

## maintrac Zellzählung

Erfolgskontrolle unter Therapie

- Vor Therapiebeginn
- Unter Therapie
- Bei Therapieende

Überwachung Hormontherapie oder nach Therapie

unter Hormontherapie

unter Hormontherapie nach Therapieende

# maintrac

## Therapierelevante Eigenschaften (Preis zzgl. 1x maintrac Zellzählung)

- HER2/neu-Amplifikation (FISH)
- EGFR-Amplifikation (FISH)
- Apoptose-Nachweis (TUNEL)
- Östrogenrezeptor (ER)
- Progesteronrezeptor (PR)
- Androgenrezeptor (AR)
- PSA (Prostata-spezifisches Antigen)
- PSMA (Prostata-spezifisches Membranantigen)
- B7-H3 (Oberflächenantigen CD 276)
- Ki67 (Wachstumsfraktion)

- EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)
- VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)
- IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor)
- c-Kit (Stammzellfaktor-Rezeptor)
- Tissue Factor (Tumor-Koagulation)
- Thomsen-Friedenreich-Antigen (Leberantigen)
- PD-L1 (Immuntherapie)
- Antikörper gegen Tumorzellen

## Tumorspezifische Untersuchungen (Preis inkl. 1x maintrac Zellzählung)

- Brust (ER, PR, HER2/neu Amplifikation)
- Prostata (PSA, PSMA, B7-H3, AR)
- Lunge (EGFR Amplifikation)
- Eierstock (ER, PR)
- Melanom (Melan A)

- Sarkom (PLAP)
- Glioblastom (PLAP, EGFR)
- Tumore unbekannter Herkunft

Seite 1 von 2

# Zirkulierende epitheliale Tumorzellen Zusatzuntersuchungen



**simfo**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Wachstumsfaktorrezeptoren</b>	3
1.1 Human epidermal growth factor receptor 2 (Her2/neu)	3
1.2 Epidermal growth factor receptor (EGFR) und EGFR-Amplifikation	4
1.3 Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2)	4
1.4 Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)	5
1.5 Stammzellfaktor-Rezeptor (c-Kit)	5
<b>2. Hormonrezeptoren</b>	6
2.1 Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR)	6
2.2 Androgenrezeptor (AR)	7
<b>3. Prostata-assoziierte Marker</b>	8
3.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA) und prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)	8
<b>4. Aktivierungs- und Wachstumsmarker</b>	9
4.1 Wachstumsfraktion der Zellen (Ki-67)	9
<b>5. Adhäsionsmarker</b>	9
5.1 Gewebefaktor (Tissue Factor)	9
5.2 Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen)	10
<b>6. Immunmodulatorische Moleküle – neue Angriffspunkte in der Krebstherapie</b>	10
6.1 Programmierter Zelltod-Ligand 1 (PD-L1)	11
6.2 Oberflächenantigen CD 276 (B7-H3)	11
<b>7. Sonstige</b>	12
7.1 Apoptose-Nachweis durch TUNEL	12
7.2 Antikörper-Immunreaktion gegen Tumorzellen (Ig)	12
7.3 Plazenta-Alkalische-Phosphatase (PLAP)	13
7.4 Melan A (Mart-1)	13
<b>8. Probenversand</b>	14

# Zusatzuntersuchungen

Krebs ist für Patienten eine eingreifende, mit vielen Veränderungen und Folgen verbundene Diagnose. Medizin und Forschung werden durch diese hochkomplexe Erkrankung stark gefordert. Die Heterogenität und die schnelle Wandelbarkeit von Tumoren stellt eine besondere Herausforderung an die Diagnostik und Therapie dar. Genau hier setzt die SIMFO GmbH mit dem maintrac®-Verfahren an. Solide Tumoren geben Zellen in den Blutkreislauf ab. Ein Teil dieser zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (CETCs) sind für die Bildung von Metastasen verantwortlich. Mit Hilfe der maintrac®-Präzisionsdiagnostik können CETCs identifiziert und quantitativ erfasst werden. Aufgrund der hohen Sensitivität des Verfahrens, können bereits früh nach der Diagnose eines Primärtumors CETCs nachgewiesen und damit rechtzeitig Therapieentscheidungen getroffen werden. Diese frühzeitige Erkennung ist hauptsächlich dadurch bedingt, dass die Zellen weder fixiert, noch angereichert werden, sondern in Echtzeit aus der Blutprobe analysiert werden. Neben der quantitativen Erfassung, können mit Hilfe der CETCs auch weitere therapierelevante Tumoreigenschaften charakterisiert werden. Die zur Verfügung stehenden Verfahren und Möglichkeiten mit Bezug auf die jeweiligen Tumorentitäten und ein kleiner Einblick in die aktuelle Forschung werden auf den kommenden Seiten vorgestellt.

