

Profilierung zirkulierender Tumorzellen mit Apparaturen und Materialien der nächsten Generation

Brenda J. Green, Tina Saberi Safaei, Adam Mephram, Mahmoud Labib, Reza M. Mohamadi und Shana O. Kelley*

Krebs · Mikrofluidik · Nanomaterialien · Zellanalyse ·
Zirkulierende Tumorzellen

In den letzten zehn Jahren gab es wichtige Fortschritte bei der Erfassung seltener zirkulierender Tumorzellen (CTCs) aus dem Blut von Krebspatienten als eine entscheidende Voraussetzung für die nicht-invasive Tumorprofilierung. Diese Fortschritte haben zudem neue Einblicke in die Materialchemie und die Mikrofluidik erbracht und ermöglichten die Erfassung und Auszählung von CTCs mit beispielloser Empfindlichkeit. Allerdings wurde auch immer klarer, dass einfaches Isolieren und Auszählen von Tumorzellen, die in den Kreislauf gelangt waren, nicht die benötigten Informationen lieferte, um unser Verständnis der Biologie dieser seltenen Zellen zu vertiefen oder um sie sich in der Therapie besser zunutze zu machen. Mithilfe von Apparaturen und Materialien der nächsten Generation mit maßgeschneiderten physikalischen und chemischen Eigenschaften ist man inzwischen in der Lage, mehr Informationen aus CTCs zu gewinnen. In diesem Kurzaufsatz werden die Arbeiten der letzten zehn Jahre in diesem Gebiet diskutiert, wobei insbesondere die bahnbrechenden Studien der letzten fünf Jahre Berücksichtigung finden, die den Blick über das einfache Isolieren von CTCs hinaus auf Ansätze gerichtet haben, die eine tiefergehende Analyse ermöglichen.

1. Einleitung

Das Fortschreiten einer Krebserkrankung von einem lokalisierten Tumor zur Entwicklung von Metastasen ist der

zentrale Schritt für die oft verheerenden Effekte dieser komplexen Erkrankung.^[1–4] Die Bildung von Metastasen in Organen, die weit weg vom Primärtumor liegen, wird wahrscheinlich durch die Freisetzung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) in den Blutkreislauf ausgelöst (Abbildung 1).^[5–8] Wenn CTCs einen aggressiven Phänotyp besitzen und in ein Gewebe eindringen können, bilden sich sekundäre

Tumore, die oft tödlich sind. Es ist daher von zentraler Bedeutung zu verstehen, wie Gegenwart und Eigenschaften von CTCs die Tumorprogression beeinflussen.

Das Erfassen und Analysieren von CTCs ist wegen der Seltenheit dieser Zellen im Blut eine anspruchsvolle Aufgabe.^[9,10] Eine einzige CTC in einem Milliliter Blut kann klinisch bedeutsam sein; im gleichen Blutvolumen finden sich aber auch Milliarden von Erythrozyten und Millionen von Leukozyten. Ein effektives Isolieren von CTCs erfordert also eine hohe Spezifität und die Möglichkeit, mit sehr kleinen Zellzahlen umgehen zu können. Außerdem müssen mehrere Milliliter Blut aufgearbeitet werden, sodass der Durchsatz hoch genug sein muss.

Die ersten Ansätze, die für die CTC-Analyse entwickelt wurden, basierten auf Immunzytologie,^[11] Durchflusszytometrie^[12] und magnetischer Trennung.^[13] Die letztgenannte Technik in Kombination mit Immunfluoreszenz bildete die Basis für das erste von der FDA zugelassene Verfahren für die

[*] B. J. Green, A. Mephram, Prof. S. O. Kelley
Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering
University of Toronto
Toronto, ON (Kanada)
E-Mail: shana.kelley@utoronto.ca
T. Saberi Safaei
Department of Electrical and Computer Engineering
University of Toronto
Toronto, ON (Kanada)
Dr. M. Labib, Dr. R. M. Mohamadi, Prof. S. O. Kelley
Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto
Toronto, ON (Kanada)
Prof. S. O. Kelley
Department of Biochemistry, University of Toronto
Toronto, ON (Kanada)

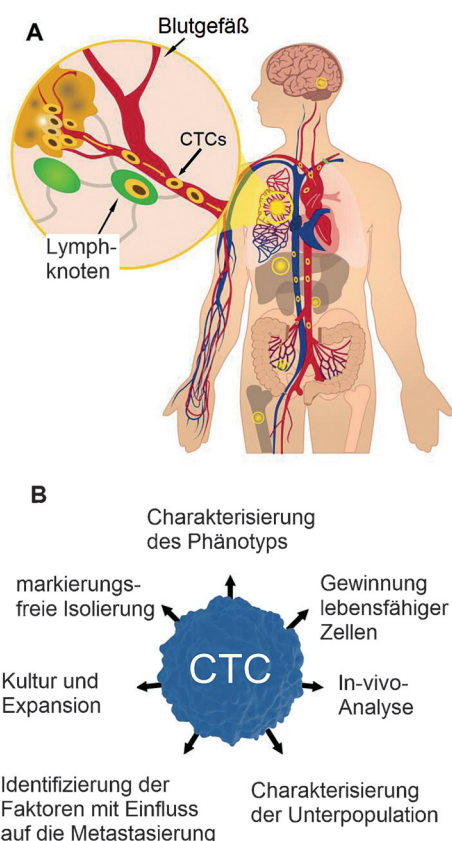


Abbildung 1. Zirkulierende Tumorzellen (CTCs). A) Zirkulierende Tumorzellen werden vom Primärtumor freigesetzt und treten in den Blutkreislauf ein. Von dort aus dringen sie in weitere Gewebe ein und bilden Metastasen. Abdruck in veränderter Form nach Lit. [2]. B) Jüngst entstandene Forschungsfelder, die neue Arten der CTC-Analyse ermöglichen; diese Felder werden in dem vorliegenden Kurzaufsatz zusammengefasst.

CTC-Analyse, CellSearch. CellSearch wurde im Jahr 1999 entwickelt und ist ein immunmagnetisches Anreicherungsverfahren, das auf der Erkennung eines für Endothelzellen spezifischen Markers beruht, des Epithelzellen-Adhäsionsmoleküls (EpCAM). CellSearch ist das klinisch am meisten verwendete Verfahren und ist noch immer die einzige CTC-Nachweisteknik mit FDA-Zulassung.

Der CellSearch-Ansatz beginnt mit der Markierung von CTCs mit magnetischen Teilchen, die mit anti-EpCAM-Antikörpern beschichtet sind. Damit werden die Zellen aus Vollblut abgefangen und automatisiert abgebildet. CTCs werden als Zellen definiert, die einen DAPI-gefärbten Kern haben und EpCAM und Zytokeratine koexprimieren, nicht aber den generellen Leukozyten-Marker CD45.^[6] Inzwischen wurden zahlreiche klinische Studien über die CTC-Anzahl mit dem CellSearch-System durchgeführt,^[14–20] die gezeigt haben, dass die Beobachtung dieser Zellen wertvolle prognostische Informationen über eine Untergruppe von Krebsarten liefern kann.

CellSearch ermöglichte zwar bessere Untersuchungen der klinischen Relevanz von CTCs, hat aber auch eine Reihe von Unzulänglichkeiten. In verschiedenen Untersuchungen wurde für diesen Ansatz ein inhärenter Mangel an Empfindlichkeit gezeigt, der die Anwendbarkeit auf die Analyse von Zellen mit hoher EpCAM-Expression beschränkt.^[21,22] Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass die Zellen nach dem Auszählen nicht mehr verfügbar sind.

In diesem Kurzaufsatz werden wir die Fortschritte beschreiben, die während der letzten zehn Jahre erzielt wurden, um diese Einschränkungen zu überwinden. In Tabelle 1 sind eine Reihe von Durchbrüchen zusammengestellt, die diskutiert werden sollen. Bemerkenswerte Verbesserungen der Empfindlichkeit, der Spezifität und der Flexibilität der CTC-Gewinnung und der Analysensysteme wurden erreicht, so



Brenda Green erhielt ihren MSc in Biomedical Engineering von der University of Toronto. Sie promovierte derzeit an der University of Toronto im gleichen Fach.



Mahmoud Labib promovierte 2009 an der Universität Lund. Er war Postdoktorand an der University of Western Ontario und der University of Ottawa, bevor er sich der Arbeitsgruppe von Dr. Kelley anschloss.



Shana Kelley ist Distinguished Professor of Pharmaceutical Sciences, Chemistry, Biochemistry und Biomedical Engineering an der University of Toronto. Sie promovierte am California Institute of Technology und war NIH Postdoc am Scripps Research Institute.



Adam Mephram studierte Chemical Biologie an der McMaster University. Seit 2013 promovierte er in Biomedical Engineering an der University of Toronto.

dass CTCs mit bisher unerreichter Präzision vermessen werden können. Eine wichtige neue Richtung in diesem Gebiet ist die Entwicklung von Apparaturen und Materialien, die über die Anzahl der CTCs hinaus weitere Informationen liefern. Neue Ansätze zur Zellgewinnung, die mehrere Erkennungssignale integrieren oder die vorgefertigte Fängeragentien überflüssig machen, ermöglichen das Sammeln von CTCs mit größerer Diversität. Integrierte Apparaturen, die die Trennung heterogener CTCs vornehmen oder die eine phänotypische und molekulare Profilierung ermöglichen, erleichtern eine tiefergehende Charakterisierung dieser Zellen. Fortschritte wurden auch bei der Entwicklung von Materialien erzielt, die Kultivierung und Vermehrung von CTCs erleichtern; damit wurde ein wichtiger Beitrag zur Entwicklung personalisierter Behandlungspläne geleistet. Diese Durchbrüche werden die Untersuchung dieser seltenen Zellen und ihre mögliche Nutzung für das klinische Management von Krebserkrankungen beeinflussen.

2. Die Entwicklung effektiver Apparaturen und Materialien zur CTC-Erfassung

Die verlockende Möglichkeit, dass CTCs als flüssige Biopsie dienen könnten, die die molekulare Signatur eines Tumors enthüllt, hat intensive Anstrengungen ausgelöst, sehr leistungsfähige Methoden zur CTC-Gewinnung zu entwickeln. Um eine höhere Empfindlichkeit als mit CellSearch zu erreichen, wurde eine Reihe von Techniken erprobt, um die Tumorzellen aus dem Blut zu isolieren. In umfassenden Darstellungen der Arbeiten auf diesem Gebiet wurden verschiedene Systeme beschrieben, die inzwischen für die Isolierung von CTCs verfügbar sind.^[23–26] Um neue Ideen für die Analyse von CTCs zu verdeutlichen, werden wir im nächsten

Abschnitt kurz die verschiedenen hochauflösenden Methoden beschreiben, die in den letzten zehn Jahren entwickelt wurden.

2.1. Affinitätsbasierte Isolierung von CTCs

Affinitätsbasierte Methoden der nächsten Generation weisen signifikante Verbesserungen in Empfindlichkeit und Spezifität bei Gewinnung und Analyse von CTCs auf. Antikörperbeschichtete Mikroapparaturen und Nanomaterialien haben die Effizienzen des CTC-Einfangs aus Patientenproben erhöht und ermöglichen detaillierte molekulare Charakterisierungen von CTCs. Während EpCAM die vorherrschende Struktur für den Zell-Einfang mit affinitätsbasierten Verfahren bleibt, sind Antikörper als Einfangreagenzien austauschbar, was die Anwendbarkeit solcher Systeme auf nicht-epitheliale Tumoren oder CTCs mit niedriger EpCAM-Expression ausweitet.

