpartikel fluoreszenzmarkiert werden, wurden Leukozyten durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

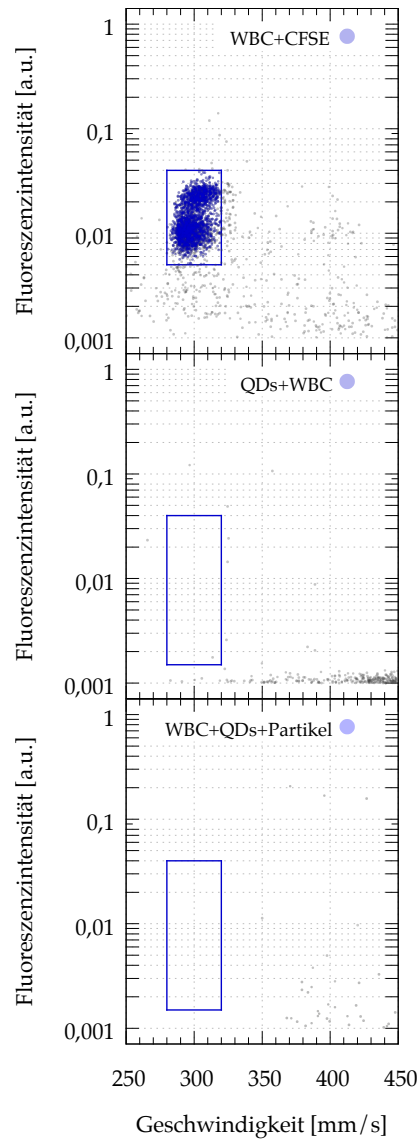


Abbildung 3.20.: Geschwindigkeit und Fluoreszenzintensität von CFSE-markierten, QD-inkubierten und Magnetpartikeln und QD-inkubierten Leukozyten. Der blau markierte Bereich gibt den Geschwindigkeitsbereich von Leukozyten an. Jeder Punkt steht für ein detektiertes Ereignis, wobei nur die blauen Punkte detektierte Leukozyten darstellen.

Anschließend wurden die Zellen auf 3 Aliquots aufgeteilt. In Abbildung 3.20 ist exemplarisch eine Leukozytenmessung zu sehen, bei der die Leukozyten in Probe (1) mit CFSE, in Probe (2) mit Quantum Dots und in Probe (3) mit Quantum Dots und Magnetpartikeln inkubiert wurden. In dem Punktdiagramm steht jeder Punkt für eine detektierte Zelle. Durch die Messung der CFSE markierten Leukozyten konnte der Geschwindigkeitsbereich der Leukozyten gemessen werden. Die Zellen ordnen sich bei einer Geschwindigkeit zwischen 280 und 320 mm/s an.

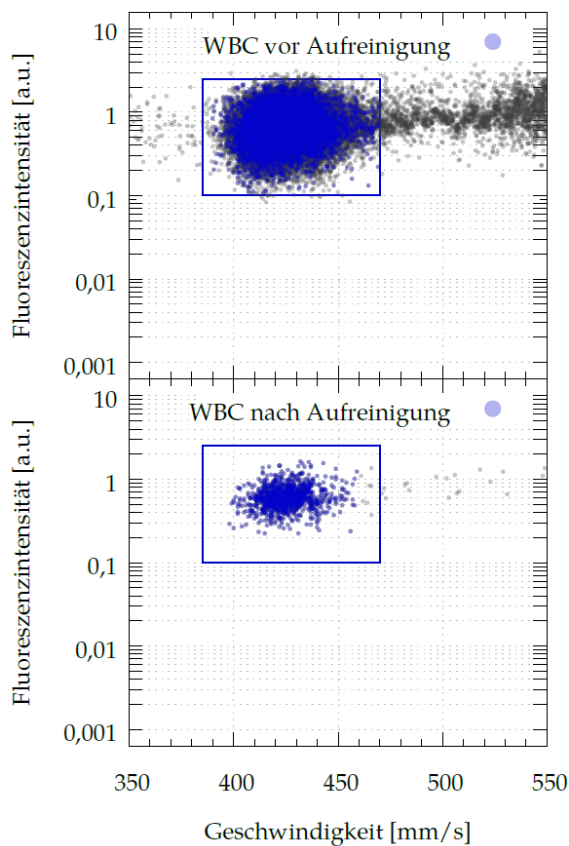


Abbildung 3.21.: Detektierte CFSE-gefärbte Leukozyten vor und nach der Aufreinigung durch die immunomagnetische Separationseinheit.

Um die Leukozytenkontamination zu bestimmen, wurden Analysen wie in Abschnitt Kapitel 2.2.18 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 3.21 ist exemplarisch eine der Messungen dargestellt. Bei dieser Messung betrug die Leukozytenanzahl vor der Aufreinigung etwa 84000 Zellen/mL während nach der Aufreinigung nur noch 1136 Zellen/mL vorhanden waren. Dies ergibt eine Leukozytendepletion von fast 99 %. Die Zellsuspension wurde nach der Aufreinigung mit 7,5 mL verdünnt, daher entspricht die absolute Leukozytenanzahl 8520 Zellen.

Wie in Abbildung 3.20 zu erkennen ist, werden die Leukozyten nicht direkt durch die Quantum Dots markiert, denn in dem ausgewählten Geschwindigkeitsbereich, in dem sich die Leukozyten anordnen, konnte nur eine Zelle detektiert werden, diese weist jedoch auch eine niedrige relative Fluoreszenzintensität auf und konnte daher als Leukozyte identifiziert werden.

3.4.2. Bestimmung der Reinheit - Detektion von Leukozyten

Um die Leukozytenkontamination zu bestimmen, wurden Analysen wie in Abschnitt Kapitel 2.2.18 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 3.21 ist exemplarisch eine der Messungen dargestellt. Bei dieser Messung betrug die Leukozytenanzahl vor der Aufreinigung

3.4.3. Unterschiede in der Geschwindigkeit von Leukozyten und MCF-7 Zellen

Durch die immunomagnetische Aufreinigung der Krebszellen aus Vollblut können auch Leukozyten als unerwünschte Hintergrundzellen mit angereichert werden. Im Folgenden ist exemplarisch eine Messung dargestellt, bei der mittels der räum-

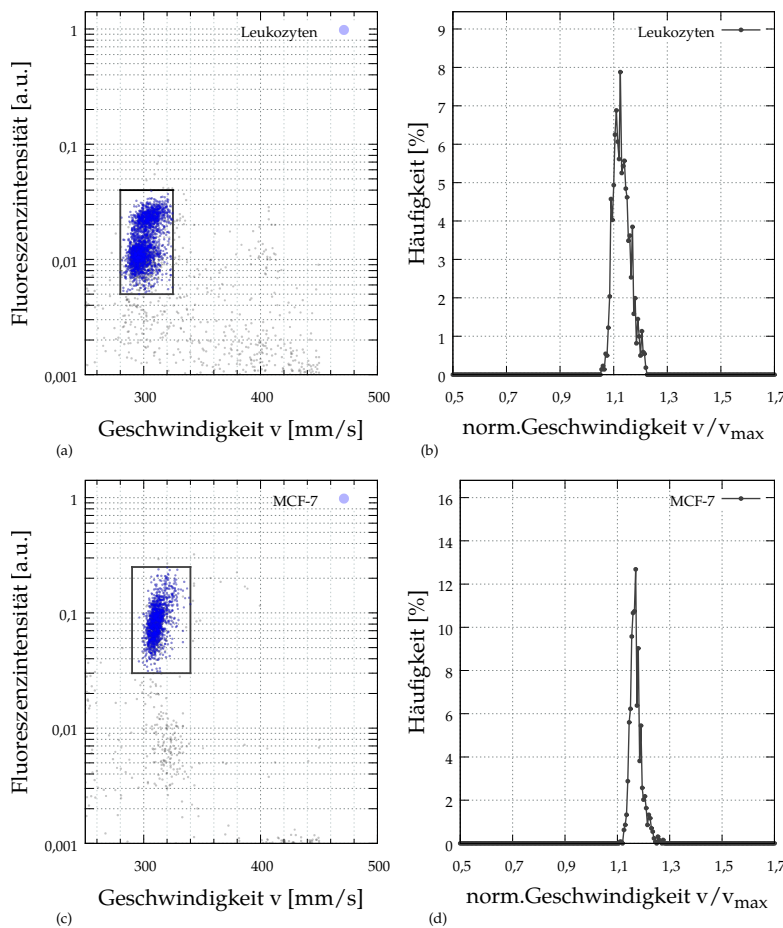


Abbildung 3.22.: CFSE-gefärbte Leukozyten und MCF-7 Zellen detektiert mittels räumlich modulierter Fluoreszenzemission. a) Fluoreszenzintensität als Funktion der Geschwindigkeit von CFSE-markierten Leukozyten. b) Auf die Maximalgeschwindigkeit normierte Geschwindigkeitsverteilung der Leukozyten. c) Fluoreszenzintensität als Funktion der Geschwindigkeit von CFSE-markierten MCF-7 Zellen. d) Normierte Geschwindigkeitsverteilung der MCF-7 Zellen.

lich modulierten Fluoreszenzemission überprüft wurde, ob neben der spezifischen Antikörperfärbung noch weitere Parameter verwendet werden können, um Leukozyten von Krebszellen zu unterscheiden. In Abbildung 3.22 ist die Messung von CFSE-gefärbten Leukozyten und MCF-7 Zellen in 0,125 % Xanthan/PBS dargestellt. Die Leukozyten wurden zuvor durch eine Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Beide Zellsuspensionen wurden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/mL gemessen. Die Messung wurde im finalisierten Chip (CTCelect) durchgeführt (siehe Abbildung 2.18 auf Seite 60).

In Abbildung 3.22 (a) ist zu erkennen, dass zwei Leukozytenpopulationen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität detektiert wurden. Die Fluoreszenzintensität der unteren Population liegt bei 0,01 [a.u.] und die der oberen Population bei 0,02 [a.u.]. Die beiden Populationen liegen jedoch im gleichen Geschwindigkeitsbereich von 280 mm/s bis 320 mm/s und haben eine normierte Geschwindigkeit von 1,1. Die Fluoreszenzintensität der CFSE-gefärbten MCF-7 Zellen liegt hingegen im Mittel bei 0,09 [a.u.] und die normierte Geschwindigkeit der Zellen liegt bei 1,17 relativ zur mittleren Geschwindigkeit des Mediums.

3.4.4. Variation der Hüllstromflussrate

Mit der Poisson-Verteilung kann die Wahrscheinlichkeit für die Anzahl von Ereignissen bestimmt werden, die unabhängig voneinander in einem festgelegten Raum- oder Zeitintervall eintreten, wenn der mittlere Abstand zwischen diesen Ereignissen konstant ist. Diese Bedingung ist für die Verteilung der Zellen und Leukozyten auf die „virtuelle“ Länge l des Detektionskanals (siehe Kapitel 2.2.19) gegeben. Mit den in Tabelle 2.11 auf Seite 68 gezeigten Parametern ergibt sich die virtuelle Länge des Kanals.

$$l = V/A = \frac{(3+4) \text{ mL}}{30.000 \mu\text{m}^2} \cong 133,3 \text{ m}$$

Um die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, mit der neben einer erwünschten CTC auch mindestens eine Leukozyte dispensiert wird, wurde zunächst eine Datenbasis bestehend aus 10.000 simulierten Objekten gebildet, die zufällig entlang des ausgestreckten Kanals platziert wurden. Die Positionen der Objekte wurden daraufhin sortiert und die Abstände aufeinanderfolgender Paare berechnet. Es ergab sich eine Menge von 9.999 Abständen im Bereich zwischen 0,56 μm und 165,50 mm. Es wurden nun 35 Intervalle bzw. Klassen zwischen diesen Grenzen gebildet und die Abstände anhand ihres Werts einer dieser Klassen zugeordnet. Die Grenzen der Klassen sind logarithmisch verteilt worden um den Wertebereich optimal abzutasten. Jede der gewählten Klassen enthält nun eine Anzahl von Abständen, deren Wert zwischen den Klassengrenzen liegt. Trägt man nun diese Anzahl gegen die untere Klassengrenze auf, ergibt sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abstände wie in Abbildung 3.23 dargestellt. In der Abbildung sind außerdem als vertikale Linien der mittlere Abstand sowie der Grenzabstand eingezeichnet,

die wie folgt berechnet wurden. Aus der virtuellen Länge des Kanals ergibt sich der mittlere Abstand – also der Erwartungswert des Abstands, dargestellt als magenta-farbene Linie – zwischen zwei Objekten im Kanal.

$$\bar{d} = l/N \cong 13,3 \text{ mm}$$

Der Grenzabstand – eingezeichnet in cyan – beträgt:

$$d_G = V_D/A = \frac{0,7 \mu\text{L}}{30.000 \mu\text{m}^2} \cong 23,3 \text{ mm}$$

Wie in Kapitel 2.2.19 beschrieben, wird neben der erwünschten CTC auch jede Leukozyte mit-dispensiert, wenn sie sich mit einem geringeren Abstand als dem Grenzabstand in der Dispensierzzone (siehe Abbildung 2.18 auf Seite 60) befindet. Leukozyten, deren Abstand zur dispensierten CTC größer als der Grenzabstand sind, werden nicht mit-dispensiert. Mit den Parametern aus Tabelle 2.11 ergibt sich für die Beifangwahrscheinlichkeit ein Wert von 81,9 %, d.h. nur knapp über 10 % der CTC werden tatsächlich isoliert dispensiert. Die Wahrscheinlichkeit für Beifang hängt mit der Gesamtkonzentration in der Probe zusammen.

Die Zellkonzentration kann nach der Anreicherung noch durch den Hüllstrom beeinflusst werden. Die Wahrscheinlichkeiten der Zellabstände von drei unterschiedlichen Hüllstromvolumina sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Die Abbildung 3.24 (a) zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung bei 9 mL Hüllstrom, der vor dem Messkanal zugeführt wird.

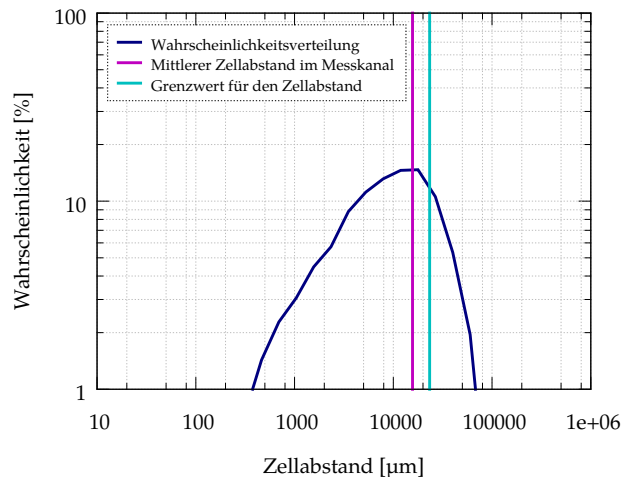


Abbildung 3.23.: Die dunkelblaue Kurve zeigt die mit Hilfe der Poisson-Verteilung ermittelten Wahrscheinlichkeit für den Abstand zwischen zwei Objekten (Zellen). Die magenta-farbene Linie zeigt den mittleren Zellabstand von zwei Zellen im Messkanal. Die cyan-farbene Linie gibt den Grenzwert für den Zellabstand bei einer Verdünnung von 3 mL vor dem Messkanal an.

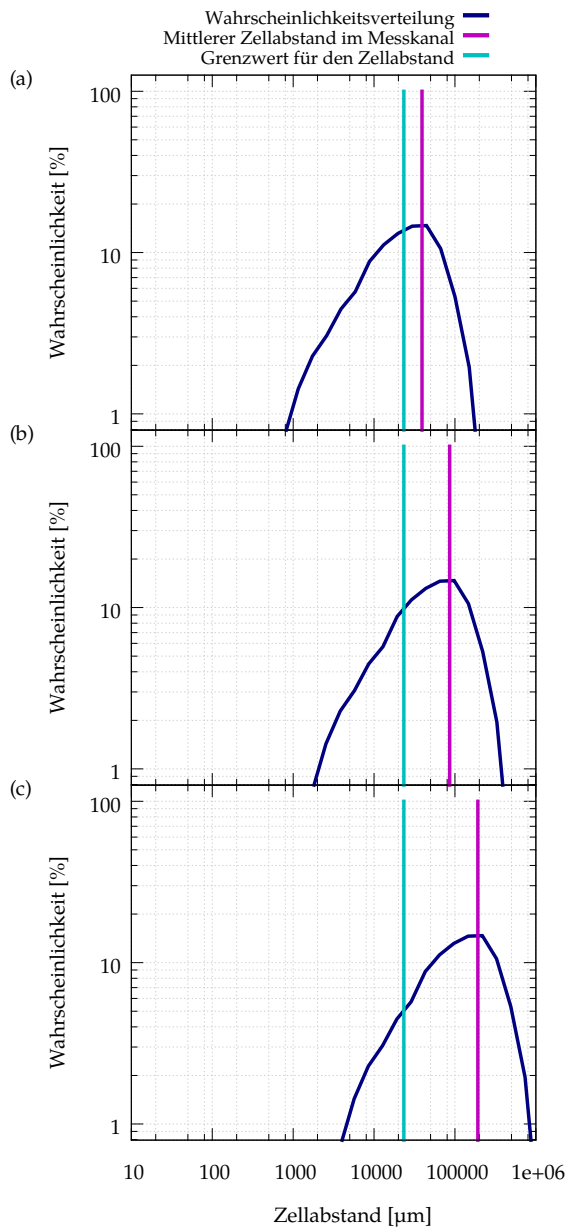


Abbildung 3.24: Wahrscheinlichkeit der Leukozytenkontamination bei unterschiedlichen Verdünnungen der Probe durch den Hüllstrom. (a) Wahrscheinlichkeitsverteilung der Zellabstände in μm bei einer Probenverdünnung von 9 mL vor dem Messkanal.