<b>Wachstumsfaktorrezeptoren</b>	<b>Hormonrezeptoren</b>	<b>Prostata-assoziierte Marker</b>
<b>Her2/neu</b> Human epidermal Wachstumsfaktor Rezeptor 2	<b>ER</b> Östrogenrezeptor	<b>PSA</b> Prostata-spezifisches Antigen
<b>EGFR</b> Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor und EGFR-Amplifikation	<b>PR</b> Progesteronrezeptor	<b>PSMA</b> prostata-spezifisches Membranantigen
<b>VEGFR2</b> Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2	<b>AR</b> Androgenrezeptor	
<b>IGF1R</b> Insulin-like Wachstumsfaktor-Rezeptor 1	<b>Adhäsionsmarker</b>	<b>Sonstige</b>
<b>c-Kit</b> Stammzellfaktor-Rezeptor	<b>Tissue Factor</b> Gewebefaktor	<b>TUNEL</b> Apoptose-Nachweis
<b>Immunmodulatorische Moleküle</b>	<b>TF-Antigen</b> Thomsen-Friedenreich-Antigen	<b>Ig</b> Antikörper-Immunreaktion gegen Tumorzellen
<b>PD-L1</b> Programmierter Zelltod-Ligand 1	<b>Aktivierungs- und Wachstumsmarker</b>	<b>PLAP</b> Plazenta-Alkalische-Phosphatase
<b>B7-H3</b> Oberflächenantigen CD 276 Inhibitor der T-Zell-Aktivierung	<b>Ki-67</b> Wachstumsfraktion der Zellen	<b>Mart-1</b> Melan A

# 1. Wachstumsfaktorrezeptoren

Die Wirkung von Wachstumsfaktoren wird über die Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle vermittelt. Die Rezeptor-Proteine reichen quer durch die gesamte Zellmembran (Transmembranrezeptoren). Durch Bindung spezifischer Liganden an die extrazelluläre Domäne findet eine Aktivierung des Rezeptors statt, wodurch verschiedene Signaltransduktionswege beeinflusst werden, die einen direkten Einfluss auf den Zellstoffwechsel haben oder die Transkription der Gene steuern. Durch den gezielten Einsatz von Medikamenten, die gegen solche Wachstumsfaktorrezeptoren gerichtet sind, erhofft man sich ein vermindertes Wachstum bzw. ein Absterben der Krebszellen. Mittlerweile ist der Einsatz einiger dieser Medikamente erst möglich, wenn (sobald) die Zielstrukturen auf den Krebszellen nachgewiesen worden sind.

## 1.1 Human epidermal growth factor receptor 2 (Her2/neu)

HER2/neu bezeichnet einen Wachstumsfaktorrezeptor und das diagnostisch relevante Gen ErB-B2. Der Rezeptor gehört in seiner Funktion als Tyrosinkinase zur Familie der ErB-Membran-Rezeptoren. Bei etwa 20-25 % der Fälle von Mammakarzinomen findet eine Vervielfachung (Amplifikation) des HER2/neu-Gens, verbunden mit einer Überexpression des zugehörigen HER2/neu-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Karzinomzellen statt. Im Vergleich zu normalen Körperzellen kann die Zahl der HER2/neu-Rezeptoren bei Krebszellen auf das 10- bis 100-fache gesteigert sein. Inzwischen kann auch bei anderen Krebsarten, z.B. bei Ösophaguskarzinomen oder Magenkarzinomen, gelegentlich eine HER2/neu-Überexpression nachgewiesen werden. Eine Methode, den HER2/neu Status zu bestimmen, führt über den Nachweis der HER2/neu-Genamplifikation an zirkulierenden Tumorzellen.

Die HER2/neu-Genamplifikation wird mit Hilfe der FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Analyse nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um ein zytogenetisches Verfahren. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden, die spezifisch an bestimmte Stellen der DNA auf den Chromosomen binden, kann nach mikroskopischer Auswertung die Anzahl der HER2/neu-Genkopien bestimmt werden. Eine gesunde Zelle enthält üblicherweise zwei Genkopien, während Krebszellen über deutlich mehr Kopien verfügen können. Klinisch dient der Nachweis der Genamplifikation und der daraus resultierenden Überexpression des HER2/neu-Rezeptors als wichtiger prognostischer Parameter beim Mammakarzinom und als Indikator für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Handelsname Herceptin©) und/oder Pertuzumab (Handelsname Perjeta©) und/oder T-DM1 (Handelsname Kadcyla©). Dieser therapeutische Ansatz ergab sich aus der Überlegung, den HER2/neu-Rezeptor zu blockieren und somit die wachstumsfördernden Signale zu blockieren.

## 1.2 Epidermal growth factor receptor (EGFR) und EGFR-Amplifikation

*Beim EGF-Rezeptor handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Rezeptor aus der Familie der Erb-Membran-Rezeptoren. Wie HER2/neu gehört auch er zur Gruppe der Wachstumsfaktorrezeptoren.*

*Der EGF-Rezeptor ist auf allen Zellarten des humanen Organismus zu finden. In vielen nicht-kleinzelligen Lungentumoren zeigt sich eine Überexpression des Rezeptors. Auch andere Tumorentitäten, wie beispielhaft das Nierenzellkarzinom, Colonkarzinom und Glioblastomen überexprimieren den EGF-Rezeptor. Weiterhin wird das für den Rezeptor kodierende Gen in mutierter Form vorgefunden.*

*Der Nachweis der verstärkten Expression des EGFR erfolgt in unserem Labor mit einem immunzytochemischen Verfahren. Dazu wird ein fluoreszenzmarkierter Antikörper, der gegen das beschriebene Protein gerichtet ist, zu der Zellsuspension gegeben. Die Antigen-Antikörper-Reaktion lässt sich anschließend unter dem Mikroskop bewerten.*

*Die EGFR-Genamplifikation kann mit Hilfe der FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Analyse auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein zytogenetisches Verfahren. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden, die spezifisch an bestimmte Stellen der DNA auf den Chromosomen binden, kann nach mikroskopischer Auswertung die Anzahl der EGFR-Genkopien bestimmt werden.*