Eines der ersten vorgestellten mikrofluidischen affinitätsbasierten CTC-Einfangssysteme veranschaulichte, welcher Zuwachs an Leistungsfähigkeit durch die Skalierung auf den Mikromaßstab erzielt werden kann.^[27] Die Apparatur enthält Mikrosäulen, die in ein Siliciumsubstrat geätzt und dann mit anti-EpCAM funktionalisiert wurden. Die Mikrosäulen wurden so positioniert, dass sie maximalen Kontakt zu den Zellen haben, die durch die Apparatur fließen (Abbildung 2A). Nach Aufarbeitung des Blutes wurden die CTCs, die Cytokeratin-positiv und CD45-negativ waren, durch Immunfärbung identifiziert. Gute Einfangeffizienzen wurden mit verschiedenen Zelllinien erzielt, und in 115 von 116 untersuchten Patientenproben wurden nachweisbare Mengen an CTCs beobachtet. Mit diesem System konnte erstmals Vollblut direkt aufgearbeitet werden, und man ging davon aus, dass das Fehlen eines Vorbereitungsschritts ein Grund für die erhöhte Nachweisempfindlichkeit für CTCs war. Die Begünstigung der Wechselwirkungen zwischen CTCs und einer antikörperbeschichteten Oberfläche im mikrofluidischen Durchfluss spielte wahrscheinlich eine weitere Rolle bei der Leistungsverbesserung.

Viele andere affinitätsbasierte mikrofluidische Einfangsysteme wurden nach diesem Durchbruch vorgestellt.^[28,29] Apparaturen mit mikrostrukturierten Oberflächen, die Turbulenzen und zahlreiche Zusammenstöße zwischen CTCs und immobilisierten Antikörpern verursachen, wurden ebenso entwickelt^[30] wie integrierte Systeme mit elektrischen Detektoren, um CTCs zu zählen.^[31] Außerdem gelingt mit mikrofluidischen Sortiersystemen, die CTCs anhand einer Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern trennen können, indem sie sie in nanolitergroße Aliquots aufteilen, eine Zellisolierung, ohne sie von einer Oberfläche desorbieren zu müssen.^[32]

Fortschritte bei der Entwicklung von Apparaturen, die die Gewinnung von CTCs nach der Bindung ermöglichen, wurden ebenso verzeichnet. Insbesondere der stäbchenförmige MagSweeper kann CTCs aus klinischen Proben sammeln; damit bietet er eine Lösung für die Isolierung von CTCs aus Patienten für eine detaillierte Charakterisierung (Abbildung 2B).^[33–35]



Reza Mohamadi promovierte an der Universität Nagoya, Japan. Nach einem Aufenthalt am Institute Curie in Frankreich wechselte er zur University of Toronto.



Tina Saberi Safaei erhielt ihren Bachelor an der Universität Teheran und legte den Master am Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne ab. Sie ist gegenwärtig Doktorandin in Electrical Engineering an der University of Toronto.

Tabelle 1: Zusammenfassung von Ansätzen zur CTC-Gewinnung und -Analyse.

Verfahren	Beschreibung	Vorteile/Beschränkungen	Lit.
CellSearch	FDA-zugelassene immunmagnetische Anreicherung	Nur zur Gewinnung von CTCs mit hoher EpCAM-Expression geeignet	[14–20]
MagSweeper	Immunmagnetische Anreicherung	Eines der ersten zerstörungsfreien Verfahren zur CTC-Gewinnung	[34]
Nanovelcro	Die Nanovelcro-Oberfläche mit hohem Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis ermöglicht das Einfangen einzelner Tumorzellen	Die Stabilität des antikörperfunktionalisierten Chips ist kritisch	[92]
ISET ^[a]	Markerfreier Filtrationsansatz	Beschränkte Selektivität aufgrund der unvermeidlichen Größenüberlappung zwischen CTCs und Leukozyten	[44, 46]
Durchflussfraktionierung plus Dielektrophorese	Trenntechnik auf Basis der (elektrischen) Gesamtkapazität der Zelle	Die Leitfähigkeit von Cytoplasma und Membran verändert sich wahrscheinlich während der CTC-Gewinnung	[51]
CTC iChip	Hydrodynamische Sortierung, inerte Fokussierung und magnetophoretische CTC-Gewinnung	Option zur Abreicherung ermöglicht eine markerfreie Isolierung von CTCs	[62]
Gelatine-Nanobeschichtung	Eine antikörperfunktionalisierte Beschichtung ermöglicht eine thermische oder mechanosensitive Freisetzung der abgefangenen CTCs	Schonender Freisetzungsmechanismus	[69]
Aptamer-modifizierte Silicium-Nanodrähte	Aptamer-basierter Einfang von CTCs	Schonende Freisetzungsbedingungen (Nukleasen oder Antisense-DNA-Stränge) ermöglichen die Gewinnung lebensfähiger Zellen. Die Stabilität der Aptamere wird im Blut beeinträchtigt	[67]
EpCAM-funktionalisiertes Graphenoxid	Einfangen und Kultivieren von CTCs auf einer Graphenoxid-Oberfläche	Die Zellen können direkt in der Apparatur kultiviert werden	[72]
Sortierchip für CTC-Subpopulationen	Apparatur, die CTC-Subpopulationen mit unterschiedlichen Oberflächen-Expressionsprofilen in diskrete mikrofluidische Zonen sortiert	Ermöglicht die Profilierung der CTC-Heterogenität	[83]
Cluster-Chip	CTC-Cluster (2–30 Zellen) werden mit gegabelten Fallen mit niedriger Scherbelastung gewonnen	Markerfreier Ansatz, der eine schonende Freisetzung der Zellen ermöglicht	[88]
Integrierter Chip für Einfang und elektrochemischen Nachweis	Integrierter Ablauf von CTC-Einfang, Lyse und mRNA-Analyse etwa innerhalb einer Stunde	Die Integration von Zelleinfang und -analyse verringert den Aufwand der Probenaufarbeitung und damit verbundene Artefakte	[98]
μHall-Chip	Der μHall-Nachweis ermöglicht die parallele Analyse mehrerer Marker, die mit unterschiedlichen magnetischen Nanopartikeln beladen sind	Es werden Profile mehrerer Marker erstellt. Der Nachweis kann für Zellen mit extrem schwachen Biomarkern (z. B. Stammzellen) wegen der niedrigen magnetischen Suszeptibilität ungeeignet sein	[99, 100]
Nanoflares	Fluoreszierende Nanopartikel-Sonden dringen in die Zellen ein und binden an eine mRNA-Zielsequenz. Danach wird ein Fluorophor freigesetzt.	Der erste genbasierte Ansatz zur Charakterisierung lebender Tumorzellen aus dem Blut. Die Analyse mit Durchflusszytometrie kann größere Zellpopulationen erfordern	[101]
Multiwell-Invasionschip (MI-Chip)	Apparatur, die dreidimensionale Tumorzellmigration auf eine chemotaktische Substanz hin misst	Man erhält eine phänotypische Information. Wurde für Zelllinien demonstriert, noch nicht für CTCs	[103]
In-vivo-CTC-Detektor	EpCAM-funktionalisierter Seldinger-Führungsdraht wird intravenös zum CTC-Nachweis eingeführt	Die In-vivo-Analyse ermöglicht eine Echtzeitbeobachtung von CTCs. CTCs werden nicht beschädigt, wie dies bei einer typischen Aufarbeitung von Blut vorkommen kann	[108]

[a] ISET = Isolation by size of epithelial tumor cells.

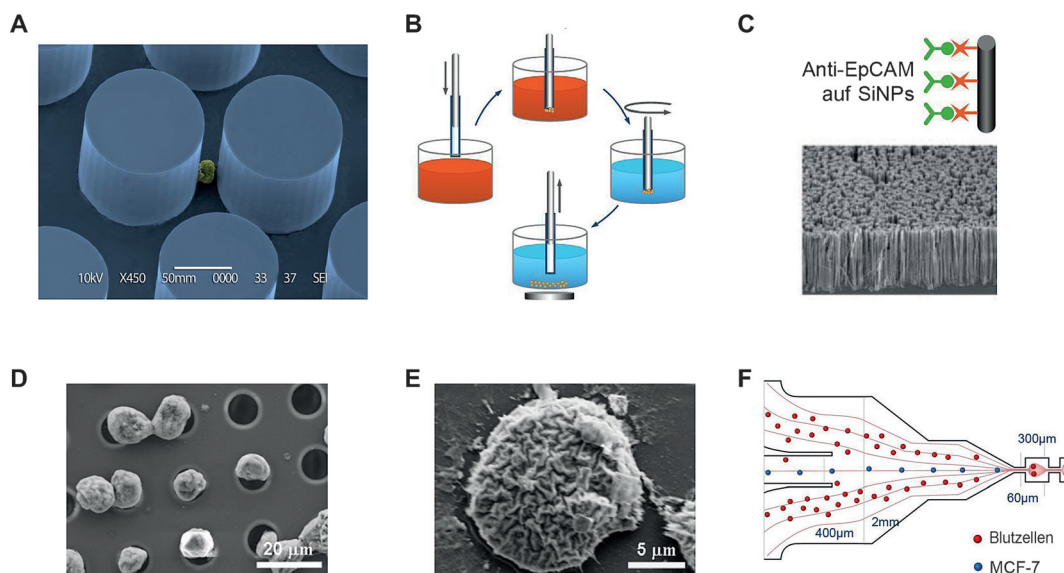


Abbildung 2. Fortschrittliche CTC-Isolierungstechniken mit verbesserter Empfindlichkeit. A) Rasterelektronenmikroskopisches Bild einer einzelnen Krebszelle eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die an einer antikörperfunktionalisierten Mikrosäule gefangen wurde.^[27] B) MagSweeper, ein stäbchenförmiges Instrument, mit dem magnetisch markierte CTCs aus klinischen Proben gesammelt werden.^[33] C) Antikörperbeschichtete Silicium-Nanostempel (SiNPs), die die Wechselwirkungen zwischen CTCs und einem Substrat begünstigen.^[37] D, E) REM-Aufnahmen von Prostatakrebszellen, die auf einem porösen Parylen-Membranfilter zurückgehalten wurden.^[42] F) Mikrofluidikchip, der Mehrkanal-Durchflussfraktionierung (MOFF) und Dielektrophorese (DEP) zum Einfangen zirkulierender Tumorzellen nutzt. Dieses System erlaubt die kontinuierliche Abtrennung von CTCs von Leukozyten mit hohem Durchsatz durch Anlegen externer DEP-Kräfte.^[51] Abdruck in veränderter Form nach Lit. [27, 33, 37, 42, 51].

Auch Nanomaterialien können die Empfindlichkeit für das Einfangen von CTCs weiter erhöhen. Ein NanoVelcro-Chip auf Basis eines Feldes von Siliciumnadeln im Nanomaßstab, die mit Antikörpern gegen CTC-Oberflächenmarker beschichtet sind, hat sich als optimale Umgebung erwiesen, um die Adhäsion von CTCs an das Fängersubstrat zu fördern (Abbildung 2C).^[36–38] Andere Nanomaterialien wie leitfähige Polymer-Nanopunkte^[39] und elektrogesponnene TiO₂-Nanofasern^[40] wurden ebenfalls getestet und für das Einfangen von CTCs optimiert; außerdem wurde die optimale nanoskalige Rauigkeit für eine effiziente Zellbindung bestimmt.

2.2. Trennung von CTCs nach der Größe

Einer der ersten Ansätze, der als Alternative zur immunmagnetischen Gewinnung von CTCs aufkam, nutzte den Größenunterschied, der zwischen Tumorzellen und den normalen Blutzellen besteht. Einige Tumorzellen haben einen größeren Durchmesser als normale Erythrozyten und Leukozyten, woraus sich die Möglichkeit ableitet, sie durch eine hochpräzise Filtration zu isolieren. Frühe Arbeiten mit siebähnlichen Materialien wiesen darauf hin, dass Tumorzellen aus dem Blut abgetrennt werden könnten.^[41] Wenig später wurden mikrostrukturierte Filter mit präziser eingestellten Eigenschaften hergestellt (Abbildung 2D, E).^[42]

Polycarbonatmembranen, die mit einem Ionenstrahl geätzt werden können, um Bereiche mit gleichmäßigen Porengrößen herzustellen, boten ein ideales Ausgangsmaterial, um die Leistungsfähigkeit der CTC-Gewinnung basierend auf der Zellgröße zu optimieren.^[43–45] Eine als ISET (isolation by size

of epithelial tumor cells) bezeichnete Technik^[44, 46] wurde auf dieser Materialbasis entwickelt, und sie ermöglichte eine sehr empfindliche Zählung von CTCs aus Patientenproben. Außerdem erwies sie sich als kompatibel mit einer genetischen Analyse der CTCs entweder durch Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Der Ansatz wurde dann allmählich auf eine größere Spanne von CTC-Zellgrößen ausgedehnt, indem Kügelchen verwendet wurden, die spezifisch an die Tumorzellen binden und deren Durchmesser vergrößern. Diese Variante hängt aber von der Verfügbarkeit von Zelloberflächenmarkern ab.^[47] Nach dem Einfangsschritt wurden die Kügelchen durch Licht abgetrennt, um die Störungen bei der Bildanalyse der CTCs zu minimieren.