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich in den Kavitäten zusätzlich zu der CTC ein weißes Blutkörperchen befindet, liegt hier bei 52,6%. Bei einer Hüllstromzufuhr von 21 mL kann die Wahrscheinlichkeit für Beifang auf 28,3 % (b) und bei 48 mL (c) auf 13,0 % verringert werden. Die Wahrscheinlichkeit von Leukozytenbeifang wird niedriger, wenn die Zufuhr der Hüllstromflüssigkeit im Verhältnis zum Probenstrom erhöht wird, aber das prozessierte Gesamtvolumen gleich bleibt (siehe Abbildung 3.25). Durch die erhöhte Zufuhr von Hüllstrom und die damit verbundene Verdünnung der Probe, kommt es gleichzeitig zu einer längeren Prozesszeit, bis die Probe vollständig analysiert ist. Die Messdauer steigt mit dem Volumen des verwendeten Hüllstroms linear an, während die Wahrscheinlichkeit für Leukozytenkontamination in einer Isolationskavität abnimmt (siehe Abbildung 3.25). Um bei einer Anzahl von 8500 Leukozyten eine Leukozytenkontamination von etwa 50 % zu erreichen, muss die Probe mit ca. 9 mL Hüllstrom verdünnt werden. Daraus resultiert eine Messdauer von 20,8 Minuten. Bei diesen Einstellungen wäre dann nur in jeder zweiten Isolationskavität mindestens eine Leukozyte vorhanden.

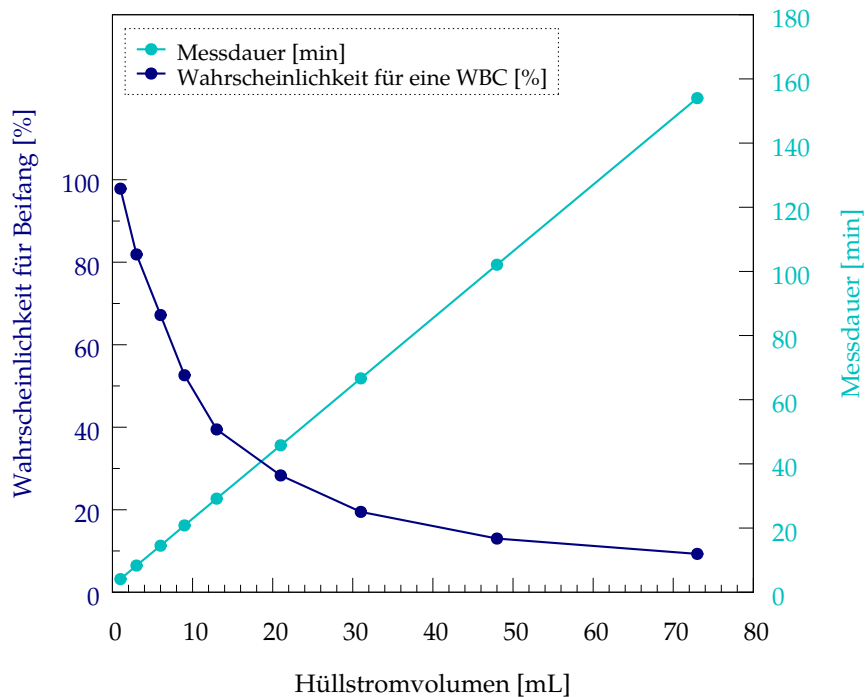


Abbildung 3.25.: Berechnete Dauer einer Messung und Wahrscheinlichkeit der Leukozytenkontamination in einer Isolationskavität in Abhängigkeit vom Hüllstromvolumen.

Die Wahrscheinlichkeit für den Beifang von zwei oder drei Leukozyten in einer Isolationskavität konnte aus der Wahrscheinlichkeit für ein weißes Blutkörperchen berechnet werden, in dem die zweite und dritte Potenz der Wahrscheinlichkeit für den Fall „mindestens ein weißes Blutkörperchen“ berechnet wurde. In Abbildung 3.26 sind die Wahrscheinlichkeiten aufgetragen. Betrachtet man beispielsweise die Wahrscheinlichkeiten für die Leukozytenkontamination bei einer Hüllstromvolumen von 1 mL, sieht man dass statistisch in 93,6 % der Isolationskavitäten mindestens drei weiße Blutkörperchen dispensiert werden. Durch ein Hüllstromvolumen von 3 mL sinkt die Wahrscheinlichkeit von mindestens 3 weißen Blutkörperchen auf 54,0 %. Erst bei einem Hüllstromvolumen von 31 mL sinkt die Wahrscheinlichkeit für mindestens 3 weiße Blutkörperchen auf unter 1 %.

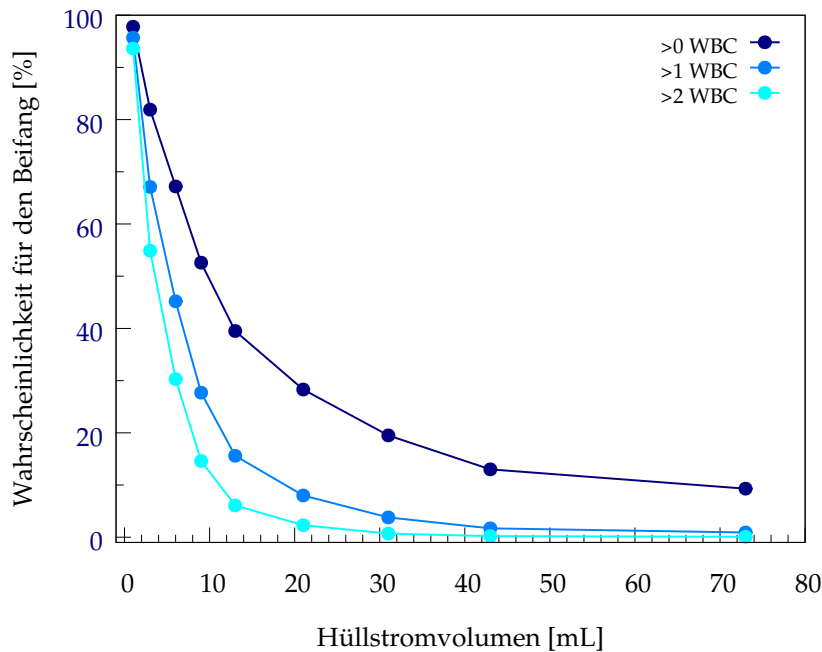


Abbildung 3.26.: Wahrscheinlichkeiten für die Anzahl an Leukozyten in einer Isolationskavität in Abhängigkeit von der Verdünnung mit Hüllstrom vor dem Messkanal

3.5. Gesamtaufbau

Das automatisierte Gesamtgerät wurde, wie in Abbildung 3.27 zu sehen, aus der Anreicherungseinheit, der Detektionseinheit und dem Dispenser zusammengesetzt. Die Außenmaße des Gerätes betragen 899 x 500 x 574 mm. Die Bedienung des Gerätes wurde über ein Touchdisplay realisiert wie in Abbildung 3.27 (a) dargestellt.

Alle Komponenten, die mit der Patientenprobe in Kontakt geraten, bestehen aus kommerziell erhältlichen Einwegartikeln; der Detektions-Chip ist ein in Kooperation mit dem Projektpartner thinXSS entwickeltes Einweg-Spritzgussteil (siehe Seite 60).

Die eingesetzten kommerziell erhältlichen Artikel sind die Proben- und Pufferbehälter im Probenkarussell (g), die Pipettenspitze (m) und die Mikrotiterplatte (s).

Des Weiteren wurden die dauerhaft eingesetzten Komponenten, so eingestellt, dass diese mit der Patientenprobe nicht in Kontakt kommen. Der Y-Magnetarm (j) wurde so positioniert, dass er bei beiden Magnetpositionen (siehe Abbildung 2.16) maximal 400 μm von der Pipettenspitze entfernt ist und die Pipettenspitze nicht

berührt. Damit dieser Abstand und auch die Positionen der Pipettenspitze immer gleich bleibt, wurde eine Pipettenaufnahmestation (n) eingebaut, aus der die Pipettenspitze von der Pipetten- und Magnethalterung (k) automatisiert, reproduzierbar und präzise aufgenommen werden kann. Die Pipettenhalterung (o) wurde dafür so konstruiert, dass die Pipettenspitze gleichmäßig und luftdicht aufgenommen werden kann. Die Pipettenhalterung wurde über eine HPLC-Verbindung mit einem Schlauch verbunden (p), welcher wiederum mit der Spritzenpumpe (b) verbunden wurde.

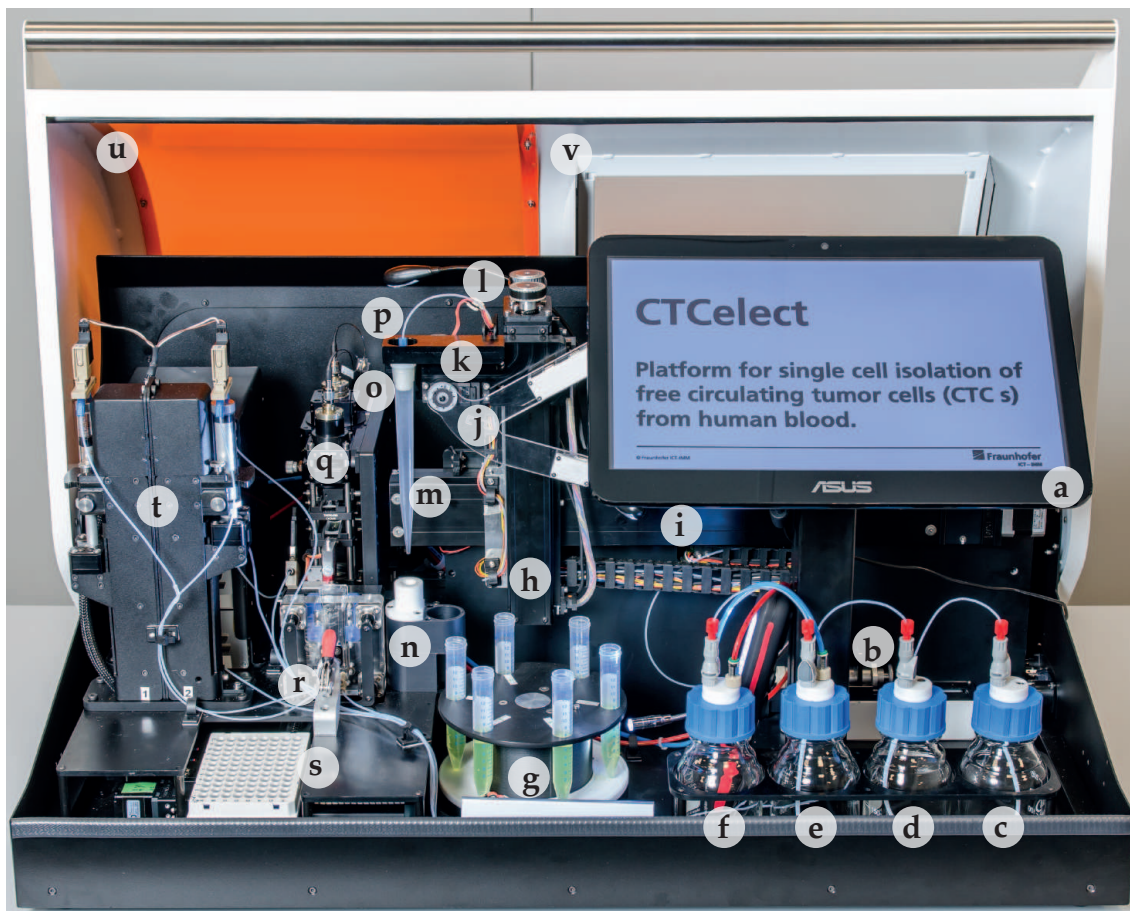


Abbildung 3.27.: Gesamtgerät, mit der Anreicherungseinheit (g-o), der Detektionseinheit (q,r) und dem Dispenser (t). a) Display, c) Abfall, d) Diespenserflüssigkeit, e) 0,125 % Xanthan, f) PBS, g) Probenkarussell, h) Vertikale Lineareinheit, i) Horizontale Lineareinheit, j) Y-Magnetarm, k) Magnet- und Pipettenhalterung, l) Zahnriemenantrieb, p) Schlauch mit HPLC Verbindung, o) Pipettenspitzenhalterung m) Pipettenspitze, n) Pipettenaufnahmestation, s) Mikrotiterplatte r) Chiphalterung, q) Detektionseinheit mit Laser, t) Dispensereinheit, u) UV-Schutzscheibe, v) Gehäuse

Damit die Pipettenspitze die einzelnen Positionen anfahren kann (siehe Tabelle A.2 und Tabelle A.3 ab Seite 136) wurde die Halterung (k) auf zwei gekoppelten Lineareinheiten montiert. Die erste Einheit (i) bewegt einen Schlitten in horizontaler Richtung. Die zweite Einheit (h) ist auf diesem Schlitten befestigt und bewegt über den Zahnriemenantrieb (l) die Halterung (k) in vertikaler Richtung

Die äußersten horizontalen Positionen, die die Pipetten- und Magnethalterung anfahren kann, sind die Startposition und die Chipposition. Die Chipposition wurde so programmiert, dass sie sich direkt über dem Probenreservoir des CTCelect Chips, welcher in der Chiphalterung (r) eingespannt wurde, befindet. In der Chiphalterung befinden sich Aufnahmestege die in entsprechende Aussparungen im Chip greifen. Dadurch ist sichergestellt, dass die Ausrichtung der Detektionszone (Teil des Chips) in Relation zur optischen Achse des Laserstrahls (Teil des Geräts) reproduzierbar mit der nötigen Toleranz erfolgen kann.

Die Vorratsbehälter für die Primingflüssigkeit (f)- und Hüllstrom (e) wurden über HPLC-Verbindungen und Schläuche (aus Polytetrafluorethylen (PTFE)) mit den Spritzen an der Dispensionseinheit (t) verbunden, welche dann über HPLC Verbindung mit der Chiphalterung verbunden sind.

Der Dispensionsflüssigkeitsvorrat (d) und der Abfallbehälter (c) wurden ebenfalls über HPLC-Verbindungen und Schläuche aus Polytetrafluorethylen (PTFE) mit der Dispensionseinheit (t) verbunden. Die Dispensionseinheit ist wiederum an den Dispenseranschluss in der Chiphalterung angeschlossen.

Die Fertigung des Gehäuses (v) erfolgte aus pulverbeschichtetem Stahlblech. In der Front befindet sich ein Ausschnitt, der einen Einblick in das Gerät ermöglicht. Um die im Inneren geführte Laserstrahlung nach außen hin ausreichend abzuschirmen ist der Ausschnitt mit einer UV-absorbierenden Scheibe verblendet (u) ausgestattet.

4. Diskussion

Krebs ist laut WHO eine der häufigsten Todesursachen weltweit und die Zahl der Neuerkrankungen soll in den nächsten zwei Jahren um 70 % ansteigen [105]. Die Chance auf Genesung hängt dabei vom Zeitpunkt und Qualität der Diagnose ab. Wird Krebs frühzeitig und exakt erkannt, kann eine effiziente und angepasste Therapie angewandt werden. Der kritische Abschnitt im Verlauf der meisten Krebserkrankungen ist der Prozess der Metastasierung. Die Verbreitung der zirkulierenden Tumorzellen über den Blutkreislauf und die dadurch induzierte Bildung von Metastasen ist letztendlich die Hauptursache der krebsbedingten Todesfälle. Der Prozess der Metastasierung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt [106, 27, 26]. Zahlreiche Studien zeigen jedoch, dass die Anzahl von CTCs als prognostischer Faktor gesehen werden kann: Patienten mit einer hohen CTC-Anzahl (mehr als 5 CTCs pro 7,5 mL) im Blut haben eine schlechtere Überlebenschance als Patienten mit einer geringen CTC-Anzahl [107, 108, 109, 110, 111, 112, 21]. Die Isolierung, Analyse und Überwachung der zirkulierenden Tumorzellen ist daher eine effektive Methode, um die Therapie von Krebspatienten zu optimieren und genauestens auf den Patienten anzupassen. Neben der Therapieoptimierung kann die Analyse der Zellen dazu beitragen, den Prozess der Metastasierung besser zu verstehen und neue therapeutisch relevante Marker zu finden. Für die Isolierung der seltenen Zellen aus einer Blutprobe wurden verschiedene Techniken entwickelt. Jedoch ist bis heute ist nur das auf Brust-, Prostata- und Darmkrebs spezialisierte „CellSearch“-System in den USA von der dortigen Regulierungsbehörde FDA zugelassen. Das System basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung mit anschließender Fluoreszenzmarkierung. Die finale Analyse muss bei diesem Gerät jedoch von geschultem Personal übernommen werden [107, 58]. Aufgrund der steigenden Neuerkrankungen steigt auch der Bedarf an einem System, welches durch einfache Handhabung voll-automatisiert CTCs anreichern, detektieren und isolieren kann, ohne geschultes Personal zu benötigen.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein voll-automatisiertes System entwickelt, welches Krebszellen aus einer 7,5 mL Blutprobe immunomagnetisch anreichert, diese dann fluoreszenzmarkiert und anschließend detektiert. Im Zuge dieser Entwicklungen wurde außerdem ein Kopplungsprotokoll für immunomagnetische Partikel erstellt, das die Tumorzellen zuverlässig und mit hoher Fangrate anreichert. Des Weiteren wurde die Fluoreszenzfärbung auf das automatisierte System angepasst und optimiert, sodass die Zellen automatisch detektiert werden können.

4.1. Anreicherung

Die Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen ist aufgrund der extrem geringen Anzahl eine technische Herausforderung [113, 114, 115]. In einer Blutprobe befinden sich pro Milliliter circa 7×10^6 weiße Blutkörperchen/mL, 5×10^9 rote Blutkörperchen/mL und 3×10^8 Thrombozyten/mL [27].

In der Vergangenheit entwickelte Systeme basieren meistens auf einer Anreicherung über eine antikörperbasierte Matrix [8]. Auch das einzige von der FDA anerkannte System „CellSearch“ basiert auf dieser Methode. Da die Spezifität eine sehr große Rolle spielt, wurde auch in dieser Arbeit ein System entwickelt, welches über Antikörper-Antigenbindung die Zellen anreichert. Bislang war die Antikörper-Antigen-assoziierte Anreicherung von CTCs die effektivste Methode CTCs anzureichern [27].