*Klinisch haben sich zwei Wirkstoffstrategien als erfolgreich erwiesen, um das wachstumsfördernde Verhalten der aktivierten EGF-Rezeptoren zu unterbinden. Zum einen werden spezifische Antikörper eingesetzt, die den EGF-Rezeptor blockieren. Hierzu zählen Panitumumab (Handelsname VECTIBIX®) und Cetuximab (Handelsname Erbitux®). Zum anderen kommen kleine Moleküle, die Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Gefitinib (Handelsname Iressa®) und Erlotinib (Handelsname Tarceva®) zum therapeutischen Einsatz.*

*Ein häufig auftretendes Problem der Therapie ist eine begrenzte Wirkdauer. Die meisten Tumore entwickeln nach 1-2 Jahren Therapiezeit eine Resistenz. Inzwischen konnten einige Resistenzmechanismen, die auf Mutationen basieren, identifiziert werden. Aktuell werden in klinischen Studien Medikamente und Medikamentenkombinationen getestet, die die Resistenz durchbrechen, die Entwicklung einer Resistenz verzögern oder bei Vorliegen mehrerer Resistenzmechanismen den Tumor bekämpfen sollen.*

## 1.3 Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2)

*VEGFR2 ist eines von drei Mitgliedern der VEGF-Rezeptor-Familie. Es handelt sich um eine Rezeptor-Tyrosinkinase, deren Liganden (Vascular Endothelial Growth Factors – VEGFs) unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Diese Signalmoleküle, wie bereits in der Bezeichnung erkennbar, sind in allen vaskulären Geweben zu finden. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Bildung neuer Gefäße (Angiogenese), indem sie die*

Entstehung neuen Endothelgewebes vermitteln.

Der Nachweis des VEGFR2 auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Dabei bindet ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper an den Rezeptor. Anschließend kann unter dem Mikroskop beurteilt werden, welche Zellen den Rezeptor tragen.

Für eine Reihe von Tumoren wurde eine erhöhte Expression des Liganden VEGF nachgewiesen. Gegen diesen Wachstumsfaktor wurde der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab (Handelsname AVASTIN®) entwickelt, der an VEGF bindet und damit die Anlagerung an den Rezeptor verhindert. Hierdurch werden die Weitergabe der Wachstumssignale und damit die Angiogenese blockiert. Durch die fehlende Ausbildung von Blutgefäßen wird die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors verringert und somit das Wachstum gehemmt.

In Bezug auf Tumorerkrankungen besteht aktuell eine klinische Zulassung von Bevacizumab für fortgeschrittenen Darm-, Lungen-, Brust-, Nieren-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs.

## 1.4 Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)

IGF1R ist ein Rezeptor, der zur Familie der Thyrosinkinase-Rezeptoren gehört. Seine Aktivierung erfolgt durch die Hormone insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und insulin-like growth factor 2 (IGF-2).

Der Nachweis des IGF1R auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hier kommt ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper zum Einsatz, der an den Rezeptor bindet. Anschließend kann unter dem Mikroskop beurteilt werden, welche Zellen den Rezeptor tragen. Klinisch spielt der Rezeptor in mehreren Tumorentitäten, darunter Brust-, Prostata- und Lungenkrebs, eine Rolle. Seine anti-apoptotischen (gegen den programmierten Zelltod gerichteten) Eigenschaften ermöglichen malignen Zellen oftmals, der Zytotoxizität von Chemotherapien und Strahlentherapien zu widerstehen. Eine Vielzahl von molekularen Mechanismen, Signalwegen und Interaktionen mit anderen Rezeptoren und Liganden tragen dazu bei, dass bei Vorhandensein von IGF1R ein erhöhtes Überleben zirkulierender Tumorzellen trotz Therapiemaßnahmen eintreten kann.

## 1.5 Stammzellfaktor-Rezeptor (c-Kit)

c-Kit (auch: CD117) ist eine transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinase. Es handelt sich um einen Wachstumsfaktorrezeptor, der spezifisch den Stammzellfaktor (auch Kit-Ligand genannt) bindet. Physiologisch findet die Expression von c-Kit unter anderem in hämatopoetischen Stammzellen, Mastzellen, Melanozyten und Keimzellen der Gonaden statt. Die von c-Kit übertragenen Signale (Signaltransduktion) regulieren Proliferation, Differenzierung und Apoptose und spielen eine Rolle für die Entwicklung einiger Zellarten.

Herausragende pathophysiologische Bedeutung hat c-Kit vor allem bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). Auf molekularer Ebene scheint c-Kit am Prozess der malignen Transformation beteiligt zu sein. Ein Großteil aller zirkulierenden Tumorzellen aus GIST sind c-Kit-positiv.

Der Nachweis von c-Kit auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an die Rezeptor-Tyrosinkinase bindet. Mit Hilfe einer halbautomatischen Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, welche den Wachstumsfaktorrezeptor tragen, dargestellt und quantifiziert werden. Klinisch stellt die Diagnostik auf c-Kit-positive zirkulierende Tumorzellen einen Anhalt für weitere bildgebende Diagnostik mit Verdacht auf einen GIST dar. Mit dem Medikament Imatinib (Handelsname Glivec®) steht inzwischen ein spezifischer Tyrosinkinase-Hemmer für die Therapie solcher Tumore zur Verfügung. Die Expression von c-Kit ist allerdings nicht spezifisch für diese Entität. Auch andere maligne Tumore, vor allem Melanome, Thymuskarzinome und adenoid-zystische Karzinome können das Protein exprimieren.