Andere Isolierungsmethoden auf Basis von Größenunterschieden verfolgen eine mikrofluidische Trennung anstelle einer Filtration.^[48, 49] Eine Plattform wurde beschrieben, welche die CTCs durch Fokussierung und Einfangen in Mikrowirbeln gewinnt und damit gute Sensitivität und Spezifität erzielt; die Reinheit der Zellpopulation liegt nahe bei 95 % bei moderater Einfangeffizienz. Die Durchsatzzeiten sind kurz, die Aufarbeitung einer 7.5 mL-Probe dauert nur etwa 20 Minuten. Mit dieser Methode ist also eine schnelle Isolierung sehr reiner CTC-Proben möglich.

Nach Größe auftrennende Systeme haben den einzigartigen Vorteil, dass ohne Markierung lebensfähige CTCs für eine anschließende Analyse gewonnen werden können. Dieser Ansatz kann jedoch keine perfekte Trennung erzielen, weil ein Teil der CTCs kleiner oder so groß ist wie Leukozyten.^[47] Die Güte dieser Unterscheidung hat Einfluss auf die Reinheit der angereicherten Zellpopulation.

2.3. Dielektrische Abtrennung von CTCs

Tumorzellen können auch durch Dielektrophorese (DEP) aus dem Blut abgetrennt werden.^[50,51] Dieser markerfreie Ansatz nutzt die intrinsischen dielektrischen Unterschiede zwischen den Zelltypen. Dielektrische Zellvermessung ergibt die Gesamtkapazität und -leitfähigkeit der Plasmamembran mithilfe alternierender Feldgradienten. Die Gesamtkapazität kann ausgenutzt werden, um Tumorzellen von Leukozyten zu trennen.

CTCs können durch dielektrophoretische Feldfluss-Fraktionierung (depFFF) isoliert werden, bei der DEP-Kräfte mit einer Strömung kombiniert werden, um eine Probe unterschiedlicher Partikeltypen zu trennen. Nach dem Einfangen können lebensfähige Tumorzellen für die Kultivierung oder molekularbiologische Analysen gewonnen werden. Mit DepFFF lassen sich bis zu 90 % der Tumorzellen zurückgewinnen, die zuvor dem Blut zugegeben wurden.^[50,51] Tumorzellen werden vom Blut abtrennt, wenn die angelegte DEP-Frequenz bei 60 kHz liegt; die Zellen lassen sich dann durch eine Verschiebung der Frequenz auf 15 kHz in Fraktionen aufkonzentrieren.

Die Multikanal-Flussfraktionierung (MOFF) wurde mit DEP kombiniert, um Brustkrebszellen aus dem Blut zu isolieren. Eine hydrodynamische Sortierung in inerten Mikrofluidik-Chips wurde durch Multikanalstrukturen erzielt (Abbildung 2F).^[51] Die Kombination aus hydrodynamischer Sortierung mit DEP ergibt extrem hohe Trennungseffizienzen.

Eine andere Anwendung der DEP induziert dielektrophoretische Kräfte durch den Einsatz von Licht; sie wird zur Isolierung von CTCs in einer mikrofluidischen Umgebung mit laminarer Strömung eingesetzt.^[52] Die Tumorzellen wurden mit einer Reinheit von bis zu 82 % von Leukozyten abgetrennt.

Das Verfahren hat aber auch seine Grenzen, weil die Leitfähigkeiten von Zytoplasma und Membran dazu neigen, sich während der Trennoperation zu verändern. Die Dauer der Trennungsläufe können jedoch optimiert werden, um diese Veränderungen zu minimieren und Zell-Zell-Wechselwirkungen zu verringern.

3. Mehr als nur Erfassen und Zählen: Apparaturen und Materialien der nächsten Generation

Die Methoden, die im vorigen Abschnitt beschrieben wurden, eröffneten die Möglichkeit, CTCs mit verbesserter Sensitivität und Effizienz zu isolieren und zu untersuchen; mit ihnen wurde auch gezeigt, dass es eines Tages vielleicht möglich sein wird, eine Blutprobe als flüssige Biopsie zu benutzen, aus der sich auf molekularer Ebene die Tumoreigenschaften ableiten lassen. In den letzten Jahren ist aber auch deutlich geworden, dass neue technische Möglichkeiten und Entwicklungen nötig sind, um aus dieser Vision Realität werden lassen. Neue Untersuchungen haben ergeben, dass ein einzelner Patient viele verschiedene Typen von CTCs in seinem Blut haben kann und dass nur eine Untergruppe davon einen metastatischen Phänotyp hat.^[53–55] Außerdem ist

wegen der Heterogenität der CTCs ein Einfangen der Zellen mit einer Auswahl an Markern notwendig, oder man nutzt markerfreie Ansätze, mit denen man zwischen phänotypisch unterschiedlichen Krebszellen unterscheiden kann. Die Gewinnung und Kultivierung der CTCs nach dem Isolierungsschritt ist entscheidend, da man sie dann auf Empfindlichkeit gegenüber Therapeutika und auf das metastatische Potenzial weiter analysieren kann.^[56] Man versucht, Apparaturen zu entwickeln, die CTCs nicht nur isolieren, sondern auch ihre molekularen Eigenschaften in situ charakterisieren können, um so mehr über die Zellen zu erfahren. Darüber hinaus ist auch die In-vivo-Analyse von CTCs ein wichtiges Ziel.

3.1. Markerfreie Isolierung von CTCs

Der „heilige Gral“ der CTC-Isolierung ist die Gewinnung der Zellen ohne spezifische Marker. Während neue Technologien auf vielfältige Marker zugreifen^[53,57,58] und Multivalenz für ein hochspezifisches Einfangen von Zellen forcieren,^[58–60] können nach markerfreier Isolierung CTCs mit noch uncharakterisiertem Phänotyp analysiert werden. Markerfreie Isolierung vermeidet einen Selektionsdruck, der vom Einfangen von Zellen basierend auf spezifischen Oberflächenmarkern herrührt.

Ein aktueller Durchbruch bei der markerfreien Isolierung von CTCs wurde durch eine Abreicherungsstrategie und einen inerten Konzentrierungschip, auch iChip genannt, erreicht.^[61,62] Eine erste hydrodynamische Sortierkammer trennt Erythrozyten und Blutplättchen basierend auf Größenunterschieden von CTCs und Leukozyten ab (Abbildung 3). Dann wird die Probe mit antikörperbeschichteten

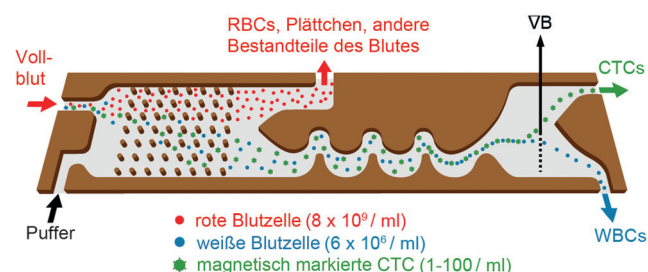


Abbildung 3. Der CTC-iChip enthält verschiedene Zonen, die durch größenabhängige Ablenkung, inerte Fokussierung und Magnetophorese Leukozyten von CTCs trennen.^[62] Abdruck in veränderter Form nach Lit. [62].

Magnetpartikeln inkubiert, die entweder an Leukozyten oder an CTCs binden; diese Zellen werden dann in einer großen Fraktion abgetrennt. Werden die Leukozyten mit Magnetpartikeln abgefangen, können die CTCs ohne einen spezifischen Marker für ihre Identifizierung isoliert werden. Dieser Ansatz wurde zur Isolierung von CTCs von Patientinnen mit einem dreifach negativen Brustkrebs benutzt, der eine Herausforderung für den EpCAM-basierten Zelleinfang darstellt, da die CTCs hauptsächlich mesenchymale Marker exprimieren. Daneben wurde das Prinzip des iChips auf andere schwierige CTC-Typen ausgeweitet, darunter CTCs aus Me-

lanomen und Pankreastumoren. Ein Nachteil dieser Methode ist der relativ hohe Anteil an kontaminierenden Leukozyten verglichen mit typischen Mengen bei positiven Selektionsverfahren.

Markerfreie Ansätze zur Gewinnung von CTCs sind leistungsfähige Werkzeuge, die die Untersuchung heterogener Populationen von Tumorzellen ermöglichen und die vielleicht eine wichtige Rolle spielen, wenn bestimmt werden soll, welche Zellen einen invasiven Phänotyp haben. Ein Hauptziel ist, die Stringenz der CTC-Reinigung mit einem Werkzeug dieses Typs zu erhöhen, denn dies wird die Charakterisierung von diverseren CTCs ohne Störung durch gesunde Blutzellen erleichtern.

3.2. Abfangen und Freisetzen von CTCs

Die ersten Methoden, die für die CTC-Analyse entwickelt wurden, sollten die Identifizierung dieser Zellen durch Immunfärbung erleichtern; der Einsatz destruktiver Charakterisierungsverfahren wurde jedoch schnell als Nachteil erkannt, der die nachfolgende Analyse von Genetik und Proteomik dieser Zellen einschränkt. Die Freisetzung lebensfähiger Zellen ermöglicht weitere Analysen wie quantitative PCR, Genomsequenzierung und Xenograft-Untersuchungen,^[54,63,64] die für das umfassende Verständnis von Krebsmetastasen von großer Bedeutung sind. Dies hat die Suche nach sanften Bedingungen, unter denen man die empfindlichen CTCs von den Fängersystemen ablösen kann, beflügelt. Während der letzten Jahre wurde eine Reihe von Systemen entwickelt, die die effiziente Gewinnung von Tumorzellen nach der Einfangreaktion erlauben. Die Ablösung erfolgt über chemische^[65] und enzymatische Mechanismen,^[66,67] über Selbstorganisation,^[68] mechanosensitiv^[69] oder thermisch^[70,71] (Abbildung 4). Dabei wurde ein hoher Grad an Lebensfähigkeit der Tumorzellen bei gleichzeitig geringer Kontamination durch andere Zellen erreicht. Diese neue Möglichkeit wird unser Verständnis der biologischen Eigenschaften von CTCs und ihrer medizinischen Bedeutung verbessern.

Das Ablösen lebensfähiger Tumorzellen nach einer antikörperbasierten Isolierung ist eine Herausforderung wegen der hohen Affinität der Antikörper zu den Oberflächen-Antigenen. Der Verdau der Zelloberflächen-Antigene wurde als eine Möglichkeit verfolgt, um die Antikörper/Antigen-Komplexe aufzulösen, doch war dieses Verfahrens sehr ineffizient.^[31] Neuere Arbeiten an alternativen Methoden befassen sich unter anderem mit labilen Metallionen-Brücken zwischen Nanopartikeln und Antikörpern, die mit EDTA gelöst werden können,^[65] und Nanobeschichtungen auf Gelatine-Basis, die beim Erwärmen auf über 30 °C denaturiert werden.^[69] Der zweite Ansatz kann auch verwendet werden, um einzelne CTCs mechanisch freizusetzen. Eine weitere auf thermische Einflüsse reagierende Technik wird durch immobilisierte Polymerbürsten möglich, die den anhängenden Antikörper bei niedrigen Temperaturen internalisieren,^[70,71] ein Effekt, mit dem man CTCs ablösen kann, indem man ein entsprechend modifiziertes Substrat abkühlt. So lassen sich CTCs aus Patientenproben isolieren und die tumorrelevanten Mutationen durch Sequenzierung ermitteln.