Wie in Abbildung 3.1 auf Seite 72 zu sehen ist, wurden drei Anreicherungssysteme getestet. Die Durchmischung der Zellen mit dem Noppenrührer und dem Exzenter führte zu hohen Vitalitätsverlusten der Zellen. Durch den Noppenrührer entstand ein Vitalitätsverlust von 16 %, während bei der exzenterbasierten Durchmischung nur 6 % der Zellen abstarben. Im Gegensatz dazu starben beim Pumpsystem nur 1,5 % der Zellen ab. Die enormen Verluste können beim Exzenter und Noppenrührer durch die für eine effektive Durchmischung notwendige hohe Rotationsgeschwindigkeit und die daraus resultierenden Scherkräfte entstanden sein. Außerdem lagerten sich beim Noppenrührer und Exzenter die Partikel auf den in die Probe eingetauchten Mischkörpern ab und ließen sich nicht mehr lösen (siehe Abbildung 3.2 Seite 73). Ein Zellverlust ist aus diesem Grund ebenfalls möglich. Aufgrund der geringen CTC-Anzahl ist es essenziell, alle Zellen, die in der Blutprobe vorhanden sind, zu detektieren, um falsch-negative

Ergebnisse zu vermeiden. Ein zu hoher Verlust an Zellen, bedingt durch die Art der Durchmischung, kann daher nicht in Kauf genommen werden. Aus diesem Grund wurde für die Anreicherung das Pumpsystem gewählt, da es zu einem niedrigen Vitalitätsverlust kommt (-1,5 %) und zum anderen durch kommerziell erhältliche Einwegartikel aufgebaut werden kann, welche die Kosten für einen Durchlauf in Gesamtsystem verringern.

4.1.1. Magnetische Partikel

Die immunomagnetische Anreicherung ist mittlerweile eine etablierte Methode um seltene Zellen zu isolieren. Neben Systemen wie dem „CellSearch“-System greifen auch andere Systeme wie beispielsweise der MagSweeper, Adnatest (Adnagen) und Isoflux (FLUXION) auf immunomagnetische Anreicherung zurück (siehe Kapitel 1.4 Seite 11) [59, 116, 54].

Für die spezifische Zellanreicherung wurden verschiedene paramagnetische Partikel mit anti-EpCAM (*engl. epithelial cell adhesion molecule*, epitheliales Zelladhäsionsmolekül) Antikörper gekoppelt. Anti-EpCAM ist ein häufig verwendeter Antikörper um zirkulierende Tumorzellen anzureichern, der Antikörper ist gegen ein glykosyliertes Membranprotein gerichtet, welches von den meisten Tumoren epithelialen Ursprungs überexprimiert wird [117, 118]. Da EpCAM von einem Großteil der Tumore gebildet wird [119, 120, 121] und normale Blutzellen, wie beispielsweise Leukozyten, dieses Oberflächenmolekül nicht exprimieren [52], ermöglicht es eine spezifische Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus Vollblut.

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Partikelsorten im Standardversuch (siehe Kapitel 2.2.4 Seite 39) hinsichtlich der Fangrate getestet. Die getesteten Partikel besaßen unterschiedliche Größen und Oberflächenbeschichtungen (siehe Tabelle 2.4). Die kleinsten getesteten Partikel waren carboxylbeschichtete 500 nm große magnetische Partikel. Des Weiteren wurden 4,5 µm große Ziege anti-Maus-Partikel und 1 µm streptavidinbeschichtete Partikel verwendet. Zum Vergleich zu kommerziell erhältlichen Partikeln wurden 4,5 µm große Adnagen-Partikel getestet. Wie in Abbildung 3.3 auf Seite 74 zu sehen, zeigen die carboxylbeschichteten und die Ziege anti-Maus-Partikel die niedrigsten Fangraten von den hausintern funktionalisierten Partikeln. Die Ziege anti-Maus-Partikel können im Schnitt nur

71 % der gespikten Zellen wiederfinden. Weiterhin fällt auf, dass die Ziege anti-Maus-Partikel eine hohe Standardabweichung aufweisen und reproduzierbare Ergebnisse somit nicht erreicht werden können. Die hohe Streuung ist ein Resultat der geringen Stabilität der gekoppelten Ziege anti-Maus-Partikel. Am Tag nach der Funktionalisierung der Partikel konnten sie 45 % weniger Zellen anreichern als noch am Tag der Funktionalisierung (siehe Seite 74, Abbildung 3.4). Da die Partikel aber nicht für jeden Probendurchlauf neu gekoppelt werden sollten, wurden diese Partikel nicht weiter verwendet.

Auch die carboxylbeschichteten Partikel konnten nur 73 % der gespikten Zellen fangen, können aber die Zellen gegenüber den Ziege anti-Maus-Partikel mit höherer Reproduzierbarkeit anreichern. Die effizientesten Partikel waren in diesen Versuchen die streptavidinbeschichteten 1 μm Partikel, diese reichern die Krebszellen reproduzierbar mit einer Wahrscheinlichkeit von 85 %.

Bei der Funktionalisierung der carboxylbeschichteten und der Ziege anti-Maus-Partikel wurde der gleiche Antikörper verwendet, während bei den Streptavidinpartikeln ein biotinkoppelter anti-EpCAM Antikörper verwendet wurde. Die unterschiedlichen Fangeffizienzen können daher auch durch die verschiedenen Antikörper zustande gekommen sein. Der biotinkoppelte Antikörper könnte eine höhere Affinität für ein anti-EpCAM Epitop auf der Zelle besitzen [122].

Auffällig bei diesem Test ist auch, dass die kommerziell erhältlichen Partikel von Adnagen mit 61 % eine weitaus geringere Fangrate im Puffer aufweisen als die Streptavidinpartikel. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Adnagen-Partikel für die Verwendung in Vollblut ausgelegt sind und in dem hier verwendeten Medium möglicherweise falsch gepuffert waren. Vergleicht man allerdings die erreichten Fangraten im Vollblut miteinander (siehe Abbildung 3.6), zeigt sich, dass die Adnagen-Partikel auch hier 11 % weniger Zellen anreichern als die 1 μm Streptavidinpartikel.

4.1.2. Partikeloptimierung

Die meisten Systeme, die zur CTC-Anreicherung entwickelt wurden, erreichen eine Effektivität zwischen 62 % und 93 % [59, 123, 124, 125, 126]. Viele dieser Systeme laufen jedoch nicht automatisiert ab, sondern erfordern manuelles Eingreifen. Eine Probenaufbereitung, wie zum Beispiel die Lyse von roten Blutkörperchen

oder Zentrifugation der Probe, ist ein häufig angewandtes Mittel um den Probandendurchsatz zu erhöhen und die Kontamination durch normale Blutzellen zu vermeiden [127, 128]. Für diese Schritte ist allerdings geschultes Personal erforderlich und eine automatisierte Umsetzung nur schwer zu realisieren. Das in dieser Arbeit entwickelte Anreicherungssystem sollte daher ohne jegliche Probenvorbereitung in der Lage sein, die CTCs mit hoher Wahrscheinlichkeit und Reinheit anzureichern.

Da die Partikel nach der Durchführung des Funktionalisierungsprotokolls nach Herstellerangaben zu Aggregation neigen (siehe Seite 75), wurden das Protokoll weiter optimiert. Dafür wurden die Partikel zum einen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert und zum anderen wurden die freien Bindungsstellen der Partikel mit biotingeblockt. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, konnte durch die Optimierung des Kopplungsprotokolls die Fangrate der Streptavidinpartikel im Blut um 10 % gesteigert werden. Die Fangraten konnten mit steigender Antikörperkonzentration auf bis zu 90 % im Medium und 73 % im Blut gesteigert werden, die Aggregatbildung konnte trotzdem nicht eliminiert werden. Erst durch die Zugabe von Biotin konnte dies vermieden werden (siehe Abbildung 3.5).

Da biotingekoppelte Antikörper meist mit drei bis sechs Biotinmolekülen funktionalisiert sind [129], kann es durch freie Streptavidinbindungsstellen auf dem Partikel zu Doppelbindungen des Antikörpers kommen. Blockt man diese freien Bindungsstellen auf dem Partikel ab, werden solche Doppelbindungen vermieden (siehe Abbildung 4.1). Die Fangrate der biotingeblockten Partikel konnte daraufhin auf circa 95 % im Medium und circa 84 % im Blut gesteigert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Aggregation der Partikel eine kleinere Oberfläche entstanden ist, die mit den Zellen interagieren konnte [130]. Daher wurden die Zellen nicht effizient genug angereichert, was sich in der hier gemessenen Fangrate widerspiegelt.

Außerdem konnten die einzelnen Partikel besser in Suspension gehalten werden, wodurch die Interaktion der Partikel mit den Zellen erhöht wurde. Durch die Verwendung von 0,01 % Biotin konnte also die Aggregatbildung verringert, die Antikörperkonzentration optimiert und die Fangraten gesteigert werden. Folglich wurde die Fangeffizienz erhöht und den Bedarf von Antikörpern optimiert.

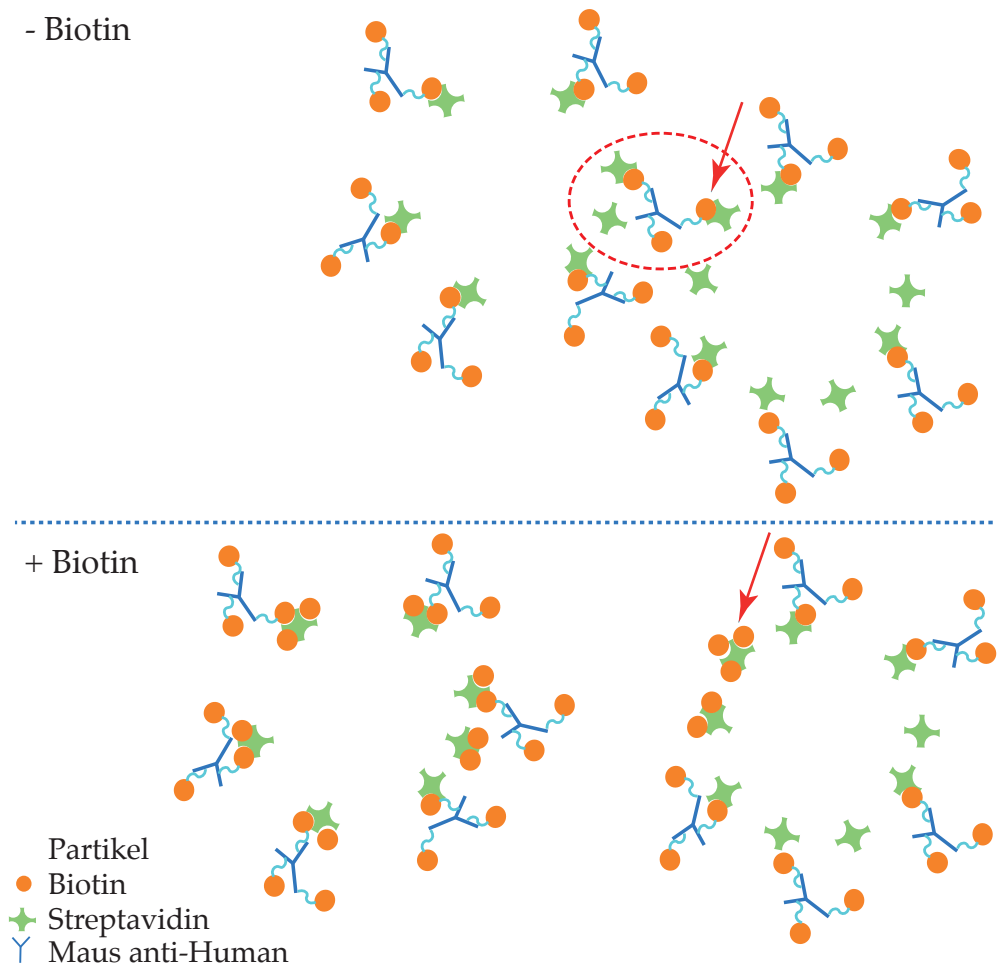


Abbildung 4.1.: Kopplungsverhalten der Streptavidinpartikel in Abhängigkeit von der Zugabe von Biotin.

Vergleicht man in Abbildung 3.6 (b) die biotingeblockten Partikel mit den kommerziell erhältlichen Adnagen-Partikel, ist deutlich zu erkennen, dass die biotingeblockten Partikel in Medium und Blut mit 94 % und 83 % höhere Fangeffizienzen besitzen als die Adnagen-Partikel mit 63 % und 71 %. Die höheren Fangraten bei den biotingeblockten Partikel können zum einen, wie zuvor schon erwähnt, durch die höhere Effizienz der Antikörper und zum anderen durch die geringere Größe im Vergleich zu den Adnagen-Partikeln erklärt werden. Sterische Hinderungen können dazu führen, dass die 4,5 μm großen Adnagen-Partikel bei überexprimierten Antigenen auf der Zelloberfläche nicht optimal an die Antigen determinante binden können und dadurch die gesamte magnetische Ladung auf einer Zelle reduziert wird [131].

4.1 Anreicherung

Des weiteren konnte Kim *et al.* zeigen, dass Partikel ab einer Größe von $4\ \mu\text{m}$ instabile Bindungen ausbilden. Die Partikel können sich also nach der Bindung an eine Zelle wieder lösen [46]. Außerdem wurde von Sieben *et al.* gezeigt, dass Zellen, die durch $4,5\ \mu\text{m}$ Partikel angereichert wurden, Schäden an der Membran aufweisen, womit ein Verlust an Zytoplasma einhergeht. [132]. Folglich können die Zellen während des Anreicherungsprozess mit großen Partikeln auch vollständig zerstört werden.

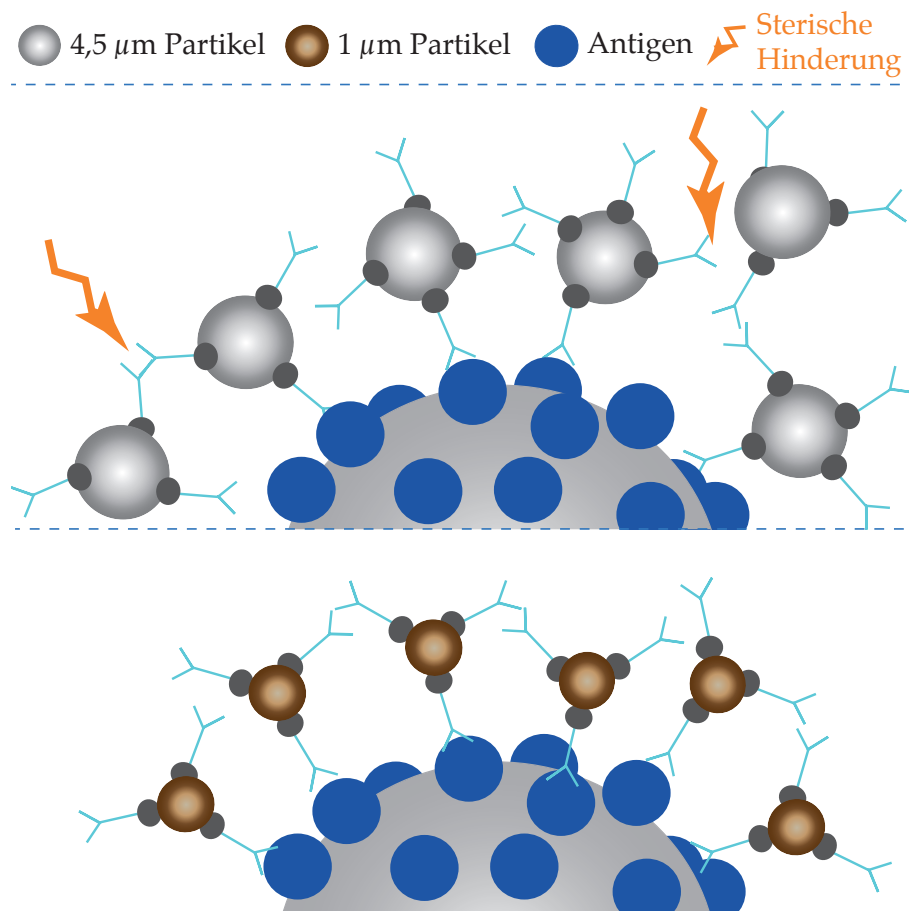


Abbildung 4.2.: Magnetische Zellbeladung in Abhängigkeit der Größe der Magnetpartikel. Bei überexprimierten Antigenen auf der Zelloberfläche kann es bei großen ($4\ \mu\text{m}$) magnetischen Partikeln schneller zu sterischen Hindernissen kommen als bei kleinen ($1\ \mu\text{m}$) magnetischen Partikeln. Dadurch kann mit $1\ \mu\text{m}$ Partikel eine höhere Zellbeladung erreicht werden.

4.1.3. Systemtest

Da sich die Streptavidinpartikel in den Versuchen als die effizientesten Partikel gezeigt haben, wurden diese Partikel einem Systemtest unterzogen und in dem halb-automatisierten Pumpsystem getestet. Wie auf Seite 78 in Abbildung 3.8 zu sehen, können die Streptavidinpartikel im halb-automatisierten System 73 % der gespikten MCF-7 Zellen anreichern. Dies ist ein Verlust von 21 % gegenüber dem Standardversuch. Die verminderte Fangeffizienz ist darauf zurückzuführen, dass die Positionen der Pipette, der Magnete und der Reaktionsgefäße bei dem halb-automatisierten System noch per Hand einzustellen waren, und nicht immer exakt mit den gleichen Einstellungen vorgenommen werden konnten. Im Standardversuch konnten die einzelnen Komponenten immer an der gleichen Stelle befestigt werden und die Durchmischung wurde immer gleichmäßig durch den Überkopfmischer bei 5 rpm durchgeführt. Da schon kleine Änderungen der Position der Pipette während des Mischens dazu führen können, dass die Partikel nicht optimal vermischt werden, kann dies zu der Abnahme der Fangrate geführt haben.

Im voll-automatisierten System wurden diese Parameter reproduzierbar eingestellt. Außerdem wurde die Schlauchpumpe durch eine Spritzenpumpe ausgetauscht. Dadurch konnten die pulsierenden Bewegungen, die während des Pumpens mit der Schlauchpumpe aufgetreten waren, eliminiert und die Probe gleichmäßig durchmischt werden. Des Weiteren wurde die Pipettenhalterung so eingestellt, dass sie während des Mischens vertikal verfahren werden kann. Dadurch wurde ermöglicht, dass nur ein kleiner Teil der Oberfläche der Pipettenspitze mit Blut benetzt wurde, da die Pipettenspitze immer nur maximal einen Zentimeter in die Probe eingetaucht war. Während dieses Vorgangs musste jedoch die Spitze der Pipette dauerhaft in der Probe eingetaucht sein, um Blasenbildung zu vermeiden. Wird eine Blase eingesogen, kann es dazu kommen, dass die Magnetpositionen nicht mehr mit der Position der Flüssigkeitssäule in der Pipettenspitze übereinstimmt. Infolgedessen können die magnetischen Partikel in der Probe nicht optimal angezogen und Zellen verloren gehen. Damit dieser Fall nicht eintritt, wurden sieben vertikale Positionen eingestellt, die zur Durchmischung der Probe benötigt werden (siehe Tabelle A.2 und Tabelle A.3 auf Seite 136). Vier Positionen definieren den oberen Beginn des Mischvorgangs bei unterschiedlichen Volumina

(7,5 mL Blutprobe, 5 mL Waschpuffer, 3,5 mL Waschpuffer und Fluoreszenzfarbstoff), zwei Positionen definieren das Ende des Verfahrensweges (Mischposition und Karussellboden). Die extra Position wird benötigt, da das Reaktionsgefäß eine konische Form besitzt. Bei dieser Position wurde eine höhere Geschwindigkeit beim Verfahren der Pipette eingestellt, um dem immer kleiner werdenden Volumen im Konus des Reaktionsgefäßes Rechnung zu tragen und Blasenbildung zu vermeiden. Die Fangeffizienz konnte durch diese Einstellungen auf 89 % im Medium gesteigert werden.