## 2. Hormonrezeptoren

Hormonrezeptoren sind Proteine, die auf der Zellmembran, im Cytoplasma oder im Zellkern lokalisiert sind. Sie dienen der Bindung von Hormonen und wirken in aktivierter Form als Signalvermittler (Signaltransduktion). Nur in Geweben und Organen mit entsprechender Rezeptorausstattung können die im Körper über Hormone vermittelten Informationen empfangen und weiterverarbeitet werden. Die hier aufgeführten Rezeptoren gehören zu den Steroidhormonrezeptoren. Sie dienen in ihrer Rolle als Transkriptionsfaktoren der Signalweiterverarbeitung im Zellkern.

### 2.1 Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR)

Wie einleitend beschrieben, sind Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) Vertreter der Steroidhormonrezeptoren, die für die Wirkung der weiblichen Sexualhormone Östrogen und Progesteron verantwortlich sind. Erreicht ein Hormon seinen spezifischen Rezeptortyp, kommt es zu einer Komplexbildung. Erst der aktivierte Hormon-Rezeptor-Komplex überwindet die Zellkernmembran und kommt seiner Aufgabe als Transkriptionsfaktor nach.

Vor allem bei Brustkrebs spielt die Bestimmung des Rezeptorstatus eine ausschlaggebende Rolle. Neben normalen Brustdrüsenzellen tragen auch maligne Zellen und die aus dem Tumor ausgeschwemmten zirkulierenden Tumorzellen oft Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren. Rund 70-80 % aller Brustkrebspatientinnen haben einen hormonrezeptorpositiven Tumor. Das Wachstum dieser Tumortypen kann durch Östrogene und Progesteron gefördert werden. Die Ausprägung der Rezeptoren auf den zirkulierenden Tumorzellen kann dabei von den

identifizierten Rezeptoren auf Gewebeschnitten durchaus abweichen.

Der Nachweis des Östrogen- und Progesteronrezeptors auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an den Rezeptor bindet. Mit Hilfe einer halbautomatischen Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, welche den Rezeptor exprimieren, dargestellt und quantifiziert werden.

Die Ergebnisse können einen entscheidenden Beitrag zur Planung der Behandlung leisten. Hormonrezeptorpositive Tumore lassen sich mit antihormonell wirksamen Medikamenten behandeln. Die Medikamente können die Hormonbildung hemmen [Aromataseinhibitoren, z.B. Anastrozol (Handelsname Arimidex®), Exemestan (Handelsname Aromasin®) oder Letrozol (Handelsname Femara®)] oder den Rezeptor beeinflussen [selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), z.B. Tamoxifen (Handelsname u.a. Ebefen®, Mandofen®, Nolvadex®)]. Darüber hinaus gibt es Wirkstoffe [Fulvestrant (Handelsname Faslodex®)], die den Rezeptor vollständig blockieren. Die Bestimmung der beiden Rezeptortypen auf den zirkulierenden Tumorzellen kann weiterhin die Entscheidung unterstützen, die antihormonelle Therapie weiterzuführen oder wiederaufzunehmen, wenn hormonrezeptorpositive CETCs vorhanden sind.

## 2.2 Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor (AR) wird durch die Steroidhormone Testosteron und Dihydrotestosteron aktiviert. Dieser Rezeptortyp wirkt nach der Aktivierung als Transkriptionsfaktor direkt auf DNA-Ebene im Zellkern, was zu einer erhöhten Synthese verschiedener Proteine führt. Neben der Ausprägung auf Prostatazellen und der damit verbundenen Verwendung als Tumormarker, wird auch die Relevanz bei der Behandlung von Brustkrebs zunehmend deutlich.

Die Bestimmung des Androgenrezeptors (AR) auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an den Rezeptor bindet. Mit Hilfe einer halbautomatischen Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, welche den Rezeptor tragen, dargestellt und quantifiziert werden.

Patienten mit einem diagnostizierten Prostatakarzinom können bei hormonrezeptorpositivem Status von einer Hormonblockade-Therapie profitieren.

Auf Brustkrebszellen wurden inzwischen auch Androgenrezeptoren identifiziert. Die Einschätzung der Prognose und die Behandlungsstrategie bei Brustkrebs werden bislang zu großen Teilen von der Anwesenheit von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren bestimmt. Da viele Brusttumore auch den Androgenrezeptor tragen, werden Medikamente gegen Prostatakrebs nun auch bei AR-positivem Brustkrebs getestet. Vor allem bei ‚triple‘-negativen Tumoren (ER-negativ, PR-negativ, HER2-negativ) könnte das Auffinden der AR-Rezeptoren einen möglichen Therapieansatz bieten, da es bisher in dieser Situation keinen Anhaltspunkt für eine antihormonelle Therapie gab.



## 3. Prostata-assoziierte Marker

### 3.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA) und prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)

*Das prostataspezifische Antigen (PSA) ist ein Protein, welches hauptsächlich von Prostatazellen exprimiert wird und im physiologischen Zustand als Enzym der Verflüssigung des Samenkoagulums dient. Im pathophysiologischen Zusammenhang ist das PSA als Marker zur Diagnostik und Verlaufskontrolle von Prostatakrebs in der Diskussion. Die Erhöhung des PSA Wertes bei Bestimmung aus dem Serum könnte zwar für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms sprechen, kann allerdings auch bei benigner Prostatahyperplasie, Prostatitis und anderen Beeinflussungen der Prostata vorliegen. Dies kann Veranlassung für eine weitere Diagnostik sein. Die Bestimmung von PSA auf den zirkulierenden Tumorzellen kann einen Hinweis auf die Organzugehörigkeit geben und dient der Therapiekontrolle bei Behandlung des Prostatakarzinoms oder als Verlaufskontrolle bei einem „watch and wait“-Ansatz.*

*Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist ein membrangebundenes Glykoprotein, das ebenfalls enzymatische Aufgaben erfüllt. PSMA ist auf benignen- und karzinogenen Prostatazellen, sowie auf zirkulierenden Tumorzellen die einem Prostatakarzinom entstammen, vorhanden. Das PSMA gilt aufgrund der hohen Spezifität als passendes Zielantigen für neuartige Therapieansätze und ist aus diesem Grund Gegenstand aktueller klinischer Forschung. In der Nuklearmedizin wird mit Hilfe des PSMA-PET/CT (Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie) die Diagnose eines Prostatakarzinoms und die Überwachung im weiteren Verlauf ermöglicht. Dazu wurden Substanzen entwickelt, die an PSMA binden. Diese Substanzen können mit schwach radioaktiven Substanzen markiert werden. Aufgrund der spezifischen Bindung reichert sich Radioaktivität im Tumorgewebe an und kann mit PET-Geräten lokalisiert werden. Zusätzlich wird eine kontrastverstärkte CT Untersuchung durchgeführt.*

*Der Nachweis von PSA und PSMA auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an das jeweilige Antigen bindet. Mit Hilfe einer halbautomatischen Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, welche das untersuchte Antigen tragen, dargestellt und quantifiziert werden.*

## 4. Aktivierungs- und Wachstumsmarker

### 4.1 Wachstumsfraktion der Zellen (Ki-67)

*Ki-67 ist ein Zellzyklus-assoziiertes Antigen. Als Proliferationsmarker dient Ki-67 der Identifizierung von Zellen, die sich im Zellzyklus befinden. Ruhende Zellen (Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase), die sich nicht in der Teilungsphase befinden, zeigen keine Ki-67 Expression.*

*Der Nachweis von Ki-67 auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an das Antigen bindet. Mit Hilfe einer halbautomatischen Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, die Ki-67 tragen, dargestellt und quantifiziert werden.*

*Eine große diagnostische Relevanz hat die Bestimmung der Wachstumsfraktion von Zellen über Ki-67 bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom. Eine geringe oder häufige Expression von Ki-67 auf den Zellen erlaubt, neben zwei weiteren Faktoren (Hormonrezeptor-positiv, Her2-negativ), die Unterscheidung zwischen den Subtypen Luminal A (Ki-67 niedrig) und Luminal B (Ki-67 hoch). Patientinnen mit Mammakarzinomen vom Typ Luminal A erhalten in der Regel eine rein endokrine Therapie, was die diagnostische Bedeutung von Ki-67 in Verbindung mit einer Therapieentscheidung verdeutlicht.*

## 5. Adhäsionsmarker

### 5.1 Gewebefaktor (Tissue Factor)

*Der Gewebefaktor (Tissue Factor), auch Faktor III oder Gewebethromboplastin genannt, ist ein Rezeptor-Protein, welches maßgeblich an der Blutgerinnung beteiligt ist. Er gehört zur Gruppe der Gerinnungsfaktoren. Im klinischen Alltag muss bei etwa 15 % der Krebspatienten mit thromboembolischen Komplikationen gerechnet werden. Bestimmte Entitäten erreichen eine Inzidenz von bis zu 30 %. Dazu gehören Bronchialkarzinome und Adenokarzinome des Pankreas und des Magens. Pathophysiologisch wirken bei malignen Erkrankungen die gleichen Kausalfaktoren in Bezug auf eine Thromboseneigung zusammen wie bei anderen Erkrankungen. Man spricht hier vom Virchow'schen Trias, das sich aus den Faktoren Gefäßwandeigenschaften, Blutströmung und Blutzusammensetzung ergibt. Allerdings werden diese Faktoren bei Krebserkrankungen durch prokoagulatorische Vorgänge verstärkt.*

*Es ist bekannt, dass maligne Zellen unter anderem den Gewebefaktor bilden und dadurch eine thrombotische*

*Diathese induzieren können. Eine Bestimmung dieses Gerinnungsfaktors auf den zirkulierenden Tumorzellen kann einen Hinweis auf ein erhöhtes Thromboserisiko bei Tumorerkrankungen geben.*

*Der Nachweis des Gewebefaktors auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an das Rezeptor-Protein bindet. Mit Hilfe einer halbautomatisierten Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, welche den Gewebefaktor tragen, dargestellt und quantifiziert werden.*

## 5.2 Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen)

*Das Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen) ist ein tumorspezifisches Disaccharid, das auf der Oberfläche von Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten vorkommt. Dazu gehören Lungen-, Brust-, Pankreas-, Magen-, Darm- und Ovariakarzinome. Weiterhin stellt das TF-Antigen einen Risikofaktor für die Entstehung von Lebermetastasen dar, da Leberzellen einen Rezeptor für das TF-Antigen besitzen und somit eine Interaktion und Anreicherung von malignen, TF-Antigen tragenden Zellen im Lebergewebe stattfinden kann.*

*Der Nachweis des TF-Antigens auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an den Rezeptor bindet. Anschließend kann unter dem Mikroskop beurteilt werden, welche Zellen das Antigen tragen. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das TF-Antigen eine funktionelle Bedeutung für das Fortschreiten von Krebserkrankungen hat. Relevant scheinen hier Interaktionen und die Kommunikation von malignen Zellen mit endogenen Lektinen (=Kohlehydrat-bindenden Proteinen).*

*Aus klinisch diagnostischer Sicht kann die Ermittlung des TF-Antigens momentan einen Hinweis auf die Leberaffinität der zirkulierenden Tumorzellen geben.*