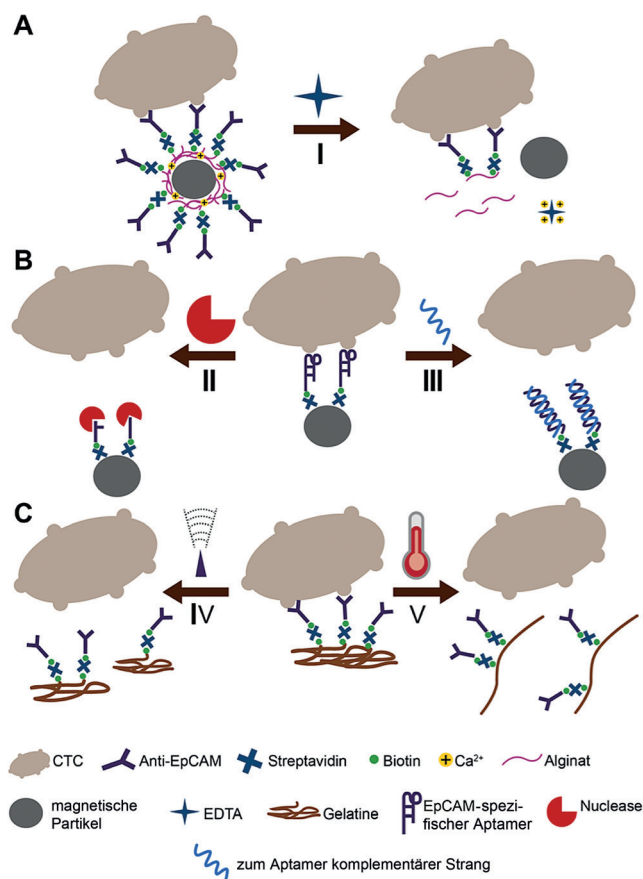


Abbildung 4. Mechanismen der CTC-Freisetzung. A) Chemische Ablösung von CTCs. Magnetische Kügelchen werden durch schichtweise Ablagerung in Gegenwart von Ca²⁺ mit Alginat beschichtet, und EpCAM-spezifische Antikörper werden an der Alginatschicht durch Biotin/Streptavidin-Bindung fixiert. Die Zugabe von EDTA (I) führt zur Herauslösung der Ca²⁺-Ionen, wodurch die Wechselwirkung zwischen den Zellen und den beschichteten Kügelchen aufgelöst und die Zellen freigesetzt werden.^[65] B) Enzymatische und selbstorganisationsbasierte Ablösung von CTCs. CTCs werden mit aptamerbeschichteten magnetischen Kügelchen eingefangen und dann entweder mit Nukleasen (II), die die Aptamere spalten, oder mit einem zum Aptamer komplementären Strang (III), der die Zellen zur Dissoziation aus dem Zell/Aptamer-Komplex zwingt, abgelöst.^[66–68] C) Mechanosensitive und thermische Ablösung von CTCs. CTCs werden auf einer antikörperfunktionalisierten Gelatine-Oberfläche gefangen. Die Freisetzung erfolgt entweder mechanisch (IV) oder durch Denaturierung der Gelatine-Nanobeschichtung durch Anheben der Temperatur auf über 30 °C (V).^[69]

Mit Aptameren anstelle von Antikörpern als bindenden Agenzien wird ein alternativer Ansatz möglich, der verschiedene Optionen für die Freisetzung lebender Zellen bietet. Aptamere, die in großen DNA-Netzwerken^[66] oder auf Silicium-Nanodrähten (SiNWs)^[67] immobilisiert sind, werden zum Einfangen von Zellen verwendet. Die Freisetzung der Zellen gelingt durch Nukleasebehandlung. Mit aptamermodifizierten Nanodrähten gelang eine Einfangrate von 95 % und eine Gewinnung von 94 % bei Lungenkrebszellen.^[67] Alternativ lässt sich die Freisetzung der Zellen auch mit einer Nukleinsäuresequenz bewerkstelligen, die komplementär zu der des Fängeraptamers ist.^[68] Aptamerbasierte Verfahren erlauben eine Zellfreisetzung unter schonenden Bedingungen, die die Gewinnung lebensfähiger Zellen erleichtert.

Diese Methoden sind allerdings noch nicht in Vollblut getestet worden, vor allem, weil dort die Aptamere durch natürlich vorkommende Nukleasen abgebaut werden.

3.3. Verfahren zur Kultivierung und Vermehrung von CTCs

Die Isolierung und Gewinnung von CTCs ermöglicht die Anwendung von Einzelzell-Verfahren, mit denen wichtige Informationen gewonnen werden können. Die spezifischen Faktoren, aufgrund derer CTCs sekundäre Tumoren bilden, sind aber noch nicht identifiziert, sodass Kultur-Testverfahren für die weitere Charakterisierung unumgänglich sind. Die phänotypische Analyse des metastatischen Potenzials oder der Chemosensitivität erfordert, dass lebensfähige Zellen am Leben gehalten und kultiviert werden. Dazu benötigt man eine Umgebung, die Zellwachstum und -teilung begünstigt. Mithilfe von Kulturen aus primären CTCs konnte die Sensitivität von Patienten gegenüber Therapeutika verfolgt werden,^[56] außerdem können Subpopulationen von CTCs^[54,55] besser auf ihr metastatisches Potenzial untersucht werden.

Eine Reihe von Apparaturen und Materialien sind für die Kultivierung von CTCs vielversprechend. Eine aktuelle Untersuchung einer Immunaффinitäts-Fängervorrichtung auf Graphenoxidbasis^[72] zeigte, dass Tumorzellen nach dem Einfangen direkt auf der Oxidoberfläche kultiviert werden konnten. Auch mit magnetischen Nanopartikeln^[73] lassen sich lebende Zellen expandieren. Mikrofluidik-Chips mit eingebetteten Mikrostrukturen für das immunologische Einfangen von Zellen^[74] oder mit Kompartimenten zum Fangen von Zellen mit antikörpermodifizierten magnetischen Nanopartikeln^[75] sind ebenfalls für die Kultivierung nach Zellisolierung effizient nutzbar. Mit letztgenannter Anordnung wurden auch CTCs im Mausmodell eines Brusttumors verfolgt. Dies ist nur mit wenigen Apparaturen möglich, weil von dieser Art Tiermodell nur sehr kleine Proben erhalten werden können.

3.4. Identifizierung von CTC-Subpopulationen und Visualisierung ihrer Heterogenität

Tumore sind intrinsisch heterogen und enthalten Zellen, die aufgrund unterschiedlicher Einflüsse durch Mikroumgebung und Therapeutika divergente Phänotypen besitzen.^[76,77] Zellen, die vom Tumor abgelöst werden und in den Blutkreislauf eintreten, werden weitere abweichende Eigenschaften entwickeln, wenn sie im Kreislauf bleiben; verschiedene Untersuchungen haben heterogene Transkriptionshöhen und Expressionen von Oberflächenmarkern in CTCs nachgewiesen.^[34,78] Der Übergang von Epithel zu Mesenchym (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) ist eine Gruppe zellulärer Veränderungen, die ablaufen, wenn Tumorzellen sich von ihrem epithelialen Ursprung wegentwickeln und dabei die größere Plastizität erwerben, die für die Metastase nötig ist.^[79] EMT ist daher eine Quelle der dynamischen Heterogenität von CTCs. Die Identifizierung spezifischer Subpopulationen von CTCs mit markantem metastatischem Potenzial verdeutlicht außerdem, dass diese Zellen nicht als phänotypisch identisch mit den Zellen aus den je-

weiligen soliden Tumoren angesehen werden dürfen (Abbildung 5A).^[80] Die morphologische Heterogenität kann auch Hinweis auf das metastatische Potenzial sein, das auf Veränderungen in prometastatischen Signalwegen der Zelle beruht. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Anzahl von CTCs mit sehr kleinen Zellkernen bei Prostatakrebspatienten mit viszerale Metastasen erhöht ist.^[81]

Quellen dynamischer und statischer Heterogenität stellen eine Herausforderung für die Gewinnung und Charakterisierung von CTCs dar. Mit Mikroapparaturen zur Trennung

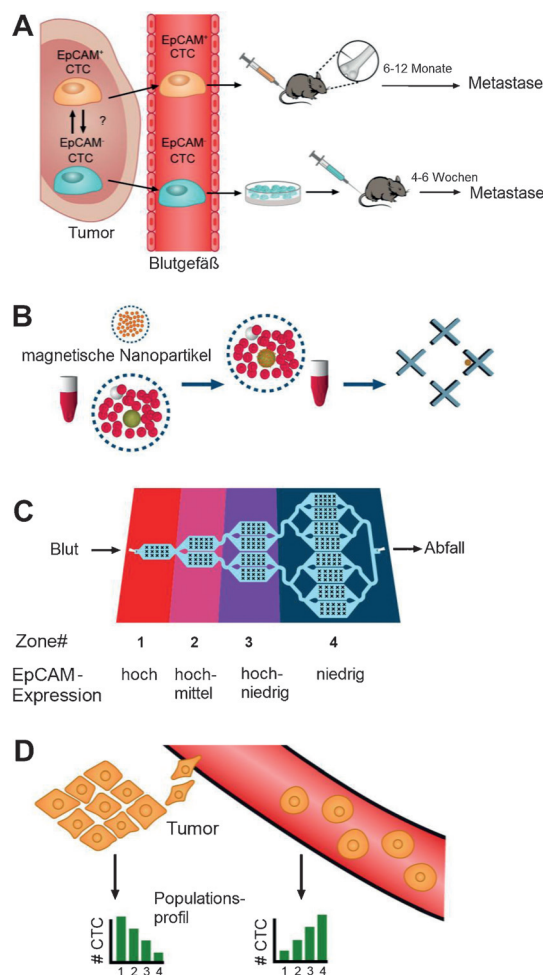


Abbildung 5. In den CTCs eines Patienten können phänotypisch unterscheidbare Subpopulationen vorkommen. A) Spezifische humane Brustkrebs-CTCs können in Mäusen Metastasen hervorrufen. Aus Patienten können EpCAM⁺- und EpCAM⁻-CTCs isoliert werden, wobei diese Zellen unterschiedlich ausgeprägtes metastatisches Potenzial besitzen.^[86] B–D) Mikrofluidischer Ansatz zur Isolierung von Subpopulationen von CTCs. B) CTCs aus Vollblut werden mit magnetischen Nanopartikeln, die mit anti-EpCam-Antikörpern beschichtet sind, markiert. Sie werden dann in einem Mikrofluidikchip gefangen, der X-förmige Mikrohindernisse enthält, die lokale Regionen mit niedrigem Durchfluss erzeugen.^[83] C) Der Chip sortiert die Zellen in vier Zonen entsprechend der Expressionshöhe von EpCAM auf der Oberfläche. Zellen mit hoher EpCAM-Expression werden in Zone 1 gefangen, während Zellen mit niedriger EpCAM-Expression in Zone 4 gelangen.^[83] D) Einsatz des Chips zur Isolierung von Subpopulationen. Die CTC-Subpopulationen konnten mit diesem Ansatz bei menschlichen Patienten und bei tumortragenden Tieren sichtbar gemacht werden.^[84] Abdruck in veränderter Form nach Lit. [83, 84, 86].

von Zell-Zell-Wechselwirkungen wurden kultivierte Zellen bei ihrem Eintritt in verschiedene EMT-Phasen untersucht.^[82] Zellen unterschiedlicher Phasen zeigten unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Chemotherapeutika. Dieser Ansatz wurde jedoch noch nicht an Patienten-CTCs erprobt. Mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) wurden CTC-Subpopulationen aus Patientenproben aufgetrennt.^[54,55] Dies gelingt jedoch nicht mit allen Subpopulationen und erfordert große Blutproben, die in klinischen Routineuntersuchungen oder durch CTC-Kulturen nur schwer zu erhalten sind. Daneben wurden Mikrofluidik-Chips eingesetzt, um eine große Fraktion von CTCs zu erhalten, die dann auf Einzelzellbasis charakterisiert werden konnten.^[53] Keine dieser Methoden lässt sich jedoch für Hochdurchsatz-Untersuchungen von CTC-Heterogenitäten in Patienten einsetzen.