4.1.4. Pufferoptimierung

Wie Sieben *et. al.* demonstrieren konnte, haben die Pufferzusammensetzungen ebenfalls Auswirkungen auf die Fangrate und die Reinheit der Probe [132]. Daher wurden verschiedene Waschpuffer getestet, um die Fangeffizienz und die Reinheit zu verbessern. Zum Einsatz kamen RPMI 1640 Medium, PBS/0,1 % BSA und EDTA/FCS/PBS Puffer.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sieben *et. al.* weist in den hier dargestellten Ergebnissen nicht das RPMI Medium, sondern der EDTA/FCS/PBS Puffer mit 96 % die höchste Fangrate auf (siehe Abbildung 3.9) [132]. Dies kann in der Zusammensetzung begründet sein. EDTA hilft kationabhängige Zell-Zell-Kontakte zu verhindern, indem es mit hoher Affinität Ca^{2+} komplexiert. Der Calciumentzug hat Auswirkung auf die adhäsionsvermittelnden Cadherine einer Zelle und verhindert so Zellkontaktstrukturen [133]. Auch die Aktivierung von T-Zellen wird durch den Entzug von Ca^{2+} beeinflusst [134]. Folglich wird die Anlagerung der T-Zellen an andere Zellen vermindert und somit wird auch die Bildung von Zellklumpen verringert. Neben EDTA wurde in dem Puffer auch FCS verwendet, welches sich aus über 5.000 Komponenten zusammensetzt, die bis heute noch nicht alle bekannt sind. Daher ist die genaue Wirkung von FCS auf die Zellen noch nicht vollständig verstanden. Jedoch verbessert das Serum die Bioverfügbarkeit von unterschiedlichen Substanzen, die auch zur Stabilisierung der Zelle beitragen. Außerdem erhöht FCS die Viskosität des Puffers und kann darüber hinaus die Zellen vor mechanischer Beschädigung schützen [133]. Da die Zellen in dem automatisierten Aufbau häufig durch Pipettieren resuspendiert werden, kann dieser Schutz dazu beitragen, die Zellen schonend anzureichern. Dass die Fangeffizienz durch den Puffer im automatisierten Anreicherungs Aufbau erstmals

um 3 % höher ist als bei der Referenzmethode, weist daraufhin, dass die Zellen nicht durch unzureichende Kopplung an die Partikel verloren gehen, sondern durch die Art und Weise wie die Zellen gewaschen werden.

4.1.5. Zellsedimentation

Damit die Zelldetektion ohne Störungen durch Luftblasen ablaufen kann, müssen die Zellen bevor sie in den Detektionskanal geleitet werden in einem Mäander zwischengelagert werden (siehe Abbildung 2.18). Durch die Zwischenlagerung der Zellen im Mäander kommt es jedoch zu Sedimentation der Zellen. Sobald die Zellen sich abgelagert haben, ist ein erneutes Durchmischen nicht mehr möglich. Die Zellen verbleiben im Mäander und können die Detektionszone nicht erreichen. Durch die Verwendung von Xanthan, einem scherviskosen Additiv, konnten die Zellen in Suspension gehalten werden. Xanthan ist ein scherverdünnendes Medium, welches unter Einwirkung von Scherkräften eine geringere Viskosität aufweist. Wirken keine Scherkräfte auf das Medium, besitzt Xanthan eine hohe Viskosität und kann so Zellen oder Partikel in Suspension halten. Außerdem ist es nicht toxisch für Zellen, kostengünstig [135] und aufgrund der niedrigen Absorption über ein breites Wellenlängenspektrum optimal für optische Analysen geeignet [136]. Um zu testen, ob Xanthan in dem hier aufgebauten System die Zellen vor der Sedimentation bewahrt und diese trotzdem noch in der Detektionseinheit detektiert werden können, wurden Zellsuspensionen in reinem PBS und 0,125 % Xanthan eine Stunde in den Spritzen der Spritzenpumpe gelagert. In dieser Zeit wurden in Intervallen von 15 Minuten kurzzeitig Zellen aus dieser Probe detektiert. Wie auf Seite 80 in Abbildung 3.10 zu sehen, nimmt die Zellzahl der in PBS gelagerten Zellen mit der Zeit ab. Bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten sinkt die Zellzahl um circa 30 %. Lagert man die Zellen nun eine Stunde lang in 0,125 % Xanthan/PBS, so bleibt die Zellzahl konstant. Die absinkende Zellzahl der in PBS gelagerten Zellen tritt auf, da die Zellen sich auf dem Boden der Spritzen ablagern und nicht mehr durch die Spritzenpumpe aus der Spritze in den Detektionskanal gefördert werden können. Xanthan kann also im System verwendet werden, um Zellen vor der Sedimentation zu bewahren und verhindert dadurch, dass Zellen im Chip verbleiben, ohne detektiert zu werden.

4.2. Fluoreszenzmarkierung und -Detektion

Der Prozess der Fluoreszenzmarkierung musste an die bestehende Detektionseinheit, die im Zuge einer voran gegangenen Doktorarbeit aufgebaut wurde, angepasst werden. Da der verbaute Laser eine Wellenlänge von 445 nm besitzt, musste der Fluoreszenzfarbstoff dementsprechend gewählt werden. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden daher der Farbstoff Atto 465 und streptavidinbeschichtete Quantum Dots (625 nm Wellenlänge) ausgewählt und getestet.

Die optische Detektion der Zellen wurde über die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenzemission realisiert. Dieses Prinzip wurde erstmals 2008 von Kiesel *et. al.* vorgestellt und ermöglichte die Herstellung eines robusten und günstigen Durchflusszytometer [137, 78]. Das zentrale Element dieser Methode ist die Schattenmaske, durch die die fluoreszenzmarkierten Zellen angeregt werden können. Damit die Zelle während der Durchquerung der Detektionszone optimal durch den Laser angeregt werden kann, muss die Maske vollständig und homogen ausgeleuchtet werden. Die Maske hat eine Länge von 1,5 mm und eine Höhe von 500 µm. Um diesen Bereich ausreichend auszuleuchten, wurde ein starker Laser mit 1,2 W und einer Wellenlänge von 445 nm verbaut [138]. Diese Wellenlänge wird in der Biologie selten genutzt und es sind keine Antikörper mit einem Fluorophor dieser Wellenlänge kommerziell zu erhalten. Daher mussten die Antikörper für die Fluoreszenzdetektion hausintern gekoppelt werden. Der Vorteil dieses Lasers ist jedoch, dass er im Vergleich zu beispielsweise einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm kostengünstiger ist.

Der Prozess der Fluoreszenzmarkierung ist ein weiterer wichtiger Schritt in der Probenaufbereitung. Die Spezifität der Färbung muss sehr hoch sein, denn trotz der Aufreinigung der Zellen aus Vollblut, kommt es zu Verunreinigungen durch Leukozyten. Die Reinheit der Probe hat neben der Wiederfindungsrate eine große Bedeutung, da die Detektion von weißen Blutkörperchen zu einem falsch positiven Ergebnis führt [27]. Daher wurde bei der Markierung der Zellen auf die spezifische Antigen-Antikörper-basierte Fluoreszenzmarkierung zurückgegriffen.

Die Detektion von CFSE-markierten MCF-7 Zellen durch die räumlich modulierten Fluoreszenzemissionsmethode, wurde zuvor schon erfolgreich demonstriert [138]. Jedoch wird bei einer CFSE-Färbung die komplette Zelle unspezifisch

angefärbt [14], daher können auch aufgereinigte weiße Blutkörperchen angefarbt werden, die dann als falsch positives Ereignis detektiert werden. Die CFSE-Färbung wurde daher in dieser Arbeit nur als Positivkontrolle verwendet.

Der Expressionsgrad von tumorassoziierten Oberflächenantigenen ist bei zirkulierenden Tumorzellen sehr unterschiedlich. Infolgedessen ist es essenziell, eine hohe Fluoreszenzintensität zu erreichen, um Zellen mit einem niedrigen Expressionsgrad ebenfalls detektieren zu können. In dieser Arbeit wurden für die Fluoreszenzmarkierung anti-EpCAM und anti-Muc1 Antikörper getestet.

In Abbildung 3.11 auf Seite 82 ist exemplarisch eine Färbung von Zellen mit Atto465-gekoppeltem anti Mucin-1 (anti-Muc1) Antikörpern dargestellt und eine auf Quantum Dots basierende Färbung mit einem anti-EpCAM Antikörper. Muc1 ist, wie EpCAM ein Oberflächenmolekül welches von zirkulierenden Tumorzellen gebildet wird und kann daher ebenfalls für eine spezifische Färbung verwendet werden [139, 140, 141]. Die Fluoreszenzmessung der Zellen mittels der räumlich modulierten Fluoreszenzmethode zeigt, dass Zellen, die mit Quantum Dots gefärbt wurden, eine circa fünffach höhere Fluoreszenzintensität aufweisen als Zellen, die mit dem organischen Fluorophor Atto465-markiert wurden.

Quantum Dots werden in der Biologie immer häufiger eingesetzt, da sie aufgrund ihrer Eigenschaften viele Vorteile gegenüber den normalen Fluoreszenzfarbstoffen besitzen. Insbesondere das breite Anregungsspektrum, die lange Fluoreszenzstabilität, die vernachlässigbare Photobleichung und die hohe Quantenausbeute sind optimal für den in dieser Arbeit erstellten Prozess [87, 86].

Das breite Anregungsspektrum der Quantum Dots ermöglicht die Anregung mit dem 445 nm-Laser und umgeht so die geringe Auswahl an organischen Fluoreszenzfarbstoffen, die durch diese spezielle Wellenlänge angeregt werden können. Des Weiteren erfolgt die Fluoreszenzfärbung der Zellen nach der Anreicherung, was zur Folge hat, dass die Fluoreszenzlösung im Probenkarussell der Anreicherungseinheit circa drei Stunden ohne Licht- und Wärmeschutz vorgelagert werden muss. Konventionelle organische Fluoreszenzfarbstoffe könnten in dieser Zeit stark an Fluoreszenz verlieren, während die Eigenschaften der QDs nahezu gleich bleibt [86, 142]. Die hohe Quantenausbeute ist ebenfalls ein großer Vorteil, da nicht alle zirkulierenden Tumorzellen gleich viele Antigene auf der Oberfläche tragen. Daher ist es von großer Bedeutung die Zellen so intensiv wie möglich zu färben, um auch solche mit gering exprimierten Oberflächenantigenen nachweisen

zu können. Angesichts der vielen Vorteile und der höheren gemessenen Fluoreszenzintensität wurde die Quantum Dot-Färbung weiter optimiert um effektiv und kosten effizient im automatisierten Aufbau färben zu können.

Die weiteren Optimierungen der Quantum Dot-Färbung wurden in einem konventionellen Durchflusszytometer durchgeführt, um während der Tests Probenmaterial sparen zu können. Wie in Abbildung 3.12 auf Seite 83 zu sehen, fluoreszieren die anti-EpCAM markierten Zellen stärker als die anti-Muc1 markierten Zellen. Bei dem Muc-1 Antikörper konnte mit 5 µg/mL eine leicht höhere Fluoreszenzintensität (728 [a.u.] (ungefärbte Zellen) auf 900 [a.u.]) erreicht werden. Durch den Einsatz von 2,5 µg/mL konnte keine Fluoreszenzfärbung festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der verwendete Antikörper keine hohe Affinität zu der Antigen determinate aufweist oder dass das Antigen Muc-1 auf den hier verwendeten MCF-7 Zellen schwach exprimiert wurde. Durch den Einsatz von anti-EpCAM Antikörpern konnte die Fluoreszenzintensität unter Verwendung von 2,5 µg/mL anti-EpCAM Antikörper die Fluoreszenzintensität auf $2,4 \times 10^4$ gesteigert werden.

4.2.1. Optimierung der Quantum Dot-Konzentration

Um die Färbung weiter zu optimieren, wurde die Quantum Dot-Konzentration titriert. Wie in Abbildung 3.13 auf Seite 84 zu sehen können die Quantum Dots in einer Konzentration von 5 nM eingesetzt werden. Dies ist im Vergleich zu der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration von 20 nM eine Ersparnis von 75 % bei gleich bleibender Fluoreszenzintensität [104]. Da sich bis zu einer Konzentration von 5 nM keine Unterschiede in der relativen Fluoreszenzintensität gezeigt haben, ist davon auszugehen, dass ab einer Konzentration von circa 5 nM die Lösung gesättigt ist und die Quantum Dots in Überschuss vorliegen. Das Einsparen von Verbrauchsmaterialien, wie beispielsweise Antikörper und Quantum Dots, ist für den späteren Einsatz von großem Vorteil: um personalisierte Analysen und somit Therapien durchführen zu können, müssen die Kosten für einen Test so gering wie möglich gehalten werden [143].

4.2.2. Optimierung des Protokollablaufs

Neben der Kostenoptimierung ist die Prozessdauer für einen Durchlauf ebenfalls relevant für automatisierte Systeme. Durch die Zwei-Schritt-Kopplung dauert die Fluoreszenzfärbung insgesamt 180 Minuten, da die Antikörper jeweils 60 Minuten inkubieren müssen und die magnetische Separation der Zellen jeweils 10 Minuten gedauert hat. Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, die beiden Schritte zu vereinen. Die Quantum Dots und die Antikörper wurden daher gleichzeitig zu den Zellen hinzugefügt. Wie in Abbildung 3.14 auf Seite 84 zu sehen ist, zeigt die Zwei-Schritt-Kopplung mit 2×10^4 [a.u.] die höchste Fluoreszenzintensität, die Ein-Schritt-Kopplung konnte bei gleicher Antikörperkonzentration ($2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) nur eine Fluoreszenzintensität von $0,4 \times 10^4$ [a.u.] erreichen. Durch den Einsatz von $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ anti-EpCAM Antikörper konnte die Fluoreszenzintensität allerdings wieder auf $1,3 \times 10^4$ gesteigert werden.

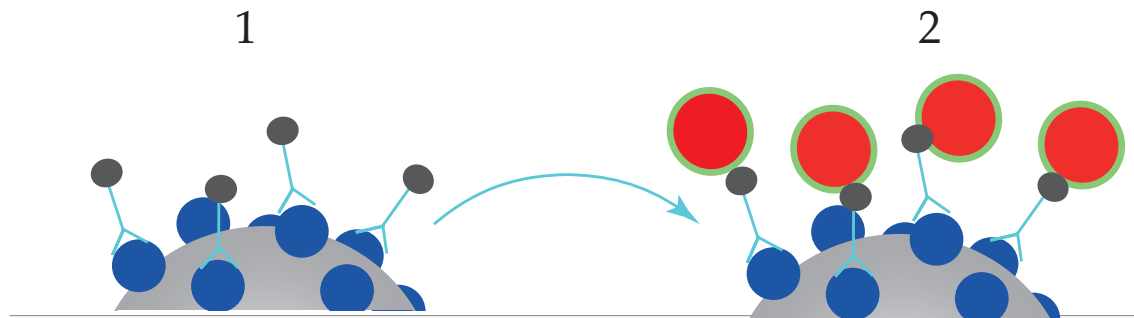
Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität könnten ebenfalls auf sterische Hinderungen zurückzuführen sein. Bei der Zwei-Schritt-Kopplung können die biotinmarkierten Antikörper zuerst ohne sterische Hinderungen an das Oberflächenantigen binden. Anschließend binden die Quantum Dots an die schon gebundenen Antikörper (siehe 113 in Abbildung 4.3).

Bei dem Ein-Schritt-Verfahren binden jedoch die Antikörper zuerst an die Quantum Dots, dadurch können mehrere Antikörper an ein Quantum Dot-Partikel binden. Infolgedessen entsteht ein großer Komplex aus einem Quantum Dot und mehreren Antikörpern (siehe Abbildung 4.3 auf Seite 113). Bindet dieses Gebilde nun an die Oberflächenmoleküle, kann es bei einem hoch exprimierten Antigen zu sterischen Hinderungen kommen [144].

Diese Erklärung wird gestützt durch die Beobachtung, dass bei einem geringeren Antikörper Einsatz in der Ein-Schritt-Kopplung die Fluoreszenzintensität wieder steigt. Denn durch eine geringe Anzahl von Antikörpern auf der Quantum Dot-Oberfläche kommt es wiederum zu einem kleineren Quantum Dot-Antikörper Komplex und folglich auch zu geringeren sterischen Hinderungen. Durch eine geringere Antikörperkonzentration von $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ kann also die Fluoreszenzintensität gesteigert und die Kosten pro Analyse gesenkt werden.

Aufgrund von Kapazitätsengpässen im Probenkarussell durch die übrigen Prozessschritte wurde für den automatisierten Ablauf die Ein-Schritt-Kopplung gewählt,

Zwei-Schritt-Protokoll



Ein-Schritt-Protokoll

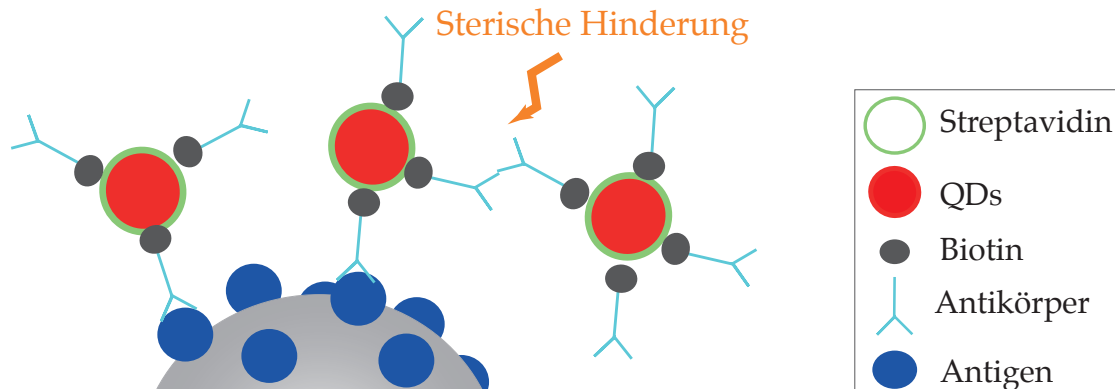


Abbildung 4.3.: Kopplung der Antikörper und Quantum Dots während des Ein-Schritt-Verfahrens und dem Zwei-Schritt-Verfahren. Beim Zwei-Schritt-Verfahren erfolgt zuerst eine Inkubation der Antikörper. Die ungebundenen Antikörper werden nach der Inkubation entfernt. Im Anschluss daran werden die Quantum Dots zu den Zellen hinzugegeben. Die Quantum Dots binden daraufhin an die Antikörper. Beim Ein-Schritt-Verfahren werden Quantum Dots und die Antikörper zuvor schon inkubiert. Dadurch können mehrere Antikörper an die Quantum Dots binden. Die größeren QDs und Antikörper Komplexe können dadurch sterische Hindernisse hervorrufen.

obgleich die Zwei-Schritt-Kopplung eine höhere Fluoreszenzintensität ermöglicht hätte, denn im Anschluss der Färbung müssen die Zellen in das scherviskose Medium Xanthan aufgenommen werden. Dafür wurde im Probenkarussell Position 6 vorgesehen. Mit der Zwei-Schritt-Kopplung wäre diese Position jedoch vollständig belegt und die Zellen hätten nicht in Xanthan aufgenommen werden können. Da die Zellen mit der Ein-Schritt-Kopplung noch sehr gut zu detektieren sind, und sich durch die Ein-Schritt-Kopplung überdies auch ein zeitlicher Gewinn von 70 Minuten (60 Minuten Inkubation und 10 Minuten magnetische Separation entfallen) ergibt, fiel für das automatisierte System die Wahl auf das Ein-Schritt-Verfahren.

4.2.3. Optimierung der QDs Inkubationszeiten

Zur Optimierung der Inkubationszeiten wurden die Zellen unterschiedlich lange mit den Quantum Dots inkubiert. Wie in Abbildung 3.15 auf Seite 85 zu sehen, ist die Fluoreszenzintensität im getesteten Zeitbereich nicht von der Inkubationszeit abhängig. Die Fluoreszenzkopplung an die Zellen ist also nach spätestens 15 Minuten vollständig abgeschlossen und es binden keine weiteren Quantum Dots an die Zelle. Gegenüber dem Zwei-Schritt-Protokoll können so 45 Minuten eingespart werden.. Die gesamte zeitliche Ersparnis liegt daher bei 85 Minuten.

4.2.4. Kreuzreaktionen der Quantum Dots

Durch die immunomagnetische Anreicherung und die darauf folgende Quantum Dot-Immurfärbung, konnte eine Steigerung der Fluoreszenzintensität erreicht werden (siehe Abbildung 3.17 auf Seite 87). Die Quantum Dots binden unspezifisch an die magnetischen Partikel und färben diese somit an. Durch die unspezifische Bindung der Quantum Dots an die magnetischen Partikel, wird die fluoreszierende Oberfläche der partikelmarkierten Zellen vergrößert. Dies führt, im Vergleich zu rein Quantum Dot-markierten Zellen ohne Partikel, zu einer circa dreifach höheren Fluoreszenzintensität. Die unspezifischen Wechselwirkungen der Quantum Dots werden auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt, die durch die Oberflächenbeschichtung mittels negativ geladenen Carboxylgruppen entstehen [145, 146]. Die fluoreszenzmarkierten magnetischen Partikel sind in einer hohen Konzentration in der Suspension vorhanden. Sie erscheinen also als quasi-kontinuierlicher Strom im Detektionskanal und durch ihre Fluoreszenz erhöhen sie das Hintergrundrauschen im Signal des Detektors.

4.2.5. Färbepufferoptimierung

Die Quantum Dot-Färbung der Zellen muss laut Herstellerprotokoll in einem Puffer mit 6 % Bovines Serum Albumin (BSA) durchgeführt werden [104]. BSA ist ein globuläres Protein welches häufig zur Stabilisierung und zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen zwischen Proteinen und der Wand des Reaktionsgefäßes verwendet wird. Jedoch wird es aufgrund der globulären Struktur

und der daraus resultierenden schaubildenden Eigenschaft häufig als schaubildendes Modellprotein eingesetzt [147]. Da BSA in einer hohen Konzentration eingesetzt werden muss, kommt es durch das Mischen der Probe durch aspirieren und dispensieren im automatisierten Aufbau zu starker Blasenbildung (siehe Abbildung 3.18, Seite 88). Eine entstandene Luftblase kann durch das BSA Proteine weiter stabilisiert werden [148].

Durch den entstandenen Schaum wurde das absolute Probenvolumen vergrößert; das Volumen das von der Pipettenspitze aufgenommen werden kann, bleibt jedoch gleich. Daher kommt es dazu, dass der Schaum nicht vollständig aufgenommen werden kann und im Reaktionsgefäß zurück bleibt.

Um dieses Problem zu verhindern, wurde die 6 % BSA-Lösung mit einem Antischaummittel aus 30 % Polydimethylsiloxan (PDMS) versetzt. PDMS ist das in industriellen Prozessen am häufigsten eingesetzte Antischaummittel. Die schaumminhibierende Wirkung kann auf die Destabilisierung der Lamellenoberfläche der Luftblasen zurückgeführt werden [149].

Wie in Abbildung 3.19 auf der Seite 88 zu sehen, kann die Schaumbildung mit diesem Additiv verhindert werden. Um etwaige negative Auswirkung des Antischaummittels auf die Fluoreszenzintensität und die Zellvitalität zu untersuchen, wurden entsprechende Versuchsreihen durchgeführt. Wie in Abbildung 3.18 auf der Seite 88 zu sehen, nimmt die Fluoreszenzintensität der Zellen nach der Inkubation mit dem Antischaummittel versetztem Färbepuffer nicht ab, jedoch sinkt die Zellzahl nach einer Inkubation mit 0,004 %-iger und 0,04 %-iger Antischaummittel Konzentration. Hingegen kann bei einer Antischaumkonzentration von 0,0004 % kein Einfluss auf die Vitalität und Fluoreszenzintensität gemessen und trotzdem eine signifikante Abnahme der Schaumbildungsneigung beobachtet werden. Die Auswirkungen von Antischaummitteln auf Zellen sind zurzeit noch kaum untersucht. Antischaummittel können einen Einfluss auf Zellen und ihre Proteinexpression haben. Da die genaue Zusammensetzung des Antischaummittels jedoch vom Hersteller nicht preisgegeben wird, ist es schwer abzuschätzen, welche Komponenten in dem Additiv die Zellvitalität der Zellen beeinträchtigen [148].

4.3. Prozesszeit

Im Bereich der personalisierten Medizin spielt neben der kostengünstigen Durchführung auch die Prozesszeit eine große Rolle. Zum einem sollte die Bearbeitungszeit, die ein Anwender benötigt so gering wie möglich gehalten werden. Zum Anderen ist es von Vorteil, wenn die Probe schnellstmöglich prozessiert werden kann, um einen hohen Probendurchsatz im Laboralltag gewährleisten zu können. Die geringe Arbeitszeit für den Anwender wird bei dem hier entwickelten System durch die vollständige Automatisierung gewährleistet.

Um eine kurze Prozesszeit zu erreichen, wurden wie zuvor schon erwähnt, die verschiedenen Inkubationszeiten und -Schritte optimiert und verkürzt. Durch diese Optimierungen ist das Gerät derzeit in der Lage innerhalb von 200 Minuten eine 7,5 mL Blutprobe aufzureinigen, die Zellen mit Quantum Dots zu färben und die angereicherten, gefärbten Tumorzellen in dem Transportmedium Xanthan zu resuspendieren. Die Prozesszeiten bei anderen CTC Anreicherungssystemen bewegen sich zwischen 90 und 575 Minuten, wobei die manuelle Proben Bearbeitungszeit bei allen Systemen bei mindestens 30 Minuten liegt. Da bei dem hier entwickelten System die Proben und Puffer nur noch in das Gerät gestellt werden müssen, liegt die Vorbereitungszeit mit ungefähr 10 Minuten unter der Bearbeitungszeit vieler Anreicherungssysteme[150].

4.4. Bestimmung der Reinheit - Detektion von Leukozyten

4.4.1. Kreuzreaktionen zwischen Leukozyten, Quantum Dots und Partikeln

Neben der Effektivität der Anreicherung spielt auch die Reinheit einer Probe bei der CTC Detektion eine große Rolle. Denn durch die Detektion von Leukozyten kommt es zu falsch-positiven Ergebnissen. Angesichts der geringen, für eine korrekte Prognose der Überlebenschancen eines Patienten jedoch ausschlaggebende Zahl an CTCs ist die Vermeidung falsch-positiver Resultate von großer Wichtigkeit [151].

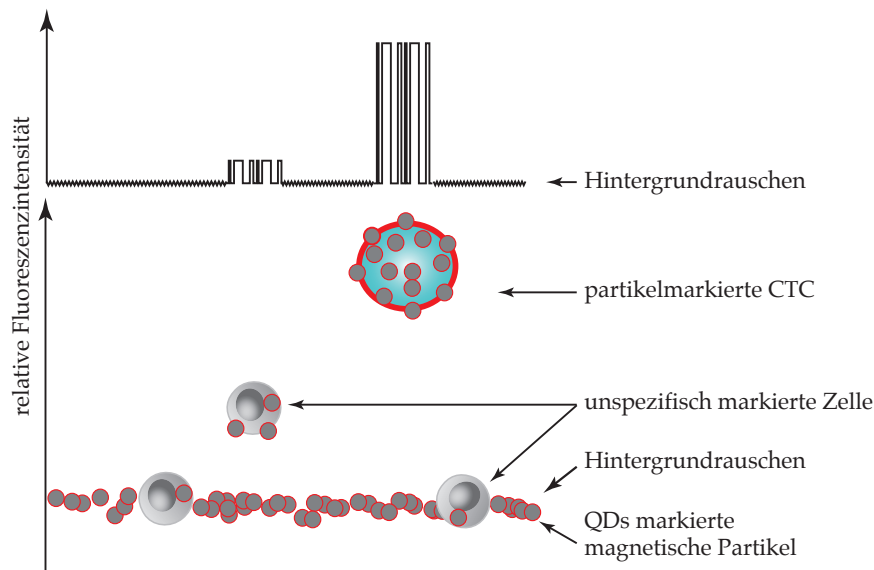


Abbildung 4.4.: Detektiertes Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Intensität der Fluoreszenzmarkierung. Leukozyten, die mit einem fluoreszenzmarkierten Partikel markiert sind, haben die gleiche Fluoreszenzintensität wie das Hintergrundrauschen und werden deshalb nicht detektiert. Zellen mit mehr als einem fluoreszenzmarkiertem Partikel werden detektiert. Die Intensität ist jedoch geringer als bei den spezifisch angefärbten CTCs.

Da in diesem System immunomagnetische Partikel verwendet wurden, kann eine Leukozytenkontamination beispielsweise über einen FC-vermittelten Mechanismus entstehen. Denn immunkompetente Zellen wie B-Zellen und T-Zellen (Bestandteil der Leukozytenpopulation) können über den auf den Zellen exprimierten Fc-Rezeptor unspezifisch an die Fc-Region (*engl. fragment crystallisable*) von Antikörpern binden, welche an die immunomagnetischen Partikeln gebunden sind. Durch die unspezifische Bindung der Leukozyten an die Partikel können Leukozyten als Beifang angereichert werden. Da die Partikel in diesem System jedoch durch die QDs mit angefärbt werden, besteht die Gefahr, dass die Leukozyten durch die unspezifisch gebundenen Partikel indirekt fluoreszenzmarkiert und somit detektiert werden können. In Abbildung 3.20 auf Seite 89 ist zu erkennen, dass die Leukozyten nicht durch die Partikel angefärbt werden, es besteht zwar die Möglichkeit, dass die Leukozyten an fluoreszenzmarkierte Partikel gebunden haben, diese werden allerdings erst dann detektiert, wenn die Fluoreszenzintensität der indirekt markierten Zellen über der Intensität des Hintergrundrauschens

liegt (siehe Abbildung 4.4). Dies bedeutet, dass mehrere fluoreszenzmarkierte magnetische Partikel an die Leukozyten gebunden haben müssen, um ein weißes Blutkörperchen detektieren zu können.

In diesem System wurde jedoch auch bei der Fluoreszenzmarkierung der CTCs auf antikörperspezifische Fluoreszenzfärbung gesetzt. Daher können die Leukozyten durch unspezifische Bindungen der Antikörper oder Quantum Dots an die Leukozyten direkt fluoreszenzmarkiert werden. Wie in Abbildung 3.20 auf Seite 89 zu sehen, wird durch die Inkubation von Leukozyten und Quantum Dots nur eine Zelle detektiert. Diese Zelle könnte jedoch aufgrund der niedrigen Fluoreszenzintensität als weißes Blutkörperchen ausgemacht werden.

Außerdem wird durch die Methode der räumlich modulierten Fluoreszenz ermöglicht, die Zellen nicht nur aufgrund der Fluoreszenzintensität voneinander zu unterscheiden. Neben der Fluoreszenzintensität wird nämlich zusätzlich die Transportgeschwindigkeit einer Zelle detektiert [78]. Da in mikrofluidischen Kanälen schon zuvor ein Zusammenhang der Zellgröße und Zellmorphologie mit der Transportgeschwindigkeit der Zellen festgestellt werden konnte, kann dies auch hier zur Differenzierung verwendet werden [83, 84]. Die kleineren Leukozyten (8,5-17 μm [46]) haben im Vergleich zu den größeren Krebszellen (20-30 μm [27]) eine langsamere Transportgeschwindigkeit (siehe Abbildung 3.22 auf Seite 91). Außerdem werden die kleineren Leukozyten unspezifisch fluoreszenzmarkiert und haben allein schon durch ihre geringere Größe eine niedrige relative Fluoreszenzintensität. Werden die beiden Informationen der Fluoreszenzintensität und Geschwindigkeit bei der Detektion berücksichtigt, kann die Reinheit der Probe erhöht und dadurch die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse verringert werden.

4.4.2. Minimierung des Leukozytenbeifangs durch Anpassung des Hüllstroms

Eine Leukozytenkontamination kann nicht nur Auswirkungen auf die detektierte Anzahl der Zellen haben, sondern auch die anschließenden molekularbiologischen Analysen beeinträchtigen. Leukozyten beinhalten beispielsweise Lactoferrin, welches zu den Haupt-PCR-Inhibitoren bei humanen Blutproben gehört. Lactoferrin

beinhaltet Eisen, welches während der PCR in die Probe abgegeben werden kann und dort die Synthese der DNA behindert [152].

Daher wurde überprüft, wie viele Leukozyten insgesamt nach einer Aufreinigung noch in der Probe vorhanden sind. Wie in Kapitel 2.2.18 zu sehen, konnten 98,6 % der Leukozyten entfernt werden. Bei einer Ausgangskonzentration von 84000 Leukozyten/mL sind nach der Aufreinigung insgesamt noch absolut 8520 Zellen (113 Zellen/mL) in der Probe. Die letztendliche Kontamination der dispensierten Zellen in den Kavitäten der Mikrotiterplatte ist jedoch viel geringer, denn die Leukozyten werden nur in eine Isolationskavität dispensiert, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe einer CTC im Probenfluss aufhalten. Der minimalen Abstand zwischen einer erwünschten Zelle und den umgebenden Leukozyten (Grenzwert für den Zellabstand) konnte wie in Kapitel 3.4.4 dargestellt berechnet werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen entspricht dies einem Abstand von mindestens 23,3 μm zwischen einer Zelle und der nächstgelegenen Leukozyte. Ist der Abstand kleiner, werden sie zusammen in eine Isolationskavität dispensiert.

Der mittlere Zellabstand kann in dem hier verwendeten System über das Verhältnis von Hüllstrom zum Probenstrom eingestellt werden. Wird die Hüllstromzufuhr erhöht, kommt es zu einer stärkeren Fokussierung der Probe und folglich auch zu einer höheren Verdünnung. Die Verdünnung hat wiederum zur Folge, dass der mittlere Zellabstand erhöht wird (Abbildung 3.24). Dies hat wiederum zur Folge, dass während des Dispensierens der Zielzelle, weniger Leukozyten als Beifang erfasst werden.

Allerdings muss beachtet werden, dass durch ein höheres Verhältnis von Hüllstrom zum Probenstrom die Prozesszeit ansteigt die benötigt wird, um die verdünnte Probe zu analysieren (siehe Abbildung 3.25, Seite 95). Daher muss ein Mittelweg gefunden werden, bei dem die Zielzellen mit möglichst wenigen Leukozyten im Hintergrund isoliert werden können und die Prozesszeit noch praktikabel ist.

Mit den hier verwendeten Parametern für den Hüllstroms (3 mL) ergibt sich mit einem Grenzwert für den Zellabstand die Wahrscheinlichkeit, dass in 82 % der Isolationskavitäten mindestens ein weißes

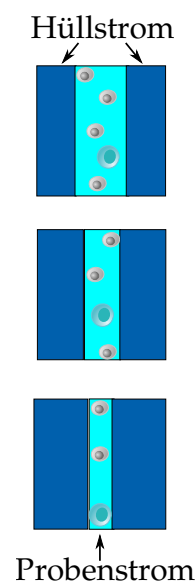


Abbildung 4.5.: Verdünnung der Probe durch erhöhten Hüllstrom

Blutkörperchen vorhanden ist und in circa 54 % der Fälle mindestens 3 Leukozyten. Die Dauer für eine Messung bei diesen Einstellungen beträgt 500 Sekunden. Um die Reinheit zu verbessern, könnte eine Hüllstromzufuhr von 9 mL eingestellt werden. Bei diesem Volumen verringert sich die Leukozytenkontamination so, dass nun nur noch 53 % der Kavitäten insgesamt kontaminiert sind. Nur 15 % der Kavitäten sind mit drei oder mehr Leukozyten kontaminiert. Auch die Prozesszeit bleibt mit circa 20 Minuten praktikabel.