## 6. Immunmodulatorische Moleküle – neue Angriffspunkte in der Krebstherapie

*Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen des menschlichen Immunsystems, um überschießende Abwehrreaktionen von T-Lymphozyten zu verhindern oder zu unterdrücken. Viele Tumore nutzen diese Immunkontrollpunkte (Checkpoints), um die gegen sie gerichtete Immunabwehr zu umgehen. Hier kommen die Checkpoint-Inhibitoren ins Spiel. Über unterschiedliche Angriffspunkte hemmen sie die Signalwege, die eine T-Zell-Antwort verhindern und ermöglichen so der Körperabwehr, die malignen Zellen und den Tumor zu attackieren.*

## 6.1 Programmierter Zelltod-Ligand 1 (PD-L1)

Der immunregulatorische Ligand PD-L1 hat physiologisch eine bedeutende Funktion bei der Vermeidung von Autoimmunreaktionen. Zusätzlich wird, während der Entstehung von Krebs, PD-L1 eine wichtige Rolle bei der Hemmung des Krebs-Immunzell-Zyklus zugeschrieben. Die Interaktion von PD-L1 mit dem zugehörigen Rezeptor PD-1 auf T-Zellen unterdrückt in der physiologischen Situation die Aktivierung der T-Zellen und damit verbunden eine aktive Immunantwort. Diese Funktion schützt gesundes Gewebe vor einer überschießenden körpereigenen Immunantwort. Forschungsergebnisse zeigen, dass Krebszellen häufig das inhibitorische Molekül PD-L1 exprimieren. Durch Interaktion von PD-L1 auf den Tumorzellen und deren Rezeptor PD-1 auf den T-Zellen, kann die Aktivierung der T-Zellen unterdrückt werden. So können die Krebszellen dem Immunsystem entkommen. Der PD-L1 Signalweg bietet neue Angriffspunkte in der Krebsimmuntherapie. Die Blockade der PD-L1 Interaktionen kann die Inhibition der T-Zell-Aktivität verhindern und damit dem Immunsystem die Chance einräumen, gegen die malignen Zellen zu reagieren. Momentan haben verschiedene PD-L1 Inhibitoren nach klinischen Studien bereits eine Zulassung erhalten; weitere sind in Entwicklung. Außerdem stellt PD-L1 einen potentiellen Biomarker für Krebsarten dar, die den PD-L1-Signalweg zur Umgehung des Immunsystems nutzen. Der Nachweis von PD-L1 auf den zirkulierenden Tumorzellen findet über fluoreszenzmarkierte Antikörper statt, die spezifisch an PD-L1 binden und mikroskopisch ausgewertet werden können. Klinisch kann ein positives Resultat zu einer Abwägung beitragen, inwiefern eine Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren zum Erfolg führen könnte. Mit dem Voranschreiten der individuell auf den Patienten abgestimmten Krebstherapien zeigt sich die Wichtigkeit und Notwendigkeit der weiteren Erforschung dieser Signalwege.

## 6.2 Oberflächenantigen CD 276 (B7-H3)

B7-H3 ist ein Mitglied der B7/CD28 Superfamilie kostimulatorischer Moleküle, die einen Beitrag zur Feinsteuerung der Immunantwort über T-Zellen leisten. Da die Expression des Antigens inzwischen auch bei Krebs verschiedener Entitäten nachgewiesen wurde, kann eine zusätzliche Funktion in der Regulation der antitumoralen Immunität angenommen werden. Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von B7-H3 zum Absterben oder zur Stilllegung von Immunzellen führt, die den Tumor bekämpfen.

Der Nachweis des Oberflächenantigens B7-H3 auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an das Antigen bindet. Mit Hilfe einer halbautomatischen Mikroskop-basierten Analyse können lebende zirkulierende Tumorzellen, welche den Wachstumsfaktorrezeptor tragen, dargestellt und quantifiziert werden.

In Bezug auf die immunmodulativen Eigenschaften besteht für B7-H3 auch die Möglichkeit, ein therapeutisches Ziel im Kampf gegen Krebs darzustellen. Im Gegensatz zu PD-1 (In 6.1 näher beschrieben) muss beachtet werden, dass B7-H3 weitreichender exprimiert ist, v.a. auch in gesunden Geweben. Daher besteht bei jeglichen

Behandlungsansätzen gegen B7-H3 die Gefahr von schweren Nebenwirkungen. Das Feld der Immunonkologie ist momentan in intensiver theoretischer und klinischer Forschung. Die Bestimmung kann einen Hinweis darauf geben, ob die körpereigene Immunantwort durch die Anwesenheit von B7-H3 inhibiert wird.

## 7. Sonstige

### 7.1 Apoptose-Nachweis durch TUNEL

Die Apoptose bezeichnet eine Form des programmierten, von der Zelle selbst herbeigeführten Zelltods. Dieses Programm kann sowohl durch äußere Faktoren als auch durch zellinterne Prozesse, beispielsweise bei beschädigter DNA, ausgelöst werden. Die natürliche Eliminierung geschädigter Zellen macht die ständig aktive körpereigene Krebsabwehr deutlich. In Krebszellen können einige der Signalwege, die zur Auslösung der Apoptose führen, durch Umgehungsmechanismen blockiert sein. So können sich die malignen Zellen ungehindert und rasch vermehren.