Ein aktueller Fortschritt bei der Trennung von CTC-Subpopulationen wurde mit einem Mikrofluidik-Chip erzielt, der verschiedene Zonen besitzt, in denen selektiv Zellen mit unterschiedlicher Expressionshöhe eines Oberflächenantigens eingefangen werden (Abbildung 5B,C).^[83–85] CTCs, die mit magnetischen und mit anti-EpCAM-Antikörpern beschichteten Nanopartikeln markiert sind, können entsprechend der Menge an einem Oberflächenantigen sortiert werden, von dem bekannt ist, dass es während der EMT abnimmt. Das Einfangen der Zellen mit Nanopartikeln funktioniert wegen der großen Zahl von Bindungsereignissen, die an der Oberfläche möglich sind, gut; im konkreten Fall stellt allerdings die geringe magnetische Suszeptibilität der Partikel eine Hürde dar. Daher wurden in den Chips X-förmige Mikrostrukturen erzeugt, durch die Regionen niedrigen Flusses entstehen (Abbildung 5B). Die verschiedenen Zonen innerhalb des Chips haben abnehmende lineare Flussgeschwindigkeiten, anhand derer CTCs mit hoher EpCAM-Expression von solchen mit niedriger EpCAM-Expression abgetrennt werden können (Abbildung 5C). Mit diesem Ansatz lassen sich niedrige Zahlen von Tumorzellen mit ausgezeichneter Sensitivität aus dem Blut gewinnen; außerdem wurde der Nachweis geführt, dass Krebszellen mit wechselnder Expressionshöhe von EpCAM effizient getrennt werden.^[83] Die Analyse von Proben von Prostatakrebspatienten ergab, dass diese Anordnung verwendet werden kann, um die Heterogenität in CTCs effektiv zu profilieren, indem man mehrere unterschiedliche Marker nutzt, und dass der Grad der EMT in CTCs von Patienten damit aufgeklärt werden kann. Mit diesem Chip kann man auch CTCs in Tiermodellen von Krebs verfolgen und so eine Möglichkeit eröffnen, um die Dynamik der EMT besser zu verstehen (Abbildung 5D).^[84,86]

Als Alternative zu Ereignissen, die durch einzelne Zellen hervorgerufen werden, können CTCs auch in Form von Zellhaufen, die aus dem Tumor wegbrechen und als Cluster wandern, zu Metastasen führen. Bei Zellclustern vermutet man, dass sie Metastasen initiieren, wenn sie in Kapillaren steckenbleiben.^[87] Technologien wie der Cluster-Chip^[88] und Gelatine-Nanocoating-Substrate^[69] fangen bei 30 % der Brustkrebspatientinnen CTC-Cluster ein. Diese sind heterogen und enthalten aktiv proliferierende und ruhende Zellen. Es werden weitere Arbeiten nötig sein, um die klinische Signifikanz dieser Ansätze und die Rolle der CTC-Heterogenität bei der Tumorprogression aufzuklären.

3.5. Integrierte molekulare Analyse von CTCs

Die Profilierung molekularer CTC-Biomarker ist ein kritischer Schritt, um den klinischen Einsatz der CTC-Analyse voranzutreiben. Dabei wäre es sicher ideal, das CTC-„Invasom“ – also die Gesamtheit aller Biomarker, aus denen man mögliche invasive Eigenschaften, die zu Metastasen führen können, ablesen kann – zu charakterisieren.^[89] Eine Reihe von Untersuchungen befassten sich mit der Sequenzierung von Patienten-CTCs und ergaben, dass charakteristische Mutationen, die im Primärtumor vorlagen, auch in den zirkulierenden Zellen nachgewiesen werden konnten.^[64,90–92] Der Inhalt des CTC-Invasoms bleibt jedoch unbekannt. CTCs sind inhärent zerbrechliche Zellen, was ihre Analyse erschwert, weil es schwierig ist zu beurteilen, ob Zellen Veränderungen in ihrem molekularen Profil durchlaufen, wenn sie zwischen den Fängervorrichtungen und den Analysegeräten transferiert werden. Um kleine Unterschiede zwischen invasiven und gutartigen CTCs aufzudecken, muss man die Umgebungsbedingungen streng kontrollieren. Es ist daher attraktiv, in die Apparatur Funktionen zu integrieren, die eine Charakterisierung der CTCs ohne umfangreiche Manipulation der isolierten Zellen ermöglichen.

Elektrochemische Sensoren sind für solche integrierten Apparaturen interessant, weil sie sich einfach in Mikrofluidik-Chips einbauen lassen und weil sie für Multiplexanalysen individuell funktionalisiert und adressiert werden können. Impedanzsensoren wurden für die CTC-Identifizierung benutzt,^[31,93] und Voltammetriesensoren sind spezifisch zur Identifizierung von Krebszellen geeignet.^[94–97] Jüngst wurde gezeigt, wie die Aufarbeitung von Vollblut, die Gewinnung von CTCs, die Zellyse und die Analyse der mRNA-Expression mit einem Chip-basierten elektrochemischen Detektor ablaufen kann (Abbildung 6A).^[98] Der gesamte Prozess wurde auf einem einzigen integrierten Chip durchgeführt und war innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen. Diese kurze Verweildauer ist von großem Vorteil, weil sie hilft, die Eigenschaften der CTCs zu erhalten und Störungen durch die Probenbehandlung in engen Grenzen hält.

Chip-basierte Mikro-Hall-Detektoren (μ HD) können ebenfalls eingesetzt werden, um CTCs von Patientenproben direkt zu profilieren.^[99,100] Antikörper-beladene magnetische Nanopartikel werden mit dem CTC-haltigen Vollblut inkubiert und in einem Mikrofluidikchip, der den μ Hall-Detektor enthält, weiterbehandelt (Abbildung 6B). Die Zellen werden einem magnetischen Feld ausgesetzt und nehmen ein magnetisches Moment an, das proportional zur Zahl der Nanopartikel auf der Zelloberfläche ist. Unterschiedliche Marker können mit unterschiedlichen Nanopartikeln, die verschiedene Magnetisierungseigenschaften besitzen, gleichzeitig analysiert werden. Dieser Ansatz hat sich als wirkungsvolles Verfahren erwiesen, um CTCs in klinischen Proben mit wesentlich höherer Sensitivität als mit CellSearch zu identifizieren; er wurde verwendet, um CTCs in einem Maus-Xenograftmodell zu verfolgen.

Eine neue Klasse von Nanopartikel-basierten Sonden verfolgt eine alternative Strategie, um Biomarker in intakten CTCs zu analysieren.^[101] NanoFlares werden hergestellt, indem man Goldnanopartikel mit Thiol-derivatisierten Oligo-

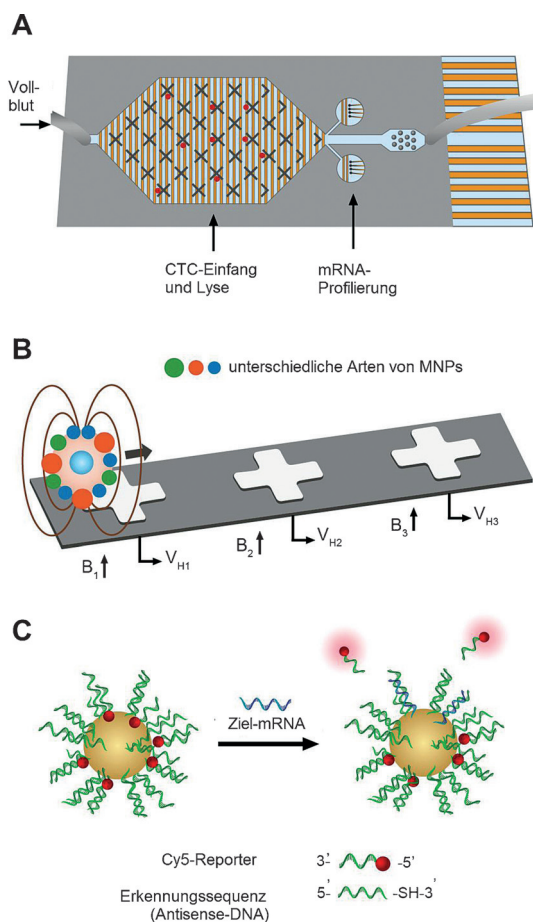


Abbildung 6. Systeme für eine integrierte molekulare Analyse von CTCs. A) An magnetische Nanopartikel gebundene CTCs werden im Mikrofluidikchip eingefangen, dort lysiert und mit nanostrukturierten Mikroelektroden auf mRNA-Expression analysiert.^[98] B) Der μ Hall-Chip kann CTCs nachweisen, die mit verschiedenen Arten magnetischer Nanopartikel markiert sind, von denen jedes auf einen anderen Biomarker anspricht. Die magnetischen Momente der Zellen werden dann in mikrostrukturierten Hall-Sensoren in einem räumlich veränderlichen Feld (β_1 , β_2 , β_3) gemessen.^[99] C) NanoFlares bestehen aus einem Monolayer aus Antisense-DNA (Erkennungssequenz), der an die Oberfläche eines sphärischen Goldnanopartikels adsorbiert ist. Eine fluoreszierende Reportersequenz (sie enthält den Fluorophor Cy5) wird an die Erkennungssequenz hybridisiert. Bindet die Ziel-mRNA an die komplementäre Fängersequenz, wird die Reportersequenz verdrängt und erzeugt ein Fluoreszenzsignal.^[101] Abdruck in veränderter Form nach Lit. [98, 99, 101].

nukleotiden funktionalisierte, die zu einer zu untersuchenden mRNA-Sequenz komplementär sind. Ein synthetisches Komplement mit einem angehängten Fluorophor wird mit der immobilisierten Sequenz hybridisiert. Die Emission dieser Sequenz wird durch die Nähe der Goldoberfläche unterdrückt (Abbildung 6 C). Die NanoFlares dringen leicht in die Zellen ein, und wenn die Ziel-mRNA vorhanden ist, wird das fluoreszierende Oligonukleotid freigesetzt und erzeugt ein Signal, mit dem die Zellen als Funktion der mRNA-Expression aufgespürt werden können. Der Ansatz wurde bei einer CTC-Analyse mit NanoFlares angewendet, die spezifisch waren für die mesenchymalen Marker Twist, Vimentin und Fibronectin und den epithelialen Marker E-Cadherin. Bei der

Analyse eines metastasierenden Brustkrebses einer Patientin wurde eine spezifische Subpopulation von Zellen durch Durchflusszytometrie visualisiert. Dieser Ansatz zeigt einen erheblichen Fortschritt, denn er erfordert keine Fängerschritte für die CTC-Analyse und hat das Potenzial, CTCs mit einem spezifischen molekularen Phänotyp zu identifizieren.

3.6. In-situ-Phänotypanalyse von CTCs

Während die Entwicklung integrierter Chips die Untersuchung bekannter CTC-Biomarker erleichtert, bleibt die ganze Gruppe der Metastasen-initiiierenden Faktoren uncharakterisiert. Daher sind Methoden, die zelluläre Phänotypen registrieren, wertvolle Informationsquellen, und sie entwickeln sich parallel zu den Biomarkertests weiter. Mobilität ist ein entscheidender Aspekt zellulären Verhaltens, von dem man glaubt, dass er zur Aggressivität von Tumorzellen beiträgt. Dieses Verhalten scheint von Zelldichte und lokaler Umgebung abzuhängen, was die Einzelzell-Ansätze besonders vorteilhaft macht.