Für viele Flüssigbiopsiesysteme sind keine Daten zur Reinheit vom Hersteller veröffentlicht; bei den Systemen, für die Daten veröffentlicht sind, wird eine „hohe“ Reinheit mit einer Leukozytenzahl von 500-1500 Zellen/mL angegeben [153, 154, 155]. Andere Systeme geben die Reinheit wiederum in relativ mit Bezug auf die Zahl der zu isolierenden Zellen an ($\frac{\text{Zielzellen}}{\text{Zielzellen} + \text{Leukozyten}} \times 100$) [27, 156, 96]. Je nachdem wie viele Zielzellen zuvor in der Probe waren, kann dadurch die Reinheit unabhängig von den gefangenen Leukozyten schlechter oder besser werden. Daher ist ein Vergleich der Reinheit unter den verschiedenen Anreicherungsplattformen über die prozentuale Depletion in Bezug auf die Zielzellen schwierig, wenn nicht die gleiche Ausgangszahl an CTCs oder eingebrachten Modellzellen verwendet wurde. Zumeist wird eine hohe Reinheit dann zwischen 50 und 97 % angegeben [48, 157]. Die genaue Reinheit kann für das in dieser Arbeit beschriebene System noch nicht angegeben werden, da ein vollständiger Durchlauf mit der Dispersion der einzelnen Zellen in die Isolationskavitäten noch nicht möglich war.

4.5. Gesamtgerät

Die Detektion und Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen ist im Moment eines der aktivsten Forschungsfelder in der translationalen und angewandten Krebsforschung. Mehr als 400 Studien beschäftigen sich derzeit mit dem Thema. Die Flüssigbiopsie ist dabei eine vielversprechende Methode im Kampf gegen den Krebs [158]. Peripheres Blut kann von Patienten einfach, regelmäßig, kostengünstig und ohne erhöhte Invasivität entnommen und analysiert werden. Die Analyse einer solchen Probe liefert dazu noch einen „Echtzeitstatus“ über den momentanen Krankheitsstatus des Patienten [159].

Das in dieser Arbeit entwickelte Anreicherungssystem hat einige Vorteile im Vergleich zu vielen auf dem Markt befindlichen Systemen. Zum einen konnte durch die Anreicherungseinheit eine Wiederfindungsrate von bis zu 96% erreicht werden, ohne dass die Probe zuvor durch manuelle Bearbeitungsschritte aufbereitet werden musste, wie es beispielsweise bei den kommerziellen Systemen IsoFlux, ApoStreamTM oder „CellSearch“ der Fall ist [54, 40, 91]. Manuelle Präparationsschritte vor der eigentlichen Anreicherung bergen die Gefahr, bereits im ersten Schritt Zellen zu verlieren und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit von falsch-negativen Ergebnissen. Dadurch, dass das hier beschriebene System ohne separaten manuellen Präparationsschritt der Blutprobe auskommt, konnte diese Wahrscheinlichkeit gesenkt und der Arbeitsaufwand minimiert werden. Eine direkte Verarbeitung der Probe mit Hilfe des hier entwickelten Systems ist daher von großem Vorteil.

Ein weiterer Vorteil des Systems ergibt sich aus der Automatisierung der Probenanalyse. Während bei vielen Anreicherungssystemen geschultes Personal die Zellen zytopathologisch begutachten muss, werden die Zellen bei dem hier entwickelten System durch eine automatisierte Detektion gezählt. Die vitalen detektierten Zellen können zudem vereinzelt in eine Mikrotiterplatte abgelegt werden und anschließend für Einzelzellanalysen verwendet werden, dies ist nach meinem besten Wissen bis jetzt mit keinem anderen Anreicherungssystem, welches sich auf dem Markt befindet, möglich.

Für den klinischen Einsatz bietet dieses Gerät neben den diagnostischen Vorteilen der Einzelzellanalyse weitere Vorteile. Beispielsweise senken die kommerziell erhältlichen Einwegartikel die Kosten für einen Testdurchlauf. Außerdem erlauben die zwei Module des Gerätes einen flexiblen Einsatz. Denn das Anreicherungsmodul kann unabhängig von der Detektionseinheit eingesetzt werden und umgekehrt. Dadurch wird ermöglicht, neben der normalen CTC-Aufreinigung und -Detektion, alternative Assays in dem Gerät durchzuführen. Das hier entwickelte System bietet also die Möglichkeit kostengünstig, mit hoher Sensitivität und wenig Arbeitsaufwand Tumorzellen anzureichern und nachzuweisen.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Nach einem automatisierten Komplettdurchlauf kann mit dem hier entwickelten System und den jetzigen Parametern eine Fangrate von ~62 % erwartet werden.

Durch separate Versuche in der Anreicherungseinheit, dem Probenmäanders im Chips und während des Dispensiervorganges, konnte ermittelt werden, an welcher Stelle im Gesamtgerät der größte Zellverlust auftritt. Durch die Anreicherungseinheit konnten 96 % der Zellen angereichert werden. Durch Projektinterne konnte eine Wiederfindungsrate von 77,5 % der im Detektionschip, nach dem Durchlauf des Mäanders ermittelt werden [160]. Während im Rahmen einer Masterarbeit eine Wiederfindungsrate von 88,5 % nach dem Dispensieren der Zellen festgestellt werden konnten [161]. Da beispielsweise der Test im Probenmäander aus zeitlichen Gründen bis jetzt nur zweimal durchgeführt werden konnte, ist zu erwarten, dass die Wiederfindungsraten durch weitere Optimierungen und Tests noch verbessert werden können.

Auch bei der Reinheit der Probe kann durch weitere Pufferoptimierung die Reinheit der Probe erhöht werden. Momentan kann eine Leukozytendepletion von circa 98,6 % erreicht werden.

Um die Kontamination durch Leukozyten weiter zu verringern, können in den nächsten Versuchen neben der Anpassung des Hüllstroms gekühlte Waschpuffer und der Einsatz eines FcR-Block-Agens getestet werden, [14]. Außerdem können die Parameter des Hüll- und Probenstroms an die berechneten Werte angepasst werden, sodass die Leukozytenkontamination in den Isolationskavitäten verringert wird.

Weiterhin kann das automatisierte Gerät verkleinert werden, da die Pipetten und -Magnethalterung der Anreicherungseinheit letztendlich nur im Bereich des Probenkarussells verfahrbar sein muss.

Neben der Anreicherung von CTCs kann das System auch in anderen Bereichen der Diagnostik eingesetzt werden. Beispielsweise kann durch die Anreicherung von fetalen throphoblastische Zellen aus maternalem Blut eine schonende pränatale Diagnostik durchgeführt werden, ohne Fötus und Mutter zu gefährden [162]. Außerdem kann das System auch bei der Ermittlung des Immunstatus von AIDS erkrankten (CD4-Zähler) eingesetzt werden.

Neben dem klinischen Einsatz kann das System beispielsweise auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden, um Bakterienverunreinigungen in der Getränkemittelherstellung zu überwachen.

Da die magnetischen Partikel und die Quantum Dots mit so gut wie jedem Antikörper funktionalisiert werden können und das System modular verwendet werden kann, ergibt sich ein breites Feld an möglichen Einsatzgebieten.

A. Programmabläufe

A.1. Programmablauf halb-automatisiert

Tabelle A.1.: Halb-automatisierter Programmablauf

Schritt	Flussrate (mL/min)	Dauer (sec)	Rotation	Speed (rpm)	Schleife	Pause (min)	Manuelle Einstellung
1	10	30	213	420	30X		
2	10	30	-213	420			
3	10	30	213	420		20	Magnete & Quetschventil anlegen
4	1	300	-213	42			
Pufferwechsel (PBS/0,1 % BSA), dann Magnet entfernen							
5	10	30	213	420	10X		
6	10	30	-213	420			
7	10	30	213	420		10	Magnete & Quetschventil anlegen
8	1	300	-213	42			
Pufferwechsel (PBS/0,1%BSA), dann Magnet entfernen Schritte 5-8 zweimal Wiederholen							

A.2. Programmablauf automatisierte Anreicherung

Spritze	aus					aus
Flussrate [ml/min]	40					10
Spritzen Vol. [ml]	-2					-7,75
Gemischtes Vol. Extrap. [mL]					1,5	
dauer [min]					30	
mischen rpm EP/ FP					76	
Gemischtes Vol. [mL]					5,7	
ml/min mischen					10	
Mischen rpm Pipette					45	
Endposition mischen					Misch- position	
Startposition mischen					Blut- probe	
Magnet	P. 1					
Karussell	P. 1					
Pipette horizontal	Startp.	Pipetten- position		Karussell- position		
rpm Pipette	900		900	900	900	900
Pipette vertikal	Z- Max.		Pipetten- spitze	Z- Max.	Blut- probe	Blut- probe
Pause [s]						
Kapitel	Startp.	Zu Pipetten- position fahren	Pipette aufnehmen	Zu Karussell- position	Blutprobe- Misch- position	Ab Blut-P. einsaugen
	1	2	3	4	5	6

Spritze							an	
Flussrate [ml/min]							1	
Spritzen Vol. [ml]							7,85	
gemischtes Vol. Extrap. [mL]								
Dauer [min]								
Mischen rpm EP/ FP								
Gemischtes Vol. [mL]								
ml/min mischen								
Mischen rpm Pipette								
Endposition mischen								
Startposition mischen								
Magnet					P. 2	P. 3		P. 1
Karussell								P. 2
Pipette horizontal								
rpm Pipette		45	85		900			900
Pipette vertikal		Extraposition	Karussell		Ablassen			Z- Max.
Pause [s]				5	200	400		
Kapitel		Bis extra-P. einsaugen	komplett einsaugen	Warten	Magnetpos.2	Magnetpos.3	verwerfe Blut	Pipette oben/ Karussell Rotation Position 2
	7		8	9	10	11	12	13

Spritze		aus			aus
Flussrate [ml/min]		10			10
Spritzen Vol. [ml]		-4,18			-1
Gemischtes Vol. Extrap. [mL]	1,65			0,95	
Dauer [min]	10			1	
Mischen rpm EP/ FP	76			120	
Gemischtes Vol. [mL]	3,3			0,95	
ml/min mischen	10			10	
Mischen rpm Pipette	45			45	
Endposition mischen	Misch- position			Karussell- position	
Startposition mischen	Wasch- puffer			Fluor- eszenzpos.	
Magnet					
Karussell					
Pipette horizontal					
rpm Pipette	900	900			900
Pipette vertikal	Wasch- puffer	Wasch- puffer	Fluo- reszenzpos.		Fluo- reszenzpos.
Pause [s]					
Kapitel	Resuspen- dieren (5mL WP)	Aufsaugen	Einsaugen bis Fluo- reszenzposition	Konusmischen	Puffer einsaugen
	14	15	16	17	18

Spritze					an	
Flussrate [ml/min]					1	
Spritzen Vol. [ml]					5,35	
gemischtes Vol. Extrap. [mL]						
dauer [min]						
mischen rpm EP/ FP						
Gemischtes Vol. [mL]						
ml/min mischen						
Mischen rpm Pipette						
Endpos. mischen						
Startposition mischen						
Magnet			P.2	P.3		p.1
Karussell						P.3
Pipette horizontal						
rpm Pipette	130		900			900
Pipette vertikal	Karussell		Ablassposition			Z- Max.
Pause [s]		2	200	400		
Kapitel	Puffer komplett einsaugen	Pause	Magnetpos.2	Magnetpos.3	Verwerfe Puffer	Pipette oben / Karussell Rotation P. 3
	19	20	21	22	23	24

Spritze		aus			aus	
Flussrate [ml/min]		10			10	
Spritzen Vol. [ml]		4,18			-1	
gemischtes Vol. Extrap. [mL]	1,65			0,95		
dauer [min]	10			1		
mischen rpm EP/ FP	76			120		
Gemischtes Vol. [mL]	3,3			0,95		
ml/min mischen	10			10		
Mischen rpm Pipette	45			45		
Endpos. mischen	Misch- position			Karussellposition		
Startposition mischen	Wasch- puffer			Fluor- eszenzpos.		
Magnet						
Karussell						
Pipette horizontal						
rpm Pipette	900	900	45		900	130
Pipette vertikal	Wasch- puffer	Wasch- puffer	Fluo- reszenzpos.			Karu- ssell
Pause [s]						
Kapitel	Resuspen- dieren (5mL WP)	Einsaugen	Einsaugen bis zu Fluo- reszenzpos.	Mischen im Konus	Puffer aufsaugen	komplett einsaugen
	25	26	27	28	29	30

					an			
					1			
					5,35			
								0,95
								1
								120
								0,95
								10
								45
								Karussell- reszenzpos.position
								Fluo- reszenzpos.
			P. 2	P. 3		p. 1		
						P. 4		
			900			900		45
			Ablas- position			Z- Max.	Fluor- eszenzpos.	
		2	200	400				
	Pause		Magnetpos.2	Magnetpos.3	Verwerfe Puffer	Pipette hoch/Rotation zu Karusell P. 4	Bis Fluores- zenzpos.	einsaugen Mischen im Konus
31								
32								
33								
34								
35								
38								
39								

Spritze	aus				an		an
Flussrate [ml/min]	10				1		1
Spritzen Vol. [ml]	-1				2,35		2
gemischtes Vol. Extrap. [mL]							
dauer [min]							
mischen rpm EP/ FP							
Gemischtes Vol. [mL]							
ml/min mischen							
Mischen rpm Pipette							
Endpos. mischen							
Startposition mischen							
Magnet				P. 2			
Karussell							
Pipette horizontal							
rpm Pipette	900	130		900			
Pipette vertikal	Fluor- eszenzpos.	Karu- ssell		Ablass- position			
Pause [s]			2	200		200	
Kapitel	Puffer einsaugen	Einsaugen bis Boden	Pause	Magnetpos2	Verwerfe Puffer	Pause	Waste buffer 2
	40	41	42	43	44	45	46

Spritze				aus		
Flussrate [ml/min]				5		
Spritzen Vol. [ml]				-1,1		
gemischtes Vol. Extrap. [mL]			1,2			
dauer [min]			5			
mischen rpm EP/ FP			110			
Gemischtes Vol.			1,2			
ml/min mischen			10			
Mischen rpm Pipette			57			
Endpos. mischen			Karussell- position			
Startposition mischen			Fluor- eszenz- pos.			
Magnet		P.1				
Karussell		P.5				
Pipette horizontal						
rpm Pipette		900	900	900	900	
Pipette vertikal		Z- Max.	Fluo- reszenzpos.	Fluor- eszenzpos.	Z- Max.	
Pause [s]						1
Kapitel	Pipette hoch/ Rotation zu Karussell P. 5		Fluo- reszenz- farbstoff	mischen Ab Farbstoff P. einsaugen	Probe in Chip überführen	waiting
	47		48	49	52	53

Spritze	an	
Flussrate [ml/min]	5	
Spritzen Vol. [ml]	1,2	
gemischtes Vol. Extrap. [mL]		
dauer [min]		
mischen rpm EP/ FP		
Gemischtes Vol.		
ml/min mischen		
Mischen rpm Pipette		
Endpos. mischen		
Startposition mischen		
Magnet		
Karussell		
Pipette horizontal		
rpm Pipette		
Pipette vertikal		
Pause [s]		
Kapitel	dispense sample	reset syringe
	54	55

Tabelle A.2.: Vertikale Positionen der Pipettenhalterung

Position	Vertikaler Verfahrweg in mm
Blutprobe	105,0
Pipettenspitze	113,0
Waschpuffer 5 mL	123,0
Waschpuffer 3,5 mL	129,0
Mischposition	161,0
Fluoreszenzfarbstoff	150,0
Karussell	164,7
Ablassposition	51,0
Extraposition	154,0

Tabelle A.3.: Horizontale Positionen der Pipettenhalterung

Position	Horizontaler Verfahrweg in mm
Pipettenspitze	292,00
Karussell	157,50

Tabelle A.4.: Spritzeneinstellung

Einstellung	Werte
Motorstrom	400 mA
Spritzengeschwindigkeit	1,143 mm/s
Vorschub pro Vollschrift	6,35 μ m
Winkel pro Vollschrift	1,8°
Spritzenvolumen	10 mL
unteres Drucklimit	8 mbar
oberes Drucklimit	10 mbar

Tabelle A.5.: Motoreinstellung der Pipettenhalterung

Einstellung	Werte
Winkel pro Vollschrift	1,8°
Motorstrom	800 mA
Frequenz	775 Hz

Nomenklatur

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
BMBF	Bundesministeriums für Bildung und Forschung
BSA	Bovines Serumalbumin
CD45	eng.: cluster differentiation 45
CdS	Cadmiumsulfid
CdSe	Cadmiumselen
CdTe	Cadmiumtellurid
cfDNA	zellfreie DNA, engl. cell free DNA
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
Ci3-Cluster	Cluster für Individualisierte Immunintervention
CTC	zirkulierende Tumorzelle , engl. circulating tumor cell
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindo
DEP	Dielektrophoretisch
DLD	Deterministic lateral displacement, Deterministische Laterale Ablenkung
DMSO	Dimethylsulfidoxid
ECE	Electrical Current Exclusion, Elektrischer Stomausschluss

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-mesenchymalen Transition
EpCAM	engl.: epithelial cell adhesion molecule, Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ICC	immunhistochemisch
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
MEM	nicht essentielle aminosäuren, minimal essential medium
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
mM	Millimolar
Muc1	Mucin 1
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nM	Nano Molar
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, eng.: Phosphat buffered saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFF	Pinched flow fraction
RBK	Rote Blutkörperchen
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur

Nomenklatur

WBK	Weiße Blutkörperchen
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl.: World Health Organization
ZnS	Zinksulfid
FDA	Food and Drug Administration, behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA
min	Minuten
W	Watt

Abbildungsverzeichnis

1.1. Prozess der Metastasierung	6
1.2. CTC-Anreicherung	10
1.3. Größenbasierte Anreicherung	12
1.4. Zellgröße	13
1.5. Dielektrophoretische (DEP) Separation	13
1.6. Dichtebasierte Separationstechnik	16
1.7. Antikörperbasierte Isolationstechniken	17
1.8. Konventionelle Durchflusszytometrie	22
1.9. Räumlich modulierte Fluoreszenzemission	23
1.10. Gleichgewichtsposition	23
1.11. Spektrale Eigenschaften von Quantum Dots	25
1.12. Gewünschter Ablauf	26
2.1. Noppenrührer und Excenter	41
2.2. Ziege anti-Maus-Partikel	42
2.3. Chemische Reaktion während der Funktionalisierung der Partikel	43
2.4. Carboxylbeschichtete Partikel	43
2.5. Streptavidinpartikel	44
2.6. Genereller Ablauf der immunomagnetischen Anreicherung	45
2.7. Ablauf der Anreicherung	46
2.8. Pipettenspitze	46
2.9. Halb-automatisierte Anreicherung	47
2.10. Seitliche Darstellung des halb-automatisierten Anreicherungssystems	48
2.11. Automatisiertes Anreicherungsmodul	49
2.12. Probenkarussell	50
2.13. Positionen der Magnet- und Pipettenhalterung	51
2.14. Positionen der Pipettenspitze im Reaktionsgefäß	52
2.15. Positionen des Magnetarms	53

2.16. Seitliche Darstellung der „Magnetposition 1“	54
2.17. CTC-Markierung	59
2.18. Einwegchip	60
2.19. Versuchsaufbau der Detektionseinheit	61
2.20. Fluidik im Chip Schritt 1-3	62
2.21. Fluidik im Chip Schritt 4-6	63
2.22. Stößel mit einer Teflonhalbkugel zum Abdrücken der Quetschventile	63
2.23. Fluidik im Chip Schritt 7-9	64
2.24. Dichtegradientenzentrifugation	66
3.1. Vitalitätsverlust durch verschiedene Anreicherungssysteme	72
3.2. Rückstände von magnetischen Partikeln	73
3.3. Fangrate verschiedener Magnetpartikel im Standardversuch	74
3.4. Fangrate der GAM-Partikel in Abhängigkeit vom Tag der Funktio- nalisierung	74
3.5. Streptavidinpartikel nach Antikörperkopplung	75
3.6. Optimierung der 1 µm Streptavidinpartikel-Kopplung	76
3.7. Optimierung der Flüssigkeitsaufnahme	77
3.8. Fangeffizienz in unterschiedlichen Systemen	78
3.9. Ergebnisse des Puffertests	79
3.10. Sedimentationsverhalten von MCF-7 Zellen in PBS und Xanthan .	80
3.11. Fluoreszenzintensitäten verschiedener Farbstoffe	82
3.12. Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Antikörper und dessen Konzentration	83
3.13. Fluoreszenzintensitäten unterschiedlicher QD-Konzentrationen . .	84
3.14. Ein-Schritt-Protokoll vs. Zwei-Schritt-Protokoll	84
3.15. Unterschiedliche Inkubationszeiten des Fluoreszenzfarbstoffes . . .	85
3.16. Magnetpartikel- und fluoreszenzmarkierte MCF-7 Zellen	86
3.17. MCF-7 Zellen inkubiert mit Magnetpartikeln und Quantum Dots .	87
3.18. Optimierung des Färbepuffers durch Antischaummittel	88
3.19. Färbepuffer mit und ohne Antischaum	88
3.20. Kreuzreaktionen der Leukozyten	89
3.21. Leukozytenkontamination	90
3.22. Messung von MCF-7 Zellen und Leukozyten	91
3.23. Wahrscheinlichkeitsverteilung der Zellabstände	93

3.24. Wahrscheinlichkeit der Leukozytenkontamination bei unterschiedlichen Verdünnungen der Probe durch den Hüllstrom.	94
3.25. Wahrscheinlichkeit der Leukozytenkontamination in einer Isolationskavität	95
3.26. Wahrscheinlichkeit von unterschiedlicher Leukozytenanzahl in einer Isolationskavität in Abhängigkeit von der Verdünnung	96
3.27. Gesamtgerät	97
4.1. Kopplungsverhalten der Streptavidinpartikel in Abhängigkeit von der Zugabe von Biotin.	104
4.2. Magnetische Zellbeladung in Abhängigkeit der Größe der Magnetpartikel	105
4.3. Sterische Hinderungen durch die Ein-Schritt-Kopplung	113
4.4. Detektiertes Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Intensität der Fluoreszenzmarkierung	117
4.5. Verdünnung der Probe durch erhöhten Hüllstrom	119

Tabellenverzeichnis

2.1. Zelllinie	29
2.2. Blutproben	29
2.3. Bioreagenzien und Chemikalien	30
2.4. Magnetische Partikel	32
2.5. Geräte	32
2.6. Verbrauchsmaterialien	34
2.7. Verbaute Materialien	34
2.8. Verwendete Software	35
2.9. Angesetzte Puffer	35
2.10. Zellkulturmedium	37
2.11. Parameter für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit des Leuko- zytenbeifangs	68
3.1. Gemessene Zellzahl nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit An- tischäum	88
A.1. Halb-automatisierter Programmablauf	125
A.2. Vertikale Positionen der Pipettenhalterung	136
A.3. Horizontale Positionen der Pipettenhalterung	136
A.4. Spritzeneinstellung	136
A.5. Motoreinstellung der Pipettenhalterung	136

Literaturverzeichnis

- [1] C. Wagener and O. Müller. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen*. Thieme, 2010.
- [2] Thomas Graf. Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache- Pressemitteilung. *Statistisches Bundesamt*, Februar 2013.
- [3] Kietzmann T. et al. Püschel G., Kühn H. *Taschenlehrbuch Biochemie*. Thieme Publishing Group, 2011.
- [4] S. A. Joosse, T. M. Gorges, and K. Pantel. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells, 2014.
- [5] Gerhard Christofori. New signals from the invasive front. *Nature*, 441(7092):444–450, May 2006.
- [6] Jean Paul Thiery, Hervé Acloque, Ruby Y J. Huang, and M Angela Nieto. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5):871–890, Nov 2009.
- [7] Raghu Kalluri and Robert A. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6):1420–1428, 2009.
- [8] Yi Dong, Alison M. Skelley, Keith D. Merdek, Kam M. Sprott, Chunsheng Jiang, William E. Pierceall, Jessie Lin, Michael Stocum, Walter P. Carney, and Denis A. Smirnov. Microfluidics and Circulating Tumor Cells. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 15(2):149–157, 2013.
- [9] Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Med J*, (14):146–149, 1896.
- [10] Catherine Alix-Panabières and Klaus Pantel. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*, 59(1):110–118, Jan 2013.

- [11] Klaus Pantel and Catherine Alix-Panabières. The potential of circulating tumor cells as a liquid biopsy to guide therapy in prostate cancer. *Cancer Discov*, 2(11):974–975, Nov 2012.
- [12] M. Ignatiadis and M. Piccart. Liquid biopsy to test new treatment strategies in breast cancer: are we there yet? *Annals of Oncology*, 23(7):1653–1655, Apr 2012.
- [13] E. Dahl, A. Jung, J. Fassunke, M. Hummel, R. Penzel, W. Dietmaier, and S. Lassmann. Chancen und Risiken der blutbasierten molekularpathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie. *Der Pathologe*, 36(1):92–97, Dec 2014.
- [14] U. Sack, A. Tarnok, and G. Rothe. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*. Karger, 2007.
- [15] Konstantin Yakimchuk. Exosomes: isolation methods and specific markers. *MATER METHODS*, 5, 2015.
- [16] Bellingham Shayne A. Guo Belinda B. Coleman Bradley M. Hill Andrew F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physio.*, 3, 2012.
- [17] Angela Toss, Zhaomei Mu, Sandra Fernandez, and Massimo Cristofanilli. Ctc enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med*, 2(11):108, Nov 2014.
- [18] D. F. Hayes and C. Paoletti. Circulating tumour cells: insights into tumour heterogeneity, 2013.
- [19] D. F. Hayes. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical Cancer Research*, 12(14):4218–4224, Jul 2006.
- [20] François-Clément Bidard, Dieter J Peeters, Tanja Fehm, Franco Nolé, Rafael Gisbert-Criado, Dimitrios Mavroudis, Salvatore Grisanti, Daniele Generali, Jose A Garcia-Saenz, Justin Stebbing, and et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*, 15(4):406–414, Apr 2014.

- [21] Lori M. Millner, Mark W. Linder, and Roland Valdes, Jr. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. *Ann Clin Lab Sci*, 43(3):295–304, 2013.
- [22] F. Nolé, E. Munzone, L. Zorzino, I. Minchella, M. Salvatici, E. Botteri, M. Medici, E. Verri, L. Adamoli, N. Rotmensz, and et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Annals of Oncology*, 19(5):891–897, Jan 2008.
- [23] S. L. Stott, R. J. Lee, S. Nagrath, M. Yu, D. T. Miyamoto, L. Ulkus, E. J. Inserra, M. Ulman, S. Springer, Z. Nakamura, and et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Science Translational Medicine*, 2(25):25–25, Mar 2010.
- [24] B. M. Smith, M. J. Slade, J. English, H. Graham, M. Lüchtenborg, H. D. Sinnott, N. C. Cross, and R. C. Coombes. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*, 18(7):1432–1439, Apr 2000.
- [25] D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, Jan 2000.
- [26] Ann F. Chambers, Alan C. Groom, and Ian C. MacDonald. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8):563–572, Aug 2002.
- [27] Hadi Esmaeilsabzali, Timothy V. Beischlag, Michael E. Cox, Ash M. Parameswaran, and Edward J. Park. *Detection and Isolation of Circulating Tumor Cells: Principles and Methods*, 2013.
- [28] Sunitha Nagrath, Lecia V. Sequist, Shyamala Maheswaran, Daphne W. Bell, Daniel Irimia, Lindsey Ulkus, Matthew R. Smith, Eunice L. Kwak, Subba Digumarthy, Alona Muzikansky, Paula Ryan, Ulysses J. Balis, Ronald G. Tompkins, Daniel A. Haber, and Mehmet Toner. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173):1235–1239, 2007.
- [29] Catherine Alix-Panabières and Klaus Pantel. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*, 14(9):623–631, Jul 2014.

- [30] Saumya Pant, Russell Weiner, and Matthew John Marton. Navigating the rapids : The development of ngs-based clinical trial assays and companion diagnostics. *Frontiers in Oncology*, 4(78), 2014.
- [31] Jan Trøst Jørgensen. Drug-diagnostics co-development in oncology. *Frontiers in Oncology*, 4(208), 2014.
- [32] Kewal K. Jain. Textbook of personalized medicine. 2015.
- [33] G. Duttge, W. Engel, B. Zoll, and Universität Göttingen. *Genetische Individualität im Recht*. Göttinger Schriften zum Medizinrecht. Universitätsverlag Göttingen c/o SUB Göttingen, 2012.
- [34] G. Attard and J. S. de Bono. Utilizing circulating tumor cells: Challenges and pitfalls. *Current opinion in genetics & development*, 21(1):50–58, 02.2011.
- [35] Dimple Chudasama, Alexandra Rice, Gopal Soppa, and Vladimir Anikin. Circulating tumour cells in patients with lung cancer undergoing endobronchial cryotherapy. *Cryobiology*, 71(1):161–163, Aug 2015.
- [36] Patrizia Paterlini-Brechot and Naoual Linda Benali. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions, 2007.
- [37] Swee Jin Tan, Rumkumar Lalitha Lakshmi, Pengfei Chen, Wan-Teck Lim, Levent Yobas, and Chwee Teck Lim. Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients, 2010.
- [38] Kevin Loutherbach, Joseph D’Silva, Liyu Liu, Amy Wu, Robert H. Austin, and James C. Sturm. Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min. *AIP Advances*, 2(4):042107, 2012.
- [39] Masumi Yamada, Megumi Nakashima, and Minoru Seki. Pinched flow fractionation: A continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Anal. Chem.*, 76(18):5465–5471, Sep 2004.
- [40] Vishal Gupta, Insiya Jafferji, Miguel Garza, Vladislava O. Melnikova, David K. Hasegawa, Ronald Pethig, and Darren W. Davis. Apostream, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 6(2):024133, 2012.

- [41] Swee Jin Tan, Levent Yobas, Gabriel Yew Hoe Lee, Choon Nam Ong, and Chwee Teck Lim. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood, 2009.
- [42] Hisham Mohamed, Megan Murray, James N. Turner, and Michele Caggana. Isolation of tumor cells using size and deformation. *J Chromatogr A*, 1216(47):8289–8295, Nov 2009.
- [43] Zaozao Chen, Shengyou Zhang, Zuming Tang, Pengfeng Xiao, Xiaoying Guo, and Zuhong Lu. Pool-dam structure based microfluidic devices for filtering tumor cells from blood mixtures. *Surf. Interface Anal.*, 38(6):996–1003, Jun 2006.
- [44] J. A. Davis, D. W. Inglis, K. J. Morton, D. A. Lawrence, L. R. Huang, S. Y. Chou, J. C. Sturm, and R. H. Austin. Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(40):14779–14784, Sep 2006.
- [45] Ali Asgar S. Bhagat, Hansen Bow, Han Wei Hou, Swee Jin Tan, Jongyoon Han, and Chwee Teck Lim. Microfluidics for cell separation. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 48(10):999–1014, Apr 2010.
- [46] Minseok S. Kim, Tae Seok Sim, Yeon Jeong Kim, Sun Soo Kim, Hyoyoung Jeong, Jong-Myeon Park, Hui-Sung Moon, Seung Il Kim, Ogan Gurel, Soo Suk Lee, Jeong-Gun Lee, and Jae Chan Park. SSA-MOA: a novel CTC isolation platform using selective size amplification (SSA) and a multi-obstacle architecture (MOA) filter. *Lab on a Chip*, 12(16):2874, 2012.
- [47] Robert L. Eifler, Judith Lind, Dieter Falkenhagen, Viktoria Weber, Michael B. Fischer, and Robert Zeillinger. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept. *Cytometry B Clin Cytom*, 80(2):100–111, Mar 2011.
- [48] R. A. Harouaka, M. Nisic, and S.-Y. Zheng. Circulating tumor cell enrichment based on physical properties. *Journal of Laboratory Automation*, 18(6):455–468, Jul 2013.
- [49] Ralf Gertler, Robert Rosenberg, Katrin Fuehrer, Michael Dahm, Hjalmar Nekarda, and Joerg Ruediger Siewert. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. In *Molecular Staging of Cancer*, pages 149–55. Springer, 2003.

- [50] R. Rosenberg, R. Gertler, J. Friederichs, K. Fuehrer, M. Dahm, R. Phelps, S. Thorban, H. Nekarda, and J. R. Siewert. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry*, 49(4):150–158, 2002.
- [51] Karine Jacob, Caroline Sollier, and Nada Jabado. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Review of Proteomics*, 4(6):741–756, 2007.
- [52] Shyamala Maheswaran and Daniel A. Haber. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev*, 20(1):96–99, Feb 2010.
- [53] Ashley A. Powell, AmirAli H. Talasaz, Haiyu Zhang, Marc A. Coram, Anupama Reddy, Glenn Deng, Melinda L. Telli, Ranjana H. Advani, Robert W. Carlson, Joseph A. Mollick, Shruti Sheth, Allison W. Kurian, James M. Ford, Frank E. Stockdale, Stephen R. Quake, R. Fabian Pease, Michael N. Mindrinos, Gyan Bhanot, Shanaz H. Dairkee, Ronald W. Davis, Stefanie S. Jeffrey, and Wei-Chun Chin. Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines, 2012.
- [54] Wael Harb, Andrea Fan, Tony Tran, Daniel C. Danila, David Keys, Michael Schwartz, and Cristian Ionescu-Zanetti. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qpcr assay. *Translational Oncology*, 6(5):528–IN1, Oct 2013.
- [55] Brian D. Plouffe, Madhumita Mahalanabis, Laura H. Lewis, Catherine M. Klapperich, and Shashi K. Murthy. Clinically Relevant Microfluidic Magnetophoretic Isolation of Rare-Cell Populations for Diagnostic and Therapeutic Monitoring Applications, 2012.
- [56] Chen-Lin Chen, Ken-Chao Chen, Yu-Cheng Pan, Tai-Ping Lee, Lo-Chang Hsiung, Cheng-Ming Lin, Chang-Yu Chen, Ching-Hung Lin, Bor-Luen Chiang, and Andrew M. Wo. Separation and detection of rare cells in a microfluidic disk via negative selection. *Lab Chip*, 11(3):474–483, Feb 2011.
- [57] Maryam Lustberg, Kris R. Jatana, Maciej Zborowski, and Jeffrey J. Chalmers. Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells. *Minimal Residual Disease and Circulating Tumor Cells in Breast Cancer*, pages 97–110, 2012.

- [58] M. Craig Miller, Gerald V. Doyle, and Leon W. M. M. Terstappen. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer, 2010.
- [59] A. H. Talasaz, A. A. Powell, D. E. Huber, J. G. Berbee, K.-H Roh, W. Yu, W. Xiao, M. M. Davis, R. F. Pease, M. N. Mindrinos, S. S. Jeffrey, and R. W. Davis. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10):3970–3975, 2009.
- [60] Chih-Chung Chen, Yu-An Chen, and Da-Jeng Yao. Centrifugal filter device for detection of rare cells with immuno-binding. *IEEE Trans Nanobioscience*, Oct 2015.
- [61] Zhian Liu, Alberto Fusi, Eva Klopocki, Alexander Schmittl, Ingeborg Tinhofer, Anika Nonnenmacher, and Ulrich Keilholz. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*, 9:70, 2011.
- [62] Udo Bilkenroth, Helge Taubert, Dagmar Riemann, Udo Rebmann, Hans Heynemann, and Axel Meye. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int. J. Cancer*, 92(4):577–582, 2001.
- [63] M. Zborowski and J.J. Chalmers. *Magnetic Cell Separation*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Science, 2011.
- [64] Liying Yang, James C. Lang, Priya Balasubramanian, Kris R. Jatana, David Schuller, Amit Agrawal, Maciej Zborowski, and Jeffrey J. Chalmers. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells, 2009.
- [65] Tobias M. Gorges, Ingeborg Tinhofer, Michael Drosch, Lars Röse, Thomas M. Zollner, Thomas Krahn, and Oliver von Ahsen. Circulating tumour cells escape from epcam-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 12:178, 2012.
- [66] Tohid Fatanat Didar and Maryam Tabrizian. Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic lab-on-chip devices. *Lab Chip*, 10(22):3043–3053, Nov 2010.

- [67] James P. Smith, Alexander C. Barbati, Steven M. Santana, Jason P. Gleghorn, and Brian J. Kirby. Microfluidic transport in microdevices for rare cell capture. *ELECTROPHORESIS*, 33(21):3133–3142, Oct 2012.
- [68] S. L. Stott, C.-H Hsu, D. I. Tsukrov, M. Yu, D. T. Miyamoto, B. A. Waltman, S. M. Rothenberg, A. M. Shah, M. E. Smas, G. K. Korir, F. P. Floyd, A. J. Gilman, J. B. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, L. V. Sequist, R. J. Lee, K. J. Isselbacher, S. Maheswaran, D. A. Haber, and M. Toner. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip, 2010.
- [69] Lecia V. Sequist, Sunitha Nagrath, Mehmet Toner, Daniel A. Haber, and Thomas J. Lynch. The CTC-chip: An exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 4(3):281–283, Mar 2009.
- [70] André A. Adams, Paul I. Okagbare, Juan Feng, Matuesz L. Hupert, Don Patterson, Jost Götttert, Robin L. McCarley, Dimitris Nikitopoulos, Michael C. Murphy, and Steven A. Soper. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 130(27):8633–8641, Jul 2008.
- [71] Nezihi Murat Karabacak, Philipp S Spuhler, Fabio Fachin, Eugene J Lim, Vincent Pai, Emre Ozkumur, Joseph M Martel, Nikola Kojic, Kyle Smith, Pin-i Chen, and et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nature Protocols*, 9(3):694–710, Feb 2014.
- [72] Sabine Riethdorf, Harriet Wikman, and Klaus Pantel. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*, 123(9):1991–2006, Nov 2008.
- [73] E. Andreopoulou, L.-Y. Yang, K. M. Rangel, J. M. Reuben, L. Hsu, S. Krishnamurthy, V. Valero, H. A. Fritsche, and M. Cristofanilli. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Adnagen adnatest breastcancer select/detect versus veridex cellsearch system. *Int. J. Cancer*, 130(7):1590–1597, Nov 2011.
- [74] Marco Danova, Martina Torchio, and Giuliano Mazzini. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Diagn*, 11(4), Jun 2011.