Die TUNEL-Methode (terminal desoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient dem Nachweis von Zellen, die sich in der Apoptose befinden. Während des apoptotischen Prozesses kommt es, bedingt durch enzymatische Reaktionen, zur Fragmentierung der DNA im Zellkern. Hierdurch werden an den Enden der DNA-Fragmente chemische Gruppen frei, die durch das bereits im Namen der Methode erwähnte Enzym terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen werden. Mit einem geeigneten Mikroskop kann die Farbmarkierung der fragmentierten DNA-Enden sichtbar gemacht werden. Ein positiver Nachweis von Zellen, die sich in der Apoptose befinden, kann darauf hinweisen, dass der Körper durch eine immunologische Antwort auf die malignen Zellen reagiert. Das Auffinden von Zellen kann aber auch, sofern eine Krebstherapie durchgeführt wird, einen Hinweis auf ein Therapieansprechen geben.

### 7.2 Antikörper-Immunreaktion gegen Tumorzellen (Ig)

Das Immunsystem des menschlichen Organismus ist verantwortlich für die Abwehr gegen eindringende Krankheitserreger, den Schutz vor Fremdstoffen, sowie die Verteidigung gegen Tumore, die aus körpereigenen Zellen entstehen. Um diesen vielfältigen Aufgaben gerecht zu werden, ist eine enge Zusammenarbeit des unspezifischen Immunsystems, bestehend aus den phagozytierenden Zellen, den natürlichen Killerzellen und dem Komplementsystem, mit dem spezifischen Immunsystem, bestehend aus den Lymphozyten und Plasmazellen, notwendig.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist es möglich, die humanen Immunglobuline, die aus körpereigener Leistung bereits gegen die zirkulierenden Tumorzellen gebildet wurden, spezifisch zu binden und nach mikroskopischer Auswertung zu analysieren. Hierdurch kann beurteilt werden, ob bereits eine körpereigene Antikörperreaktion gegen die Tumorzellen stattgefunden hat.

## 7.3 Plazenta-Alkalische-Phosphatase (PLAP)

Bei der Plazenta-Alkalische-Phosphatase (PLAP) handelt es sich um ein membranständiges Enzym, das physiologisch von Syncytiotrophoblasten gebildet wird und bereits in einer frühen Phase der Schwangerschaft nachweisbar ist. Um 1970 wurden durch immunhistochemische Methoden zwei Isoenzyme der alkalischen Phosphatase bei Patienten mit Bronchialkarzinom und Keimzelltumoren entdeckt. Die beiden Gene dieser Enzyme sind auf dem gleichen Chromosom lokalisiert. Der Begriff PLAP wird in der Regel synonym für beide Enzyme und in diesem Zusammenhang als differenzierter Tumormarker verwendet.

Der Nachweis von PLAP auf zirkulierenden Tumorzellen wird durch immunzytochemische Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper geführt. Durch Bindung der spezifischen Antikörper an die Enzyme kann nach mikroskopischer Auswertung beurteilt werden, welche Zellen PLAP tragen. Diese Methode dient vornehmlich der Zuordnung von Tumorzellen, die nicht von Karzinomen stammen.

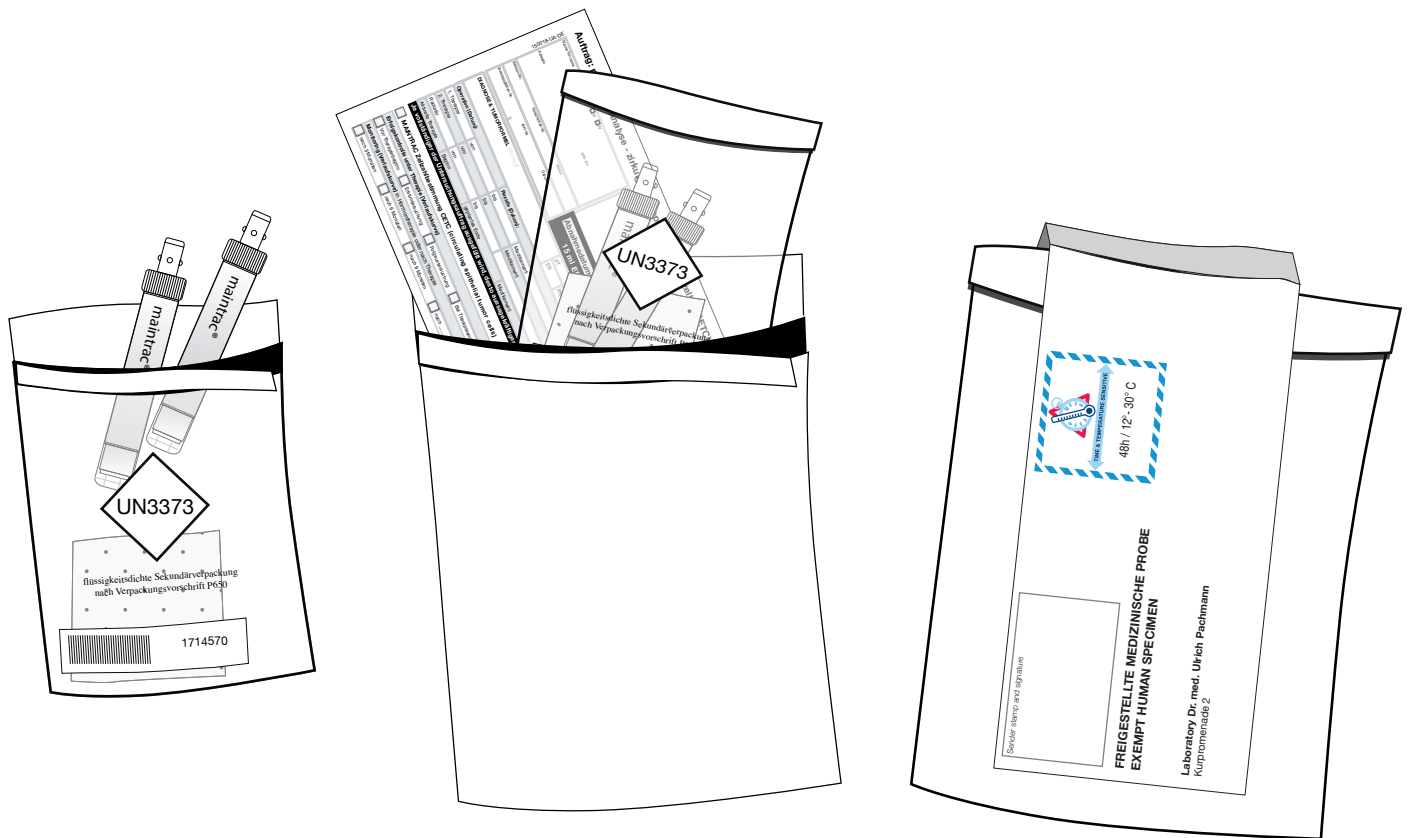
Nicht alle aus Sarkomen oder Mesotheliomen stammenden Zellen exprimieren das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM), welches die Grundlage der Maintrac®-Methode darstellt. Daher ist eine zusätzliche Bestimmung der PLAP auf den zirkulierenden Tumorzellen bei diesen Tumorentitäten auch für die klinische Diagnostik empfehlenswert.

## 7.4 Melan A (Mart-1)

Melan A ist eine Abkürzung für das „Melanozyten-Antigen“. Synonym wird der Begriff Mart-1 „Melanoma Antigen Recognized by T-cells“ verwendet. Es handelt sich dabei um ein Melanom-assoziiertes Protein, das von zytotoxischen T-Zellen erkannt wird. Die Expression findet sowohl in malignen Melanomen, als auch in benignen melanozytären Naevi statt.

Der Nachweis von Melan A auf den zirkulierenden Tumorzellen wird mit Hilfe eines immunzytochemischen Verfahrens durchgeführt. Hierzu wird ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet, der an das Antigen bindet. Anschließend kann unter dem Mikroskop beurteilt werden, welche Zellen das Antigen tragen. Dieser Nachweis dient vornehmlich der Zuordnung von Melanomzellen.

## 8. Probenversand



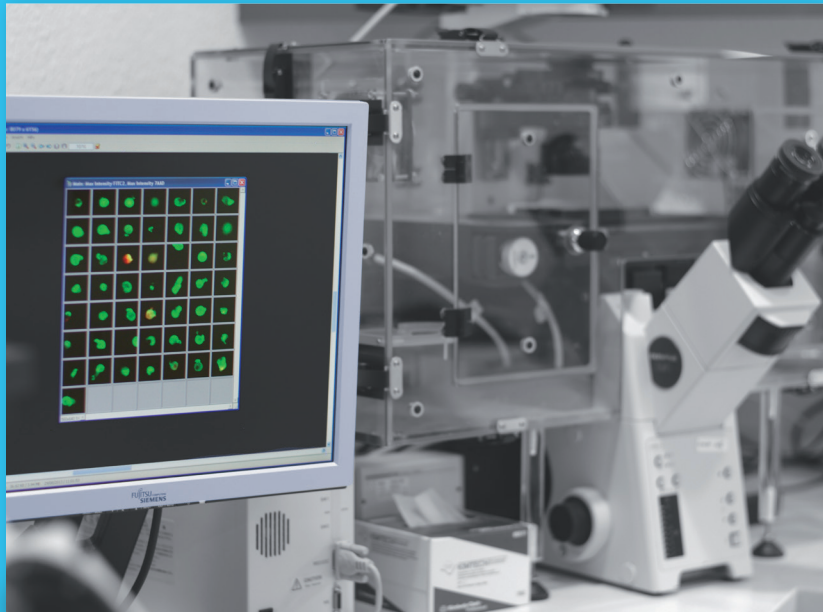
### Zellzahlbestimmung & Zellcharakterisierung

- *Untersuchungsauftrag*  
(Vollständig ausgefüllt, Unterschrift des Patienten)
- *15 ml EDTA-Blut*  
(Röhrchen beschriftet mit Patientennamen, Geburtsdatum, Abnahmedatum)

### Medikamententestung

- *je eine therapeutische Tagesdosis der zu testenden Medikamente, Heilmittel nach Rücksprache mit unserem medizinischen Fachlabor bitte mitschicken.*
- *Untersuchungsauftrag*  
(Vollständig ausgefüllt, Unterschrift des Patienten)
- *15 ml EDTA-Blut*  
(ausreichend für die Testung von bis zu 7 Medikamenten, Röhrchen beschriftet mit Patientennamen, Geburtsdatum, Abnahmedatum)

Ihr kompetenter Partner in der  
Onkologie und Hämostaseologie.



**simfo**

---

*Spezielle Immunologie  
Forschung + Entwicklung GmbH*

**in der Arbeitsgemeinschaft  
Transfusionsmedizinisches Zentrum  
Bayreuth (TZB)**

Kurpromenade 2 · 95448 Bayreuth  
Telefon: +49 (0) 921 730052  
mail@simfo.de · www.simfo.de

**Medizinisches Fachlabor Dr. Pachmann**

Kurpromenade 2 · 95448 Bayreuth  
Telefon: +49 (0) 921 850200

---

maintrac wird seit 2005 von dem nach DIN  
EN ISO 15189 akkreditierten **medizinischen  
Fachlabor Dr. Pachmann** durchgeführt.

Die maintrac-Diagnostik ist aktuell noch  
keine Kassenleistung und gilt als Individuelle  
Gesundheitsleistung (IGeL).