Neuerliche Fortschritte in diesem Gebiet umfassen die Entwicklung von Mikrofluidikchips, mit denen man die Migration eines spezifischen mesenchymalen Phänotyps von Zellen mit Einzelzell-Auflösung messen kann.^[102] Mit einem Feld von über 3000 miniaturisierten Kammern können Migrationsmuster und Geschwindigkeiten von Einzelzellen verfolgt werden (Abbildung 7 A). Kultivierte Zellen, die behandelt waren, um EMT zu induzieren, hatten einen aggressiveren Migrationsphänotyp, und Zellen mit signifikanter Wirkstoffresistenz wiesen die höchsten Geschwindigkeiten auf. Eine 3D-Version des Mikrofluidikchips ermöglicht auch, dieses Verhalten als Funktion der Zelldichte zu untersuchen (Abbildung 7 B).^[103] Ansätze, die Mikromaschinen an Krebszellen andocken, könnten auch andere Wege aufzeigen, um die Zellmigration zu analysieren.^[104, 105] Diese Arten von Phänotypanalysen sind noch nicht auf Patienten-CTCs angewendet worden, vor allem wegen der Schwierigkeiten, die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten. Die kontinuierlichen Fortschritte bei diesen Methoden zusammen mit der molekularen Profilierung sollten aber helfen, die Faktoren aufzuklären, die die Invasivität von CTCs verstärken.

3.7. In-vivo-CTC-Analyse

Während die Ex-vivo-Analyse von CTCs umfangreiche Informationen über die Menge dieser Zellen in verschiedenen Patienten und die molekularen Profile blutstämmiger Tumorzellen lieferte, würde die Möglichkeit, CTCs in vivo zu beobachten, einen direkten Zugang zu den Messwerten in Echtzeit eröffnen.

Diese Art von Messung stellt eine gewaltige Herausforderung dar, denn große Mengen anderer Zellen im Hintergrund und die Dynamik blutstämmiger Zellen verkomplizieren die Analyse. Dennoch haben verschiedene Ansätze vielversprechende Fortschritte zu einem In-vivo-CTC-Monitoring erbracht.

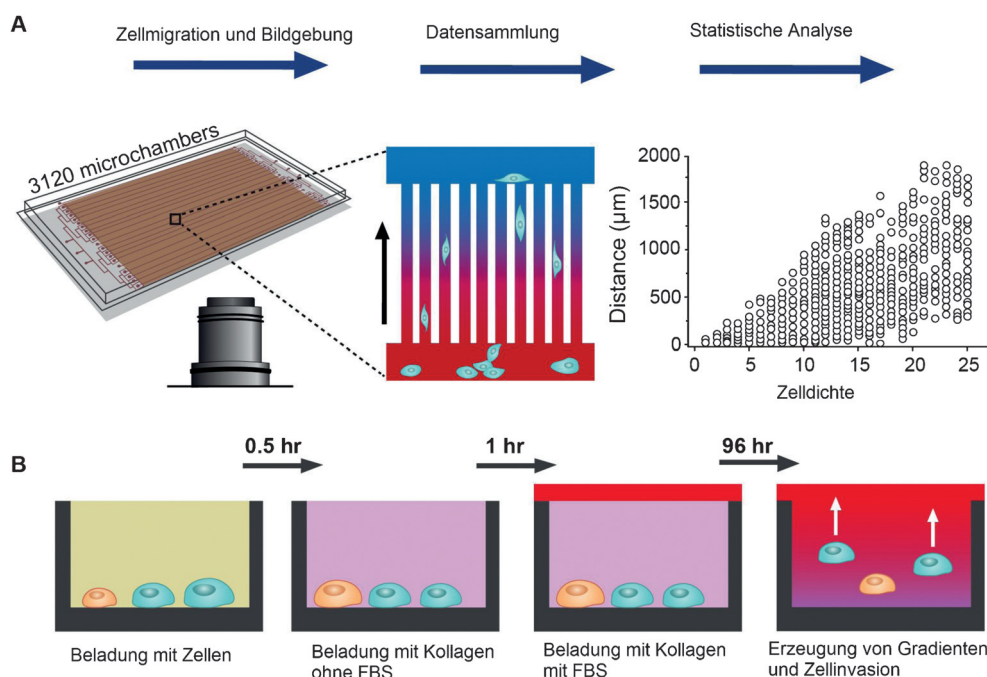


Abbildung 7. In-situ-Phänotypanalyse von CTCs. A) Der M-Chip wird verwendet, um die Migration von mesenchymartigen Zellen zu bestimmen. Dazu werden die Zellen auf die Basismembran an einem Ende des Chips ausplattiert. Sie wandern entlang von Mikrokanälen auf ein chemotaktisches Reagens (blau) zu. Die Migrationsstrecke ist abhängig von der Zahl der Zellen pro Kammer (Zelldichte).^[102] B) Im MI-Chip läuft ein 3D-Zellmigrationstest ab. Die Zellen werden auf ein Kollagengel im Inneren der Miniaturkammern platziert. Nährstoffe werden auf die Kollagenschicht aufgebracht. Die Zellen bewegen sich auf die Nährstoffe (z. B. fetales Kälberserum) zu und werden mithilfe von grün fluoreszierendem Protein (GFP) verfolgt.^[103] Abdruck in veränderter Form nach Lit. [102, 103].

Eine Lösungsmöglichkeit für dieses Problem besteht in der Injektion fluoreszierender Liganden, die spezifisch Krebszellen binden, und in der Verwendung von Techniken wie der Durchflusszytometrie, um die Zellen in Blutgefäßen zu registrieren (Abbildung 8A).^[106] Mit dieser Methode wurden CTCs in Echtzeit in einem Mausmodell für metastasierenden Krebs verfolgt. Interessanterweise konnten CTCs Wochen, bevor die Metastasen beobachtet wurden, nachgewiesen werden; dies weist auf die hohe Empfindlichkeit dieses Ansatzes hin. Die Haupteinschränkung dieser Methode ist, dass kein signifikantes Eindringen in das Gewebe erreicht werden kann, und es ist nicht klar, ob die erzeugten Signale ausreichend für die Anwendung am Menschen sind.

Eine photoakustische Methode mit viel tieferer Gewebepenetration (ca. 3 cm) wurde ebenso für die CTC-Analyse in vivo angewendet.^[107] Dabei wurde versucht, CTCs in Blutgefäßen mit magnetischen Nanopartikeln zu konzentrieren; die Spezifität der CTC-Identifikation sollte durch einen Zwei-Farb-Ansatz erhöht werden (Abbildung 8B). Die Möglichkeit, die CTCs in vivo magnetisch zu konzentrieren, wurde in doppelter Absicht vorgeschlagen, denn nach der Quantifizierung könnte das lokale Einfangen von Zellen für eine nicht-invasive Laserablation verstärkt werden.

Eine neue Methode zum Einfangen von CTCs in vivo nutzt einen EpCAM-funktionalisierten Seldinger-Führungsdraht aus rostfreiem Stahl (FSMW, functionalized stainless steel medical wire), der eine halbe Stunde lang in die Vene eines Patienten geschoben wird (Abbildung 8C,D).^[108] Mit dem Draht wurden CTCs von 24 Brust- oder Lungenkarzi-

nomen gefangen und im Anschluss durch Immunfluoreszenz analysiert.

Interessanterweise hat auch die Google X Life Sciences-Gruppe die Herausforderung der In-vivo-CTC-Analyse angenommen.^[109] Während nur wenige Details über die Versuche bekannt sind, wurde ein Interesse an Nanopartikeln, die die Entwicklung eines „Frühwarnsystems“ gegen Krebs ermöglichen würden, veröffentlicht.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Analyse von Tumorzellen, die in den Kreislauf eintreten, kann letztendlich die nicht-invasive Charakterisierung und Profilierung der Tumoren in Echtzeit ermöglichen, während die Behandlung läuft oder ein Rückfall diagnostiziert wird. Die Seltenheit und heterogene Biologie dieser Zellen stellen hohe Hürden für die Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung dar. In den 1990er und 2000er Jahren tauchten die ersten Ansätze auf, die eine empfindliche Auszählung von CTCs in Patientenproben erlaubten. Trotz zahlreicher Untersuchungen, die das CTC-Vorkommen als Funktion der Tumorprogression analysierten, fanden diese Zellen nicht ihren Weg in die klinische Schulmedizin als bedeutsame Biomarker, die allgemein mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden konnten.

Die neuen Apparaturen und Materialien, die in letzter Zeit eingeführt wurden, sind wertvolle Hilfsmittel, mit denen mehr Information aus diesen Zellen verfügbar gemacht wer-

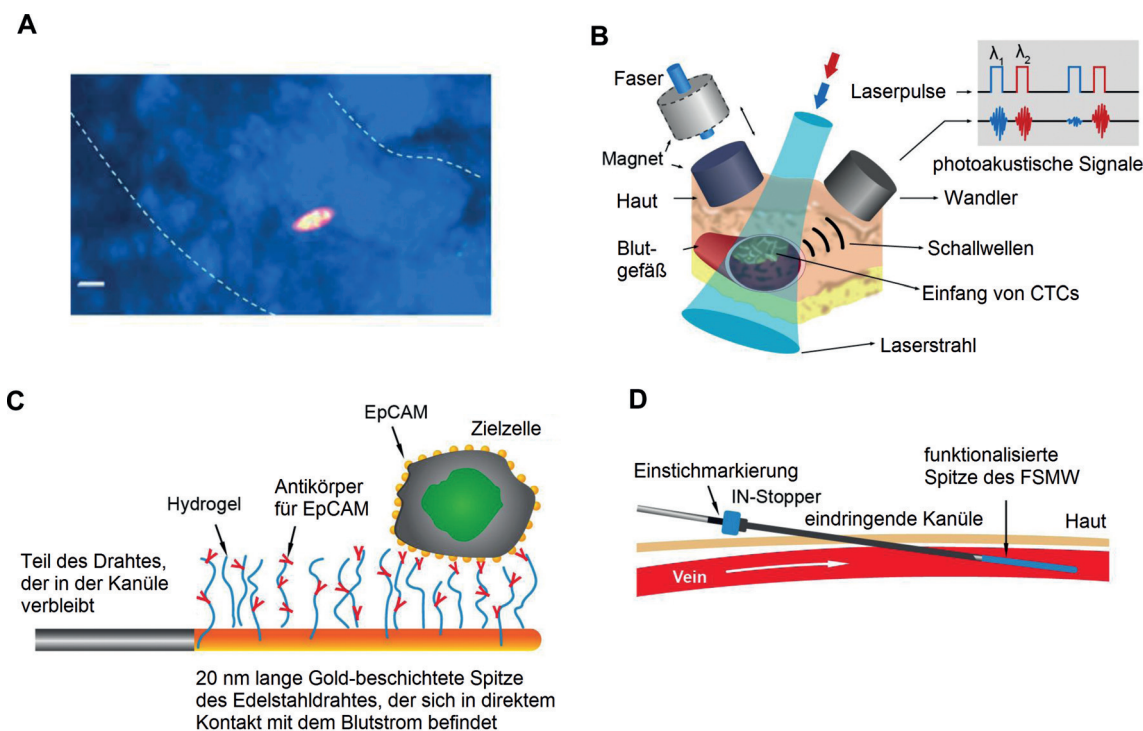


Abbildung 8. In-vivo-Analyse von CTCs. A) In-vivo-Nachweis fluoreszierender Zellen im Kreislauf mit intravitaler Multiphotonen-Durchflusszytometrie. Leukämie-Tumorzellen werden mit folatkonjugiertem Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün) und dem lipophilen Tracer DiI (rot) markiert. Maßstabsbalken: 10 μm .^[106] B) Magnetische In-vivo-Anreicherung durch photoakustischen Zwei-Farben-Nachweis von CTCs. Das Laserlicht wird nahe dem externen Magneten oder durch ein Loch im Magneten mit einer Lichtleiterfaser eingestrahlt.^[107] C) Ein funktionalisierter Seldinger-Führungsdraht aus Edelstahl (FSMW) kann zum intravenösen Einfangen von CTCs verwendet werden. EpCAM-Antikörper werden an ein Polycarboxylat-Hydrogel auf der Oberfläche des vergoldeten Führungsdrahtes gebunden. D) Insertion eines FSMW in die Ellenbogenvene durch eine konventionelle Kanüle. Der FSMW wird in die Kanüle vorgeschoben, bis die anti-EpCAM-funktionalisierte Oberfläche 2 cm lang in den Blutfluss ragt.^[108] Abdruck in veränderter Form nach Lit. [106–108].

den kann, sodass ihr Phänotyp und die klinische Relevanz besser eingeschätzt werden können. Neue Systeme zur Gewinnung und genomischen Charakterisierung von Zellen haben die Vorstellung gestärkt, dass CTCs die flüssige Biopsie eines Tumors darstellen. Integrierte Mikrofluidikchips und neue Nanomaterialien lassen eine Analyse von CTCs in situ zu, womit sichergestellt werden soll, dass die gewonnenen genomischen und proteomischen Informationen tatsächlich die wahren Charakteristika der Zellen widerspiegeln und keine Artefakte sind, die durch die Probenbehandlung entstanden sind. Die Entwicklung neuer analytischer Verfahren, die ein Verfolgen von CTCs in vivo ermöglichen, ist ein wichtiges Ziel, das eine Analyse unter physiologisch relevanten Bedingungen erlauben würde. Kontinuierliche Fortschritte in all diesen Bereichen sollten unser Verständnis der Mechanismen der Tumormetastasierung vertiefen, das für die Bekämpfung dieser Erkrankung von so grundlegender Bedeutung ist.