- [75] Joern Wittek. Entwicklung, Implementierung und Test von FPGA-basierten Algorithmen zur Echtzeitdetektion von fluoreszfluoreszenzm Teilchen im Durchfluss. Master's thesis, Johannes Gutenberg Universität, Januar 2014.
- [76] Howard M. Shapiro. *Practical Flow Cytometry*, volume 4. Wiley-Blackwell, Jun 2003.
- [77] F.S. Ligler and J.S. Kim. *The Microflow Cytometer*. Pan Stanford, 2010.
- [78] Peter Kiesel, Michael Bassler, Markus Beck, and Noble Johnson. Spatially modulated fluorescence emission from moving particles. *Applied Physics Letters*, 94(4):041107, 2009.
- [79] G. Segré and A. Silberberg. Radial particle displacements in poiseuille flow of suspensions. *Nature*, 189(4760):209–210, Jan 1961.
- [80] G. Segré and A. Silberberg. Behaviour of macroscopic rigid spheres in poiseuille flow part 2. experimental results and interpretation. *Journal of Fluid Mechanics*, 14(01):136, Sep 1962.
- [81] Mason S.G Goldsmith H.L. The flow of suspensions through tubes. i. single spheres, rods, and discs. *Journal of Colloid Science*, 17(5):448–476, Jun 1962.
- [82] Mason S.G. Karnis A., Goldsmith H.L. The kinetics of flowing dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 22(6):531–553, Dec 1966.
- [83] Christian Sommer. *Die Größenabhängigkeit der Gleichgewichtsgeschwindigkeit von Partikeln beim Transport in Mikrokanälen*. PhD thesis, TU Darmstadt, Darmstadt, Germany, November 2014.
- [84] Lisa Schott, Christian Sommer, Joern Wittek, Khaliun Myagmar, Thomas Walther, and Michael Bassler. Cell size discrimination based on the measurement of the equilibrium velocity in rectangular microchannels. *Micromachines*, 6(5):634–647, May 2015.
- [85] D. Issadore and R.M. Westervelt. *Point-of-Care Diagnostics on a Chip*. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [86] Igor L. Medintz, H Tetsuo Uyeda, Ellen R. Goldman, and Hedi Mattoussi. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*, 4(6):435–446, Jun 2005.

- [87] Margarida M. Barroso. Quantum dots in cell biology. *J Histochem Cytochem*, 59(3):237–251, Mar 2011.
- [88] Thermofisher. Fluorescence spectraviewer. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=QD625SA>, 2015.
- [89] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, and B. Häcker. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH-Verlag, 2011.
- [90] Thomas M. Jovin. Quantum dots finally come of age. *Nat Biotechnol*, 21(1):32–33, Jan 2003.
- [91] CellSearch. *Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial)*. Janssen Technical & Customer Support.
- [92] R. Fisher, L. Pusztai, and C. Swanton. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*, 108(3):479–485, Feb 2013.
- [93] Lori E. Lowes and Alison L. Allan. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells. *Cancers (Basel)*, 6(1):595–624, 2014.
- [94] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, and D. Myrtek. *Der Experimentator: Immunologie*. Experimentator. Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- [95] Jaehoon Chung, Huilin Shao, Thomas Reiner, David Issadore, Ralph Weissleder, and Hakho Lee. Microfluidic cell sorter (μ fcs) for on-chip capture and analysis of single cells. *Advanced Healthcare Materials*, 1(4):432–436, 2012.
- [96] Lei Xu, Xueying Mao, Ahmet Imrali, Ferriyal Syed, Katherine Mutsvangwa, Daniel Berney, Paul Cathcart, John Hines, Jonathan Shamash, and Yong-Jie Lu. Optimization and evaluation of a novel size based circulating tumor cell isolation system. *PLoS One*, 10(9):e0138032, 2015.
- [97] Bernd Glauner. Stromausschlussverfahren, Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *Biospektrum*, 2006.
- [98] Dynal Biotech ASA. *Isolate almost any cell type from any species with Secondary Coated Dynabeads*, 2005.
- [99] Ademtech SA. *Carboxyl-Ademabeads Coupling Kit Protocol*.
- [100] Invitrogen by life technologies. *Dynabeads MyOne Streptavidin T1 Protocol*.

- [101] ATTO-TEC GmbH. *Product Information: ATTO 465*, 02 2013.
- [102] M. Sauer, J. Hofkens, and J. Enderlein. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules*. Wiley, 2010.
- [103] G. Richter. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen*. Thieme, 2003.
- [104] Molecular Probes. *Qdot Streptavidin Conjugates*. Invitrogen, 2007.
- [105] B.W. Stewart and C.P. Wild. *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 2014.
- [106] Klaus Pantel and Ruud H. Brakenhoff. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4(6):448–456, Jun 2004.
- [107] Catherine Alix-Panabières, Volkmar Müller, and Klaus Pantel. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Curr Opin Oncol*, 19(6):558–563, Nov 2007.
- [108] Stephan Kruck, Georgios Gakis, and Arnulf Stenzl. Circulating and disseminated tumor cells in the management of advanced prostate cancer. *Adv Urol*, 2012:135281, 2012.
- [109] Steven J. Cohen, Cornelis J A. Punt, Nicholas Iannotti, Bruce H. Saidman, Kert D. Sabbath, Nashat Y. Gabrail, Joel Picus, Michael Morse, Edith Mitchell, M Craig Miller, Gerald V. Doyle, Henk Tissing, Leon W M M. Terstappen, and Neal J. Meropol. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26(19):3213–3221, Jul 2008.
- [110] Sabine Riethdorf, Volkmar Müller, Liling Zhang, Thomas Rau, Sibylle Loibl, Martina Komor, Marc Roller, Jens Huober, Tanja Fehm, Iris Schrader, Jörn Hilfrich, Frank Holms, Hans Tesch, Holger Eidtmann, Michael Untch, Gunter von Minckwitz, and Klaus Pantel. Detection and her2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant geparquattro trial. *Clin Cancer Res*, 16(9):2634–2645, May 2010.
- [111] T J N. Hiltermann, M. M. Pore, A. van den Berg, W. Timens, H. M. Boezen, J J W. Liesker, J. H. Schouwink, W J A. Wijnands, G S M A. Kerner, F A E. Kruyt, H. Tissing, A G J. Tibbe, L W M M. Terstappen, and H J M. Groen.

- Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol*, 23(11):2937–2942, Nov 2012.
- [112] Ugo De Giorgi, Michal Mego, Emanuela Scarpi, Mario Giuliano, Antonio Giordano, James M. Reuben, Vicente Valero, Naoto T. Ueno, Gabriel N. Hortobagyi, and Massimo Cristofanilli. Relationship between lymphocytopenia and circulating tumor cells as prognostic factors for overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 12(4):264–269, Aug 2012.
- [113] Natalia Bednarz-Knoll, Catherine Alix-Panabières, and Klaus Pantel. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*, 13(6):228, 2011.
- [114] Jaap den Toonder. Circulating tumor cells: the grand challenge. *Lab Chip*, 11(3):375–377, Feb 2011.
- [115] Klaus Pantel, Ruud H. Brakenhoff, and Burkhard Brandt. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8:329–340(5), 2008.
- [116] I Van der Auwera, D Peeters, I H Benoy, H J Elst, S J Van Laere, A ProvÃ©©, H Maes, P Huget, P van Dam, P B Vermeulen, and et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the cellsearch system, the adnatest and ck-19/mammaglobin RT-pcr in patients with metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer*, 102(2):276–284, Dec 2009.
- [117] Sannia Imrich, Matthias Hachmeister, and Olivier Gires. Epcam and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr*, 6(1):30–38, 2012.
- [118] Bernardina T F. van der Gun, Lieuwe J. Melchers, Marcel H J. Ruiters, Lou F M H. de Leij, Pamela M J. McLaughlin, and Marianne G. Rots. Epcam in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*, 31(11):1913–1921, Nov 2010.
- [119] Philip Th Went, Alessandro Lugli, Sandra Meier, Marcel Bundi, Martina Mirlacher, Guido Sauter, and Stephan Dirnhofer. Frequent epcam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35(1):122–128, Jan 2004.
- [120] P. Went, M. Vasei, L. Bubendorf, L. Terracciano, L. Tornillo, U. Riede, J. Kononen, R. Simon, G. Sauter, and P. A. Baeuerle. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target ep-cam in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer*, 94(1):128–135, Jan 2006.

- [121] Henry Lin, Marija Balic, Siyang Zheng, Ram Datar, and Richard J. Cote. Disseminated and circulating tumor cells: Role in effective cancer management. *Crit Rev Oncol Hematol*, 77(1):1–11, Jan 2011.
- [122] J.E. Liddell and A. Cryer. *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. Wiley, 1991.
- [123] Brian D. Plouffe, Laura H. Lewis, and Shashi K. Murthy. Computational design optimization for microfluidic magnetophoresis. *Biomicrofluidics*, 5(1):013413, 2011.
- [124] Kazunori Hoshino, Yu-Yen Huang, Nancy Lane, Michael Huebschman, Jonathan W. Uhr, Eugene P. Frenkel, and Xiaojing Zhang. Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 11(20):3449–3457, Oct 2011.
- [125] ab Silva Krauseb Heather Tobinb Akiko Mammotob Mathumai Kanapathipillaia Joo H. Kang and Donald E. A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells((, 2012.
- [126] Sunil Kumar Arya, Bing Lim, and Abdur Rub Abdur Rahman. Enrichment, Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cell. *Lab on a Chip*, 2013.
- [127] Lang James C. et.al. Yang Liying. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2):521–534, Feb 2009.
- [128] Andrew D. Hughes, Jeff Mattison, John D. Powderly, Bryan T. Greene, and Michael R. King. Rapid isolation of viable circulating tumor cells from patient blood samples. *JoVE*, (64), 2012.
- [129] M. Schena. *Protein Microarrays*. Jones and Bartlett, 2005.
- [130] Luis M. Martinez. *Magnetic-bead-coatings-today-and-tomorrow*, chapter 7, page 16. Sepmag.
- [131] Kara E. McCloskey, Jeffrey J. Chalmers, and Maciej Zborowski. Magnetic cell separation: characterization of magnetophoretic mobility. *Anal Chem*, 75(24):6868–6874, Dec 2003.
- [132] S. Sieben, C. Bergemann, A. Lübbe, B. Brockmann, and D. Rescheleit. Comparison of different particles and methods for magnetic isolation of circulating

- tumor cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225(1-2):175–179, 2001.
- [133] H.J. Boxberger. *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. EBL-Schweitzer. Wiley, 2013.
- [134] Kelley M. Fracchia, Christine Y. Pai, and Craig M. Walsh. Modulation of t cell metabolism and function through calcium signaling. *Frontiers in Immunology*, 4, 2013.
- [135] J. P. Freyer, D. Fillak, and J. H. Jett. Use of xanthan gum to suspend large particles during flow cytometric analysis and sorting. *Cytometry*, 10(6):803–806, Nov 1989.
- [136] Silvia Comba and Rajandrea Sethi. Stabilization of highly concentrated suspensions of iron nanoparticles using shear-thinning gels of xanthan gum. *Water Res*, 43(15):3717–3726, Aug 2009.
- [137] Peter Kiesel, Markus Beck, and Noble Johnson. Monitoring cd4 in whole blood with an opto-fluidic detector based on spatially modulated fluorescence emission. *Cytometry A*, 79(4):317–324, Apr 2011.
- [138] Stephan Quint. *Durchflusszytometrie nach dem Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz*. PhD thesis, TU Darmstadt, 2015.
- [139] Jin Hyun Kim, Hyun Hoon Chung, Min Sook Jeong, Mi Ryoung Song, Keon Wook Kang, and Jun Sung Kim. One-step detection of circulating tumor cells in ovarian cancer using enhanced fluorescent silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 8:2247–2257, 2013.
- [140] Sean K. Lau, Lawrence M. Weiss, and Peiguo G. Chu. Differential expression of muc1, muc2, and muc5Ac in carcinomas of various sites an immunohistochemical study. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(1):61–69, Jun 2004.
- [141] Yukihiro Tamura, Michiyo Higashi, Sho Kitamoto, Seiya Yokoyama, Masahiko Osako, Michiko Horinouchi, Takeshi Shimizu, Mineo Tabata, Surinder K. Batra, Masamichi Goto, and et al. Muc4 and muc1 expression in adenocarcinoma of the stomach correlates with vessel invasion and lymph node metastasis: An immunohistochemical study of early gastric cancer. *PLoS ONE*, 7(11):e49251, Nov 2012.

- [142] Catherine J. Murphy. Optical sensing with quantum dots. *Anal Chem*, 74(19):520A–526A, Oct 2002.
- [143] Kathryn A Phillips, Julie Ann Sakowski, Julia Trosman, Michael P Douglas, Su-Ying Liang, and Peter Neumann. The economic value of personalized medicine tests: what we know and what we need to know. *Genet Med*, 16(3):251–257, Oct 2013.
- [144] S. P. Kent, K. H. Ryan, and A. L. Siegel. Steric hindrance as a factor in the reaction of labeled antibody with cell surface antigenic determinants. *J Histochem Cytochem*, 26(8):618–621, Aug 1978.
- [145] Sandra J. Rosenthal, Jerry C. Chang, Oleg Kovtun, James R. McBride, and Ian D. Tomlinson. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chemistry & Biology*, 18(1):10–24, Jan 2011.
- [146] Elizabeth L. Bentzen, Ian D. Tomlinson, John Mason, Paul Gresch, Michael R. Warnement, David Wright, Elaine Sanders-Bush, Randy Blakely, and Sandra J. Rosenthal. Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug Chem*, 16(6):1488–1494, 2005.
- [147] M. Berovic. *New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*. Number Bd. 68 in *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Springer, 2000.
- [148] Sarah J. Routledge. Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity. *Comput Struct Biotechnol J*, 3:e201210014, 2012.
- [149] Carsten Penz. *Wirkungsmechanismus siloxanbasierender Schauminhibitoren in Mineralöl*. PhD thesis, Duisburg, Essen, Univ., Diss., 2005.
- [150] Bin Hong and Youli Zu. Detecting circulating tumor cells: Current challenges and new trends. *Theranostics*, 3(6):377–394, 2013.
- [151] Maria P. Wong. Circulating tumor cells as lung cancer biomarkers. *J Thorac Dis*, 4(6):631–634, Dec 2012.
- [152] J. Popp and M. Bauer. *Modern Techniques for Pathogen Detection*. Wiley, 2015.
- [153] Jessamine P. Winer-Jones, Behrad Vahidi, Norma Arquilevich, Cong Fang, Samuel Ferguson, Darren Harkins, Cory Hill, Erich Klem, Paul C. Pagano, Chrissy Peasley, Juan Romero, Robert Shartle, Robert C. Vasko, William M. Strauss, and Paul W. Dempsey. Circulating tumor cells: clinically relevant molecular access based on a novel ctc flow cell. *PLoS One*, 9(1):e86717, 2014.

- [154] Han Wei Hou, Majid Ebrahimi Warkiani, Bee Luan Khoo, Zi Rui Li, Ross A. Soo, Daniel Shao-Weng Tan, Wan-Teck Lim, Jongyoon Han, Ali Asgar S. Bhagat, and Chwee Teck Lim. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep*, 3:1259, 2013.
- [155] E. Ozkumur, A. M. Shah, J. C. Ciciliano, B. L. Emmink, D. T. Miyamoto, E. Brachtel, M. Yu, P.-i Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, S. L. Stott, N. M. Karabacak, T. A. Barber, J. R. Walsh, K. Smith, P. S. Spuhler, J. P. Sullivan, R. J. Lee, D. T. Ting, X. Luo, A. T. Shaw, A. Bardia, L. V. Sequist, D. N. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber, and M. Toner. Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and -Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells, 2013.
- [156] Masaru Watanabe, Masakuni Serizawa, Takeshi Sawada, Kazuo Takeda, Toshiaki Takahashi, Nobuyuki Yamamoto, Fumiaki Koizumi, and Yasuhiro Koh. A novel flow cytometry-based cell capture platform for the detection, capture and molecular characterization of rare tumor cells in blood. *J Transl Med*, 12(1):143, 2014.
- [157] Sunil K. Arya, Bing Lim, and Abdur Rub Abdur Rahman. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 13(11):1995, 2013.
- [158] Catherine Alix-Panabières and Klaus Pantel. Real-time liquid biopsy: circulating tumor cells versus circulating tumor dna. *Ann Transl Med*, 1(2):18, Jul 2013.
- [159] Elizabeth A. Punnoose, Siminder K. Atwal, Jill M. Spoerke, Heidi Savage, Ajay Pandita, Ru-Fang Yeh, Andrea Pirzkall, Bernard M. Fine, Lukas C. Amler, Daniel S. Chen, and Mark R. Lackner. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One*, 5(9):e12517, 2010.
- [160] C. Schwind. Wiederfindungsraten von Tumorzellen nach Durchfluss des Probenmänders. unveröffentlicht, 2015.
- [161] Stefan Lübke. Charakterisierung einer Dispensiereinheit zur Zellvereinzelung und Timing in einem Mikrofluidikchip, 2016.
- [162] S. S. Wachtel, D. Sammons, M. Manley, G. Wachtel, G. Twitty, J. Utermohlen, O. P. Phillips, L. P. Shulman, D. J. Taron, U. R. Müller, P. Koeppe, T. M.

Ruffalo, K. Addis, R. Porreco, J. Murata-Collins, N. B. Parker, and L. McGavran. Fetal cells in maternal blood: recovery by charge flow separation. *Hum Genet*, 98(2):162–166, Aug 1996.