Danksagung

Wir danken folgenden Institutionen für die Unterstützung unserer Arbeiten über die Analyse zirkulierender Tumorzellen: Ontario Research Fund, Canadian Institutes of Health Research, Canadian Cancer Research Society, Natural

Sciences and Engineering Research Council und Connaught Fund. Wir danken außerdem den zahlreichen Patienten, von denen wir Proben für unsere Studien erhalten haben.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1252–1265
Angew. Chem. **2016**, 128, 1270–1284

- [1] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, 100, 57.
- [2] G. P. Gupta, J. Massague, *Cell* **2006**, 127, 679.
- [3] C. L. Chaffer, R. A. Weinberg, *Science* **2011**, 331, 1559.
- [4] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, 144, 646.
- [5] T. R. Ashworth, *Aust. Med. J.* **1869**, 14, 146.
- [6] K. Pantel, R. H. Brakenhoff, B. Brandt, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 329.
- [7] C. Alix-Panabieres, K. Pantel, *Clin. Chem.* **2013**, 59, 110.
- [8] V. Plaks, C. D. Koopman, Z. Werb, *Science* **2013**, 341, 1186.
- [9] F. A. Coumans, S. T. Ligthart, J. W. Uhr, L. W. Terstappen, *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 5711.
- [10] C. Alix-Panabieres, K. Pantel, *Nat. Rev. Cancer* **2014**, 14, 623.
- [11] E. Racila, D. Euhus, A. J. Weiss, C. Rao, J. McConnell, L. W. Terstappen, J. W. Uhr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 4589.
- [12] A. G. Tibbe, B. G. de Grooth, J. Greve, P. A. Liberti, G. J. Dolan, L. W. Terstappen, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 1210.
- [13] S. Miltenyi, W. Muller, W. Weichel, A. Radbruch, *Cytometry* **1990**, 11, 231.
- [14] M. Cristofanilli, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W. Terstappen, D. F. Hayes, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 351, 781.

- [15] S. J. Cohen, C. J. Punt, N. Iannotti, B. H. Saidman, K. D. Sabbath, N. Y. Gabrail, J. Picus, M. Morse, E. Mitchell, M. C. Miller, G. V. Doyle, H. Tissing, L. W. Terstappen, N. J. Meropol, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3213.
- [16] J. S. de Bono, H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V. Doyle, L. W. Terstappen, K. J. Pienta, D. Raghavan, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6302.
- [17] M. G. Krebs, R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, J. M. Hou, A. Greystoke, T. H. Ward, R. Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, F. H. Blackhall, *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1556.
- [18] J. M. Hou, M. G. Krebs, L. Lancashire, R. Sloane, A. Backen, R. K. Swain, L. J. Priest, A. Greystoke, C. Zhou, K. Morris, T. Ward, F. H. Blackhall, C. Dive, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 525.
- [19] M. S. Khan, A. Kirkwood, T. Tsigani, J. Garcia-Hernandez, J. A. Hartley, M. E. Caplin, T. Meyer, *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 365.
- [20] L. Khoja, P. Lorigan, C. Zhou, M. Lancashire, J. Booth, J. Cummings, R. Califano, G. Clack, A. Hughes, C. Dive, *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 1582.
- [21] A. M. Sieuwerts, J. Kraan, J. Bolt, P. van der Spoel, F. Elstrodt, M. Schutte, J. W. Martens, J. W. Gratama, S. Sleijfer, J. A. Foekens, *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 61.
- [22] F. Farace, C. Massard, N. Vimond, F. Drusch, N. Jacques, F. Billiot, A. Laplanche, A. Chauchereau, L. Lacroix, D. Planchar, S. Le Moulec, F. Andre, K. Fizazi, J. C. Soria, P. Vielh, *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 847.
- [23] S. K. Arya, B. Lim, A. R. Rahman, *Lab Chip* **2013**, *13*, 1995.
- [24] C. Alix-Panabières, K. Pantel, *Lab Chip* **2014**, *14*, 57.
- [25] P. Chen, Y. Y. Huang, K. Hoshino, X. Zhang, *Lab Chip* **2014**, *14*, 446.
- [26] H. J. Yoon, M. Kozminsky, S. Nagraath, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1995.
- [27] S. Nagraath, L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. A. Haber, M. Toner, *Nature* **2007**, *450*, 1235.
- [28] A. E. Saliba, L. Saias, E. Psychari, N. Minc, D. Simon, F. C. Bidard, C. Mathiot, J. Y. Pierga, V. Fraissier, J. Salamero, V. Saada, F. Farace, P. Vielh, L. Malaquin, J. L. Viovy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14524.
- [29] J. Autebert, B. Coudert, J. Champ, L. Saias, E. T. Guneri, R. Lebofsky, F. C. Bidard, J. Y. Pierga, F. Farace, S. Descroix, L. Malaquin, J. L. Viovy, *Lab Chip* **2015**, *15*, 2090–2101.
- [30] 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, Jr., A. J. Gilman, J. B. Lord, D. Winkur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagraath, L. V. Sequist, R. J. Lee, K. J. Isselbacher, S. Maheswaran, D. A. Haber, M. Toner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18392.
- [31] A. A. Adams, P. I. Okagbare, J. Feng, M. L. Hupert, D. Patterson, J. Gottert, R. L. McCarley, D. Nikitopoulos, M. C. Murphy, S. A. Soper, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8633.
- [32] P. G. Schiro, M. Zhao, J. S. Kuo, K. M. Koehler, D. E. Sabath, D. T. Chiu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4618; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4696.
- [33] 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, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3970.
- [34] A. A. Powell, A. H. Talasaz, H. Zhang, M. A. Coram, A. Reddy, G. Deng, M. L. Telli, R. H. Advani, R. W. Carlson, J. A. Mollick, S. Sheth, A. W. Kurian, J. M. Ford, F. E. Stockdale, S. R. Quake, R. F. Pease, M. N. Mindrinos, G. Bhanot, S. H. Dairkee, R. W. Davis, S. S. Jeffrey, *PLoS One* **2012**, *7*, e33788.
- [35] G. Deng, S. Krishnakumar, A. A. Powell, H. Zhang, M. N. Mindrinos, M. L. Telli, R. W. Davis, S. S. Jeffrey, *BMC Cancer* **2014**, *14*, 456.
- [36] S. Wang, H. Wang, J. Jiao, K. J. Chen, G. E. Owens, K. Kamei, J. Sun, D. J. Sherman, C. P. Behrenbruch, H. Wu, H. R. Tseng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8970; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9132.
- [37] S. Wang, K. Liu, J. Liu, Z. T. Yu, X. Xu, L. Zhao, T. Lee, E. K. Lee, J. Reiss, Y. K. Lee, L. W. Chung, J. Huang, M. Rettig, D. Seligson, K. N. Duraiswamy, C. K. Shen, H. R. Tseng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3084; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3140.
- [38] M. Lin, J. F. Chen, Y. T. Lu, Y. Zhang, J. Song, S. Hou, Z. Ke, H. R. Tseng, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2941.
- [39] J. Sekine, S. C. Luo, S. Wang, B. Zhu, H. R. Tseng, H. H. Yu, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4788.
- [40] N. Zhang, Y. Deng, Q. Tai, B. Cheng, L. Zhao, Q. Shen, R. He, L. Hong, W. Liu, S. Guo, K. Liu, H. R. Tseng, B. Xiong, X. Z. Zhao, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2756.
- [41] S. H. Seal, *Cancer* **1964**, *17*, 637.
- [42] S. Zheng, H. Lin, J. Q. Liu, M. Balic, R. Datar, R. J. Cote, Y. C. Tai, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1162*, 154.
- [43] P. D. Rye, H. K. Hoifodt, G. E. Overli, O. Fodstad, *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 99.
- [44] G. Vona, A. Sabile, M. Louha, V. Sitruk, S. Romana, K. Schutze, F. Capron, D. Franco, M. Pazzagli, M. Vekemans, B. Lacour, C. Brechot, P. Paterlini-Brechot, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 57.
- [45] H. K. Lin, S. Zheng, A. J. Williams, M. Balic, S. Groshen, H. I. Scher, M. Fleisher, W. Stadler, R. H. Datar, Y. C. Tai, R. J. Cote, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 5011.
- [46] P. Rostagno, J. L. Moll, J. C. Bisconte, C. Caldani, *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 2481.
- [47] H. J. Lee, J. H. Oh, J. M. Oh, J. M. Park, J. G. Lee, M. S. Kim, Y. J. Kim, H. J. Kang, J. Jeong, S. I. Kim, S. S. Lee, J. W. Choi, N. Huh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8337; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8495.
- [48] S. C. Hur, N. K. Henderson-MacLennan, E. R. McCabe, D. Di Carlo, *Lab Chip* **2011**, *11*, 912.
- [49] E. Sollier, D. E. Go, J. Che, D. R. Gossett, S. O'Byrne, W. M. Weaver, N. Kummer, M. Rettig, J. Goldman, N. Nickols, S. McCloskey, R. P. Kulkarni, D. Di Carlo, *Lab Chip* **2014**, *14*, 63.
- [50] P. R. Gascoyne, J. Noshari, T. J. Anderson, F. F. Becker, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1388.
- [51] H. S. Moon, K. Kwon, S. I. Kim, H. Han, J. Sohn, S. Lee, H. I. Jung, *Lab Chip* **2011**, *11*, 1118.
- [52] S. B. Huang, M. H. Wu, Y. H. Lin, C. H. Hsieh, C. L. Yang, H. C. Lin, C. P. Tseng, G. B. Lee, *Lab Chip* **2013**, *13*, 1371.
- [53] M. Yu, A. Bardia, B. S. Wittner, S. L. Stott, M. E. Smas, D. T. Ting, S. J. Isakoff, J. C. Ciciliano, M. N. Wells, A. M. Shah, K. F. Concannon, M. C. Donaldson, L. V. Sequist, E. Brachtel, D. Sgroi, J. Baselga, S. Ramaswamy, M. Toner, D. A. Haber, S. Maheswaran, *Science* **2013**, *339*, 580.
- [54] I. Baccelli, A. Schneeweiss, S. Riethdorf, A. Stenzinger, A. Schillert, V. Vogel, C. Klein, M. Saini, T. Bauerle, M. Wallwiener, T. Holland-Letz, T. Hofner, M. Sprick, M. Scharpf, F. Marme, H. P. Sinn, K. Pantel, W. Weichert, A. Trumpp, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 539.
- [55] L. Zhang, L. D. Ridgway, M. D. Wetzel, J. Ngo, W. Yin, D. Kumar, J. C. Goodman, M. D. Groves, D. Marchetti, *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 180ra48.
- [56] M. Yu, A. Bardia, N. Aceto, F. Bersani, M. W. Madden, M. C. Donaldson, R. Desai, H. Zhu, V. Comaills, Z. Zheng, B. S. Wittner, P. Stojanov, E. Brachtel, D. Sgroi, R. Kapur, T. Shioda, D. T. Ting, S. Ramaswamy, G. Getz, A. J. Iafrate, C. Benes, M. Toner, S. Maheswaran, D. A. Haber, *Science* **2014**, *345*, 216.
- [57] L. Qu, J. Xu, X. Tan, Z. Liu, L. Xu, R. Peng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 7309.
- [58] F. Zheng, Y. Cheng, J. Wang, J. Lu, B. Zhang, Y. Zhao, Z. Gu, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 7333.

- [59] J. H. Myung, K. A. Gajjar, J. Saric, D. T. Eddington, S. Hong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11769; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11973.
- [60] W. Sheng, T. Chen, W. Tan, Z. H. Fan, *ACS Nano* **2013**, *7*, 7067.
- [61] 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, M. Toner, *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 179ra47.
- [62] N. M. Karabacak, P. S. Spuhler, F. Fachin, E. J. Lim, V. Pai, E. Ozkumur, J. M. Martel, N. Kojic, K. Smith, P. I. Chen, J. Yang, H. Hwang, B. Morgan, J. Trautwein, T. A. Barber, S. L. Stott, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber, M. Toner, *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 694.
- [63] E. Heitzer, M. Auer, C. Gasch, M. Pichler, P. Ulz, E. M. Hoffmann, S. Lax, J. Waldispuehl-Geigl, O. Mauermann, C. Lackner, G. Höfler, F. Eisner, H. Sill, H. Samonigg, K. Pantel, S. Riethdorf, T. Bauernhofer, J. B. Geigl, M. R. Speicher, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2965.
- [64] J. G. Lohr, V. A. Adalsteinsson, K. Cibulskis, A. D. Choudhury, M. Rosenberg, P. Cruz-Gordillo, J. M. Francis, C. Z. Zhang, A. K. Shalek, R. Satija, J. J. Trombetta, D. Lu, N. Tallapragada, N. Tahirova, S. Kim, B. Blumenstiel, C. Sougnez, A. Lowe, B. Wong, D. Auclair, E. M. VanAllen, M. Nakabayashi, R. T. Lis, G. S. Lee, T. Li, M. S. Chabot, A. Ly, M. E. Taplin, T. E. Clancy, M. Loda, A. Regev, M. Meyerson, W. C. Hahn, P. W. Kantoff, T. R. Golub, G. Getz, J. S. Boehm, J. C. Love, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 479.
- [65] M. Xie, N. N. Lu, S. B. Cheng, X. Y. Wang, M. Wang, S. Guo, C. Y. Wen, J. Hu, D. W. Pang, W. H. Huang, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4618.
- [66] W. Zhao, C. H. Cui, S. Bose, D. Guo, C. Shen, W. P. Wong, K. Halvorsen, O. C. Farokhzad, G. S. Teo, J. A. Phillips, D. M. Dorfman, R. Karnik, J. M. Karp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19626.
- [67] Q. Shen, L. Xu, L. Zhao, D. Wu, Y. Fan, Y. Zhou, W. H. Ouyang, X. Xu, Z. Zhang, M. Song, T. Lee, M. A. Garcia, B. Xiong, S. Hou, H. R. Tseng, X. Fang, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 2368.
- [68] Y. Wan, Y. Liu, P. B. Allen, W. Asghar, M. A. Mahmood, J. Tan, H. Duhon, Y. T. Kim, A. D. Ellington, S. M. Iqbal, *Lab Chip* **2012**, *12*, 4693.
- [69] E. Reátegui, N. Aceto, E. J. Lim, J. P. Sullivan, A. E. Jensen, M. Zeinali, J. M. Martel, A. J. Aranyosi, W. Li, S. Castleberry, A. Bardia, L. V. Sequist, D. A. Haber, S. Maheswaran, P. T. Hammond, M. Toner, S. L. Stott, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 1593.
- [70] S. Hou, H. Zhao, L. Zhao, Q. Shen, K. S. Wei, D. Y. Suh, A. Nakao, M. A. Garcia, M. Song, T. Lee, B. Xiong, S. C. Luo, H. R. Tseng, H. H. Yu, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 1547.
- [71] Z. Ke, M. Lin, J. F. Chen, J. S. Choi, Y. Zhang, A. Fong, A. J. Liang, S. F. Chen, Q. Li, W. Fang, P. Zhang, M. A. Garcia, T. Lee, M. Song, H. A. Lin, H. Zhao, S. C. Luo, S. Hou, H. H. Yu, H. R. Tseng, *ACS Nano* **2015**, *9*, 62.
- [72] H. J. Yoon, T. H. Kim, Z. Zhang, E. Azizi, T. M. Pham, C. Paoletti, J. Lin, N. Ramnath, M. S. Wicha, D. F. Hayes, D. M. Simeone, S. Negrath, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 735.
- [73] C. Y. Wen, L. L. Wu, Z. L. Zhang, Y. L. Liu, S. Z. Wei, J. Hu, M. Tang, E. Z. Sun, Y. P. Gong, J. Yu, D. W. Pang, *ACS Nano* **2014**, *8*, 941.
- [74] W. Sheng, T. Chen, R. Kamath, X. Xiong, W. Tan, Z. H. Fan, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4199.
- [75] J. H. Kang, S. Krause, H. Tobin, A. Mammoto, M. Kanapathipillai, D. E. Ingber, *Lab Chip* **2012**, *12*, 2175.
- [76] P. L. Bedard, A. R. Hansen, M. J. Ratain, L. L. Siu, *Nature* **2013**, *501*, 355.
- [77] C. E. Meacham, S. J. Morrison, *Nature* **2013**, *501*, 328.
- [78] A. Babayan, J. Hannemann, J. Spotter, V. Muller, K. Pantel, S. A. Joosse, *PLoS One* **2013**, *8*, e75038.
- [79] A. Bonnomet, L. Syne, A. Brysse, E. Feyereisen, E. W. Thompson, A. Noel, J. M. Foidart, P. Birembaut, M. Polette, C. Gilles, *Oncogene* **2012**, *31*, 3741.
- [80] B. Polzer, G. Medoro, S. Pasch, F. Fontana, L. Zorzino, A. Pestka, U. Andergassen, F. Meier-Stiegen, Z. T. Czyz, B. Alberter, S. Treitschke, T. Schamberger, M. Sergio, G. Bregola, A. Doffini, S. Gianni, A. Calanca, G. Signorini, C. Bolognesi, A. Hartmann, P. A. Fasching, M. T. Sandri, B. Rack, T. Fehm, G. Giorgini, N. Manaresi, C. A. Klein, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 1371.
- [81] J. F. Chen, H. Ho, J. Lichterman, Y. T. Lu, Y. Zhang, M. A. Garcia, S. F. Chen, A. J. Liang, E. Hodara, H. E. Zhou, S. Hou, R. S. Ahmed, D. J. Luthringer, J. Huang, K. C. Li, L. W. Chung, Z. Ke, H. R. Tseng, E. M. Posadas, *Cancer* **2015**, *118*, 3240–3251.
- [82] I. Y. Wong, S. Javadi, E. A. Wong, S. Perk, D. A. Haber, M. Toner, D. Irimia, *Nat. Mater.* **2014**, *13*, 1063.
- [83] R. M. Mohamadi, J. D. Besant, A. Mephram, B. Green, L. Mahmoudian, T. Gibbs, I. Ivanov, A. Malvea, J. Stojic, A. L. Allan, L. E. Lowes, E. H. Sargent, R. K. Nam, S. O. Kelley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 139; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 141.
- [84] N. Muhanna, A. Mephram, R. M. Mohamadi, H. Chan, T. Khan, M. Akens, J. D. Besant, J. Irish, S. O. Kelley, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, *11*, 1613–1620.
- [85] J. D. Besant, R. M. Mohamadi, P. M. Aldridge, Y. Li, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *Nanoscale* **2015**, *7*, 6278.
- [86] A. H. Kuo, M. F. Clarke, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 504.
- [87] K. Pantel, M. R. Speicher, *Oncogene* **2015**, *34*, DOI: 10.1038/ onc.2015.192.
- [88] A. F. Sarioglu, N. Aceto, N. Kojic, M. C. Donaldson, M. Zeinali, B. Hamza, A. Engstrom, H. Zhu, T. K. Sundaresan, D. T. Miyamoto, X. Luo, A. Bardia, B. S. Wittner, S. Ramaswamy, T. Shioda, D. T. Ting, S. L. Stott, R. Kapur, S. Maheswaran, D. A. Haber, M. Toner, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 685.
- [89] M. G. Krebs, R. L. Metcalf, L. Carter, G. Brady, F. H. Blackhall, C. Dive, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 129.
- [90] J. F. Swennenhuis, J. Reumers, K. Thys, J. Aerssens, L. W. Terstappen, *Genome Med.* **2013**, *5*, 106.
- [91] L. Zhao, Y. T. Lu, F. Li, K. Wu, S. Hou, J. Yu, Q. Shen, D. Wu, M. Song, W. H. Ouyang, Z. Luo, T. Lee, X. Fang, C. Shao, X. Xu, M. A. Garcia, L. W. Chung, M. Rettig, H. R. Tseng, E. M. Posadas, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 2897.
- [92] S. Hou, L. Zhao, Q. Shen, J. Yu, C. Ng, X. Kong, D. Wu, M. Song, X. Shi, X. Xu, W. H. Ouyang, R. He, X. Z. Zhao, T. Lee, F. C. Brunicardi, M. A. Garcia, A. Ribas, R. S. Lo, H. R. Tseng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3379; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 3463.
- [93] U. Dharmasiri, S. K. Njoroge, M. A. Witek, M. G. Adebisi, J. W. Kamande, M. L. Hupert, F. Barany, S. A. Soper, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2301.
- [94] M. Maltez-da Costa, A. de La Escosura-Muniz, C. Nogues, L. Barrios, E. Ibanez, A. Merkoci, *Small* **2012**, *8*, 3605.
- [95] M. Moscovici, A. Bhimji, S. O. Kelley, *Lab Chip* **2013**, *13*, 940.
- [96] Y. Wan, Y. G. Zhou, M. Poudineh, T. S. Safaei, R. M. Mohamadi, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13145; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13361.
- [97] T. S. Safaei, R. M. Mohamadi, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 14165.
- [98] R. M. Mohamadi, I. Ivanov, J. Stojic, R. K. Nam, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6258.
- [99] D. Issadore, J. Chung, H. Shao, M. Liong, A. A. Ghazani, C. M. Castro, R. Weissleder, H. Lee, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 141ra92.
- [100] C. M. Castro, A. A. Ghazani, J. Chung, H. Shao, D. Issadore, T. J. Yoon, R. Weissleder, H. Lee, *Lab Chip* **2014**, *14*, 14.

- [101] T. L. Halo, K. M. McMahon, N. L. Angeloni, Y. Xu, W. Wang, A. B. Chinen, D. Malin, E. Strekalova, V. L. Cryns, C. Cheng, C. A. Mirkin, C. S. Thaxton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 17104.
- [102] Y. Zhang, W. Zhang, L. Qin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2344; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2376.
- [103] Y. Zhang, L. Zhou, L. Qin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15257.
- [104] S. Balasubramanian, D. Kagan, C. M. Hu, S. Campuzano, M. J. Lobo-Castanon, N. Lim, D. Y. Kang, M. Zimmerman, L. Zhang, J. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4161; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4247.
- [105] W. Gao, O. C. Farokhzad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7220; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7358.
- [106] W. He, H. Wang, L. C. Hartmann, J. X. Cheng, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11760.
- [107] E. I. Galanzha, E. V. Shashkov, T. Kelly, J. W. Kim, L. Yang, V. P. Zharov, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 855.
- [108] N. Saucedo-Zeni, S. Mewes, R. Niestroj, L. Gasiorowski, D. Murawa, P. Nowaczyk, T. Tomasi, E. Weber, G. Dworacki, N. G. Morgenthaler, H. Jansen, C. Propping, K. Sterzynska, W. Dyszkiewicz, M. Zabel, M. Kiechle, U. Reuning, M. Schmitt, K. Lucke, *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 1241.
- [109] <http://www.wsj.com/articles/google-designing-nanoparticles-to-patrol-human-body-for-disease-1414515602>.

Eingegangen am 4. Juni 2015

Online veröffentlicht am 8. Dezember 2015

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich