

**Molekulare Studien über zirkulierende Tumorzellen und
zellfreie Nukleinsäuren in präklinischen Modellen und
Patientenproben**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tobias Gorges

aus Niebüll

Berlin, Januar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2008 bis Januar 2012 bei der Firma Bayer in der Abteilung Global Biomarker Research in Berlin unter wissenschaftlicher Leitung von Dr. Oliver von Ahsen (Bayer, Berlin) und PD Dr. Ingeborg Tinhofer-Keilholz (Charité, Berlin) angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ingeborg Tinhofer-Keilholz
Charité, Berlin, Deutschland
Klinik für Strahlentherapie (CCM und CVK)

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland
Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie

Disputation am: 23.04.2012

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass ich keine andere als die angegebene Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich auch auf alle in der Arbeit enthaltenen Zeichnungen, Skizzen, bildlichen Darstellungen und dergleichen.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Berlin, den 13.01.2012

Unterschrift

Danksagung

Bei Dr. Oliver von Ahsen und PD Dr. Ingeborg Tinhofer-Keilholz möchte ich mich für die hervorragende Betreuung, die moralische Unterstützung und die extrem angenehme Arbeitsatmosphäre in den vergangenen Jahren bedanken. Besonders die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich habe wirklich viel von Euch gelernt!

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. Die vielen lustigen Momente im Laboralltag und darüber hinaus werden mir auf jeden Fall gut in Erinnerung bleiben.

Dr. Thomas Krahn und PD Dr. Thomas Zollner danke ich für die Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit bei Bayer anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Tanja Rose und Daniela Förster für die hervorragende Anleitung und Unterstützung bei den *in vivo*-Arbeiten, ohne Euch wäre die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders danken möchte ich auch Dr. Lars Röse, Dr. Marcus Conrad, Dr. Gökhan Yigit, Dr. Stefanie Schoepe und (fast Dr.) Michael Drosch. Eure praktische, theoretische und moralische Unterstützung hatte entscheidenden Anteil an der Entstehung dieser Arbeit. Über die vielen guten Ideen und die ständige Hilfsbereitschaft habe ich viel von Euch lernen können (nicht nur wissenschaftlich).

Der größte Dank gilt meiner Familie und Judith für die liebevolle Unterstützung und die motivierenden Worte während der gesamten Zeit. Auch die „Nervennahrung“ von Oma NMS hat ihren Zweck hervorragend erfüllt.

Lilo und Coco haben mir gezeigt, dass ein Leben ohne sie möglich aber sinnlos ist. Danke dafür.

Eidesstattliche Erklärung	III
Danksagung	IV
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung.....	1
1.2 Metastasierung.....	2
1.3 Zirkulierende Tumorzellen.....	3
1.3.1 Nachweismethoden für zirkulierende Tumorzellen	6
1.3.1.1 Antikörperbasierte Detektionsmethoden für CTCs.....	7
1.3.1.2 Nachweismethoden für CTCs über morphologische Eigenschaften	8
1.3.1.3 PCR-basierte Methoden zum Nachweis der CTCs.....	8
1.3.1.4 Methoden zum Nachweis lebender CTCs.....	9
1.3.1.5 Abreicherung der Leukozytenpopulation (negative Selektion)	10
1.3.2 Nachweis von CTCs im Tiermodell.....	10
1.4 Zellfreie Nukleinsäuren.....	12
1.4.1 Zellfreie, tumorspezifische Nukleinsäuren	14
1.4.2 Zirkulierende Nukleinsäuren im Tiermodell.....	15
1.5 Brustkrebs.....	16
2 Material	18
2.1 Geräte.....	18
2.2 Software.....	19
2.3 Sonstige Materialien.....	19
2.4 Enzyme	20
2.5 Chemikalien und Substanzen.....	20
2.6 Puffer, Medien und Zusätze	20
2.7 Kit-Systeme.....	21
2.8 Antikörper.....	22
2.9 Zelllinien und Kulturmedien	23
Oligonukleotide	24
2.10 Versuchstiere und Haltung.....	24
2.11 Humane Plasmaproben.....	25
3 Methoden	26
3.1 Zellkultur.....	26

3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
3.3	Methoden zur <i>in vitro</i> -Charakterisierung der Brustkrebszellen	26
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.3.2	Westernblot	27
3.3.3	Expressionsanalyse von Oberflächenproteinen am Durchflusszytometer (FACS)	27
3.3.4	Expressionsstudien von Proteinen am Fluoreszenzmikroskop	28
3.4	Tierversuche	28
3.4.1	<i>In vivo</i> -Injektionsmodelle	28
3.4.2	Blutentnahme	29
3.4.3	Behandlungsversuch	29
3.5	Isolierung von genomischer DNA aus Blut- und Plasmaproben	30
3.6	RNA-Aufreinigung aus Gewebestücken	30
3.7	Quantitative und qualitative Bestimmungen isolierter DNA / RNA	30
3.8	cDNA-Synthese	31
3.8.1	AdnaTest	31
3.8.2	Übrige Proben (Blut- und Gewebelysate)	31
3.9	Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Markerexpression	31
3.10	Quantitative Real-Time-PCR	32
3.11	Biomarkernachweismethoden	33
3.11.1	Nachweismethoden von zirkulierenden Tumorzellen	33
3.11.1.1	AdnaTest	33
3.11.1.2	CellSearch®	34
3.11.1.3	Qualitative CTC-Detektion ohne Antikörperanreicherung (PCR) ...	35
3.11.1.3.1	Nachweis von epithelial-mesenchymalen Veränderungen auf CTCs	35
3.11.1.4	CTC-Detektion über den Zytospin	36
3.11.1.5	CTC-Nachweis mittels EPISPOT (<i>Epithelial ImmunoSPOT</i>)	36
3.11.1.6	CTC-Detektion über einen Nanodetektor (GILUPI GmbH)	37
3.11.1.7	Quantitative Bestimmung der CTCs über die Amplifikation humaner <i>Alu</i> -Sequenzen (qRT-PCR)	38
3.11.2	Nachweis von zellfreien Nukleinsäuren	39
3.12	Histologische Färbung proliferierender Zellen auf Tumorschnittpräparaten	39

3.13	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis humaner Zentromere auf Tumorschnittpräparaten	40
------	--	----

4 Ergebnisse..... 41

4.1	Zirkulierende Tumorzellen.....	41
4.1.1	Humane Tumorzellen lassen sich mit dem AdnaTest in Abhängigkeit der EpCAM-Expression nachweisen.....	41
4.1.2	Mit der CellSearch-Methode lassen sich <i>ex vivo</i> 350 von 500 Zellen (70 %) wiederfinden.....	44
4.1.3	Humane Tumorzellen lassen sich auch ohne Antikörperanreicherung sensitiv im Blut der Mäuse nachweisen	45
4.1.4	Der Nachweis von vitalen Tumorzellen ist mit dem EPISPOT möglich..	46
4.1.5	Der Nanodetektor zeigt im Fließsystem eine geringe Sensitivität.....	47
4.1.6	Der Nachweis von Tumorzellen über den Zytospin weist einen hohen Zellverlust auf	49
4.1.7	Über die quantitative Bestimmung humaner <i>Alu</i> -Sequenzen gehen Tumorzellen auf Einzelzellebene verloren.....	50
4.2	Nachweisstudien von CTCs in murinen Xenografts (<i>in vivo</i>).....	52
4.2.1	CTCs lassen sich über epitheliale Marker <i>in vivo</i> nicht anreichern	52
4.2.2	CTCs zeigen den Verlust von <i>EpCAM</i> , <i>MUC-1</i> und <i>Her2</i>	56
4.2.3	Der qualitative CTC-Nachweis kann einen Therapieerfolg nicht aufzeigen	62
4.3	<i>In vivo</i> -Studien zum quantitativen Nachweis der CTCs.....	65
4.3.1	Die quantitative Amplifikation humaner <i>Alu</i> -Sequenzen kann zum Nachweis von CTCs genutzt werden.....	65
4.3.2	Der Nachweis von vitalen Tumorzellen kann unter Verwendung des EPISPOTs im Tiermodell verfolgt werden.....	68
4.4	Nachweis von humaner-DNA in murinen Plasmaproben (<i>ex vivo</i>).....	70
4.4.1	Im Tiermodell kann humane-DNA spezifisch vor dem murinen Hintergrund detektiert werden.....	70
4.5	Humane Tumor-DNA in Plasmaproben xenotransplantierter Mäuse	71
4.5.1	Die Mengen an zellfreien, tumorspezifischen Nukleinsäuren korreliert im Tiermodell mit der Tumorgroße	71
4.5.2	Der ctDNA-Nachweis bildet die Pharmakodynamik im Therapiemodell ab	72

4.6	Quantitativer Nachweis von zellfreier DNA im Plasma von Humanproben..	73
4.6.1	Die Konzentration an zellfreier DNA ist in Plasmaproben von Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erhöht	73
5	Diskussion	77
5.1	Zirkulierende Tumorzellen.....	77
5.2	Zirkulierende, zellfreie Nukleinsäuren	84
6	Zusammenfassung.....	90
6.1	Deutsche Version.....	90
6.2	Englische Version	91
7	Literaturverzeichnis	92
	Abkürzungen, Fremdwörter und Symbole	110

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache (Wagener und Müller, 2010), wobei epidemiologische Daten darauf hindeuten, dass Krebserkrankungen in naher Zukunft kardiovaskuläre Leiden als häufigste Todesursache sogar ablösen werden (Klein, 2000). Im Jahr 2004 wurden allein in Deutschland 436.500 Neuerkrankungen an Krebs dokumentiert und 206.000 krebsbedingte Todesfälle registriert (Robert Koch Institut, 2008). Maligne (bösartige) Tumore epithelialer Gewebe (Karzinome) stellen im klinischen Bereich die Mehrzahl aller Krebserkrankungen dar und verursachen einen Großteil der krebsbedingten Todesfälle (Gerges *et al.*, 2010; Pantel *et al.*, 1997; Pantel und Otte, 2001). Die medizinische Fachrichtung, die sich der molekularen Analyse aller Krebserkrankungen widmet, bezeichnet man als Onkologie. Die Bemühungen in der Onkologie richten sich zum einen gegen Maßnahmen, die den Entstehungsprozess der Tumorbildung wirkungsvoll verhindern sollen (Krebsprävention). Bei der Krebsprävention werden Risikofaktoren wie z.B. der Alkoholkonsum oder auch das Ernährungsverhalten der Menschen einbezogen, um die Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung zu reduzieren. Die klinische Relevanz der präventiven Maßnahmen lässt sich epidemiologisch allerdings schwer belegen, wobei der regelmäßige Tabakkonsum als bedeutungsvolle Ursache für das Auftreten von Bronchialkarzinomen klar identifiziert werden konnte (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2011). Zum anderen richtet sich der onkologische Fachbereich nach einer erfolgten Krebsdiagnose auf die frühzeitige Reduzierung der Tumormasse (kurative Therapie). Zu den kurativen Behandlungsformen gehören chirurgische Eingriffe, Chemo- oder Bestrahlungstherapien sowie neuerdings auch der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch den Tumor angreifen sollen. Eine zeitnahe Entfernung bzw. Verkleinerung des Tumors ist für den Verlauf der Krebserkrankung essentiell, da die Mehrzahl der Tumorpatienten nicht am Primärtumor, sondern an den Spätfolgen der Tumorstreuung (Metastasierung) verstirbt (Cunnick *et al.*, 2002). Aufgrund der Letalität im fortgeschrittenen Krankheitsstadium richtet sich ein weiterer Aspekt der molekularen Onkologie darauf, die Ausbreitung der Tumorzellen im Körper des Patienten gezielt zu unterbinden.

Für nahezu jede Tumorerkrankung gilt, dass Frühstadien mit größerem Erfolg behandelt werden können als fortgeschrittene Tumorstadien (Schmoll *et al.*, 2006), weshalb der Prozess der Metastasierung rechtzeitig und spezifisch eingedämmt werden muss, um bestmögliche Überlebenschancen für den Krebspatienten zu gewährleisten.

1.2 Metastasierung

Karzinome, die aus ursprünglich gesunden Zellen im Epithelverband entstehen, stammen in der Regel von einer einzelnen entarteten (mutierten) Zelle ab und sind somit klonalen Ursprungs (Fearon *et al.*, 1987). Solange ein Primärtumor die Strukturbarrieren des umliegenden Bindegewebes nicht durchdrungen hat und keinen Anschluss an Blut- oder Lymphgefäße aufweist, spricht man von einem *Carcinoma-in-situ* (CIS). Im Verlauf der malignen Progression sind manche Krebszellen jedoch dazu in der Lage, die Gewebsbarrieren zu überwinden (Invasion). Weiterhin induziert der Tumor während des Wachstums die Ausbildung neuer Blutgefäße, die für eine wirkungsvolle Nähr- und Sauerstoffversorgung des entarteten Gewebes sorgen (Tumorangiogenese).

Die Krebszellen, die sich bereits vom Primärtumor gelöst haben, können nachfolgend in umliegende Lymph- oder Blutgefäße eindringen und werden als zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) bezeichnet (Hoon *et al.*, 2011). CTCs besiedeln im frühen Stadium der Metastasierungskaskade häufig zunächst die regionären Lymphknoten (*sentinel lymph nodes*, Wächterlymphknoten) oder das Knochenmark (*bone marrow*, BM), wobei Zellen, die ins Knochenmark eingedrungen sind, als disseminierte Tumorzellen (DTCs) bezeichnet werden (Fidler, 2003). Die klinische Relevanz von Lymphknotenmetastasen oder DTCs im Knochenmark ist als unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose weitgehend anerkannt (Schmoll *et al.*, 2006; Effenberger *et al.*, 2011). Neben dem Befall von lokalen Lymphknoten oder dem Knochenmark können Tumorzellen in späteren Stadien entweder über den *Ductus thoracicus* (rechten Lymphgang) oder den direkten Zugang der Blutgefäße des Primärtumors in die Blutbahn gelangen und eine systemische Zellstreuung verursachen, was die Ausbildung von Fernmetastasen zur Folge hat (Valastyan und Weinberg, 2011).

Aufbauend auf den invasiven Eigenschaften der CTCs können diese Zelltypen möglicherweise dazu benutzt werden, um tiefere Einblicke in molekulare und

biologische Prozesse der Metastasierungskaskade zu erlangen, wodurch neue Therapiestrategien entwickelt werden können, die eine Verbreitung der Tumorzellen im Körper der Krebspatienten effektiv unterdrückt.

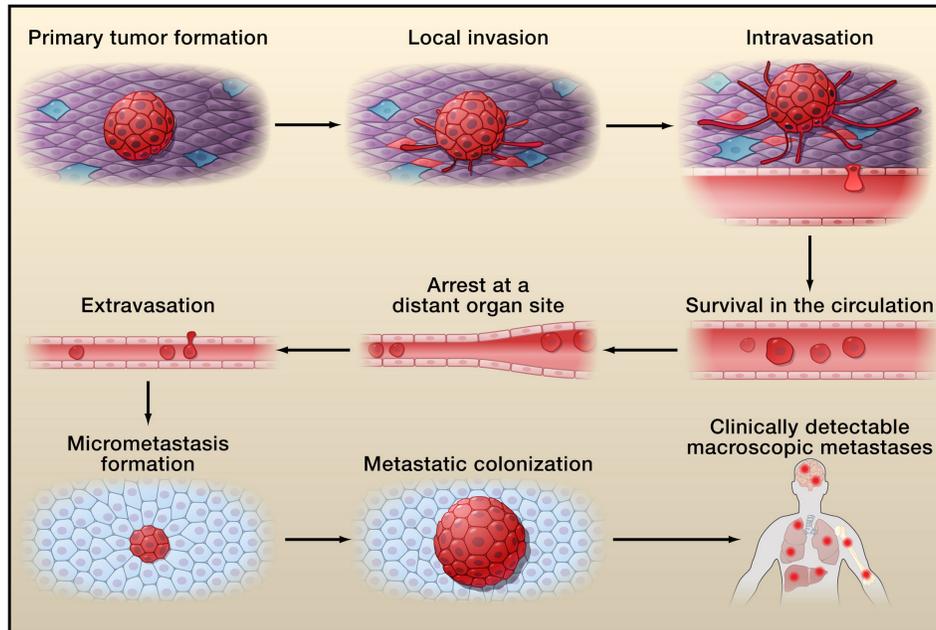


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade. Nach klonaler Expansion einer entarteten Zelle wandern im Verlauf des Tumorwachstums Krebszellen ins umliegende Gewebe ein (Lokale Invasion), wobei der Tumor gleichzeitig aufgrund des hohen Nähr- und Sauerstoffbedarfs die Bildung neuer Blutgefäße induziert. Im Verlauf der Tumorprogression durchbrechen weitere Tumorzellen die Gewebsbarrieren, wodurch diese aus dem Primärtumor über die Lymph- oder Blutgefäße auswandern und in umliegenden Organen oder dem Knochenmark der erkrankten Personen Metastasen ausbilden können (Abbildung übernommen aus der Veröffentlichung von Valastyan und Weinberg aus dem Jahr 2011).

1.3 Zirkulierende Tumorzellen

In der Literatur werden CTCs zum ersten Mal 1869 von Ashworth erwähnt (Ashworth, 1869), wobei molekulare Analysen der Zellen aufgrund des technischen Fortschritts erst innerhalb der letzten Jahrzehnte möglich wurden. Allerdings beschrieb Fidler bereits im Jahr 1973, dass nur ein Bruchteil von etwa 0,01 % der CTCs in der Lage ist Metastasen im Körper der Patienten auszubilden (Fidler, 1973). Obwohl demnach lediglich geringe Zellzahlen ein aktives, invasives Wachstum aufweisen, kann die Existenz von Tumorzellen im Blutkreislauf als notwendige Bedingung für die Entstehung klinisch manifester Metastasen angesehen werden (Brandt *et al.*, 2000).

Adhärent wachsende Zellen, die den Substratkontakt verlieren, induzieren in der Regel den programmierten Zelltod (Apoptose). Epitheliale Tumorzellen, die sich aus dem Zellverband lösen und Metastasen ausbilden, müssen diesen Prozess umgehen und zum eigenen Schutz Mechanismen entwickeln, die es ihnen ermöglichen in der Zirkulation zu überleben. Ein weiterer kritischer Schritt neben dem Überleben ist das Anwachsen der Zelle in einer fremden Umgebung (Wagener und Müller, 2010). Tumorzellen, die in entfernte Gewebsstrukturen eindringen verweilen oft in geeigneten Nischen, in denen sie Überleben und Proliferieren können. Einzelne Tumorzellen, die den biologischen Charakter einer Stammzelle aufweisen, können im Gewebe zudem über einen langen Zeitraum bestehen (Jotsuka *et al.*, 2004), ohne vom eigenen Körperabwehrsystem zerstört zu werden oder weitere Metastasen auszubilden (Mikrodisseminierung). Der Einsatz von Zytostatika (Chemotherapie) oder Bestrahlungstherapien zeigt keine effektive Wirkung gegen diesen Zelltyp, da Therapieformen dieser Art lediglich proliferierende Zellen im Körper der Patienten angreifen. Aufgrund der langen Überlebenszeit und der geringen Dynamik sind diese Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften für die genauere Darstellung des Krankheitsverlaufs zudem nicht hilfreich (Braun *et al.*, 2000).

Für Tumorzellen, die sich im Blutssystem befinden konnte hingegen gezeigt werden, dass ein Großteil der CTCs bereits nach 24 Stunden wieder verschwindet (Fidler, 1970; Patel *et al.*, 2002). Weiterhin wird vermutet, dass ein permanenter Zufluss von CTCs aus dem Tumor erfolgt. Daher erscheint der zufällige Nachweis dieser Zellen im Blutssystem recht unwahrscheinlich. Ausgehend von dieser Hypothese ist der CTC-Nachweis für die Darstellung des Krankheitsverlaufs von besonderer Bedeutung, da das Blut den dynamischen Prozess der Tumorprogression somit relevant widerspiegeln kann, wodurch die Beurteilung von Therapieerfolgen und ein frühzeitiger Nachweis der Tumorneubildung über einen nicht-invasiven Eingriff verfolgt werden kann.

Der quantitative Nachweis von CTCs als pharmakodynamischer und prognostischer Biomarker wurde in der neoadjuvanten (präoperativ) und in der adjuvanten (postoperativ) Situation bereits mehrfach beschrieben (Xenidis *et al.*, 2009; Pachmann *et al.*, 2008; Kurihara *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010). So konnte z.B. die Arbeitsgruppe um Katharina Pachmann im Jahr 2005 in der präoperativen Situation einen Therapieerfolg über die Reduzierung der Tumormasse und die sinkende Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen

beobachten, was die klinische Bedeutung der CTCs als pharmakodynamische Marker belegt (Pachmann *et al.*, 2005). In der adjuvanten Situation lässt sich ein zeitnahes Ansprechen der Therapie über bildgebende Verfahren, wie der Ultraschalldiagnostik (Sonographie), der Magnetresonanztomographie (MRT), der Computertomographie (CT) oder der Positronenemissionstomographie (PET) nur schlecht darstellen, da diese Methoden die Entstehung von Rezidiven erst nach Monaten oder Jahren abbilden können (Abramson und Mayer, 2011). Aufgrund der Tatsache, dass Tumorzellen im Blut den dynamischen Prozess der Progression aufzeigen können, können diese Zelltypen ebenfalls in der postoperativen Situation dazu genutzt werden klinische Therapieerfolge zeitnah abzubilden (Lobodasch *et al.*, 2007).

Neben einem pharmakodynamischen Wert konnte den CTCs in Ergänzung eine prognostische Relevanz zugeschrieben werden. Tewes *et al.* dokumentierten, dass über die Persistenz oder das Verschwinden von CTCs der Erfolg einer adjuvanten Therapie aufgezeichnet werden konnte, wobei ein konsistenter Nachweis der Zellen mit einer signifikant verkürzten Überlebenszeit in Verbindung gebracht wurde (Tewes *et al.*, 2009). Ferner wurde ein Schwellenwert von 5 bzw. 3 Zellen pro 7,5 ml Blut vor Beginn einer Behandlung als unabhängiger prognostischer Faktor hinsichtlich der Länge der krankheitsfreien und der gesamten Überlebenszeit metastasierter Brust-, Prostata- und Kolorektalkarzinompatienten deklariert (Christofanilli *et al.*, 2004; De Bono *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009). Möglicherweise können CTCs neben ihrer Funktion als „Response-“ oder „Prognosemarker“ in naher Zukunft auch als prädiktive Biomarker im klinischen Alltag fungieren, wodurch eine zielgerichtete, personalisierte Therapie der Krebspatienten denkbar wird. Bei der personalisierten Medizin wird der individuelle Krankheitszustand eines Patienten in der Regel über die Entnahme von Gewebeproben genau charakterisiert und eine Behandlung exakt auf diesen Zustand eingestellt (Jackson und Sood, 2011). CTCs könnten als „flüssige Biopsie“ (*liquid biopsy*) ein detailliertes, genetisches Profil des Tumors widerspiegeln und somit das Ansprechen einer Therapie über die Analyse des Markerprofils spezifisch vorhersagen (van de Stolpe *et al.*, 2011). Der nicht-invasive Eingriff über die Blutbahn, der zur Gewinnung der CTCs angewendet wird, beinhaltet den Vorteil, dass das Markerprofil der Krebserkrankung auch bei Patienten mit „nicht-biopsierbaren Tumoren“ charakterisiert werden kann.

1.3.1 Nachweismethoden für zirkulierende Tumorzellen

CTCs werden geläufig als nukleierte Zellen definiert, die über die Expression epithelialer Marker, wie EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) oder Zytokeratine (CK-8,-18 und -19) im Blut der Krebspatienten detektiert werden. Weiterhin erfolgt in der Regel ein Ausschluss der Leukozytenpopulation über eine Markierung der CD45-Expression (Kagan *et al.*, 2002 a. und 2002 b.). Abbildung 1.2 ist eine Übersicht der verschiedenen Strategien zum Nachweis der CTCs zu entnehmen, die im Folgenden detaillierter erläutert wird.

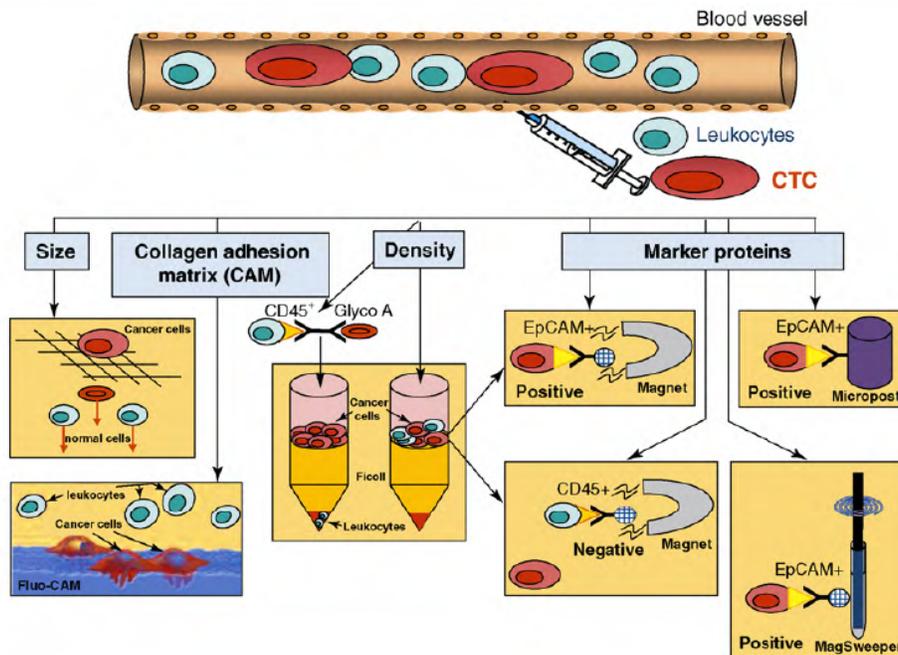


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht von geläufigen CTC-Detektionsmethoden. CTCs lassen sich aus Blutproben von Tumorpatienten z.B. über morphologische Eigenschaften, wie der Zellgröße oder der spezifischen Dichte anreichern (ISET, Oncoquick). Zudem können antikörperbasierte Methoden über epitheliale oder blutzellspezifische Marker Zellen aus Blutproben an- bzw. abreichern (AdnaTest, CellSearch, MACS). Selektierte Zellen lassen sich nachfolgend über eine PCR molekularbiologisch charakterisieren. Invasive Zellen können über eine kollagenhaltige Matrix, in die die Tumorzellen aktiv wandern, gewonnen (Vita Assay) und nachfolgend analysiert werden. Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Pantel und Alix-Panabieres aus dem Jahr 2010 übernommen (Pantel und Alix-Panabieres, 2010).

1.3.1.1 Antikörperbasierte Detektionsmethoden für CTCs

In klinischen Studien werden vielfach antikörperbasierte Techniken für die Anreicherung der CTCs aus Patientenproben genutzt, wobei die Zellen in der Regel über die EpCAM-Expression selektiert werden (Pantel und Alix-Panabieres, 2010). EpCAM ist ein membranständiges Glykoprotein, das bei einer Vielzahl der Karzinome überexprimiert wird (van der Gun *et al.*, 2010). Detektionsmethoden für CTCs, wie der AdnaTest, die CellSearch-Methode oder der Nanodetektor der Firma GILUPI basieren auf dem Prinzip der „epithelialen Selektion“. CTCs, die über diese Verfahren selektiert wurden besitzen neben einem pharmakodynamischen Wert auch eine prognostische Relevanz (Tewes *et al.*, 2008; Christofanilli *et al.*, 2004; De Bono *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009; Kurihara *et al.*, 2008). So konnte z.B. über die CellSearch-Methode ein Grenzwert von 5 Zellen identifiziert werden, um eine Gruppe mit guter von einer Gruppe mit ungünstiger Prognose zu unterscheiden. Krebspatienten mit mehr als 5 CTCs hatten, im Gegensatz zu solchen mit weniger als 5 Zellen, eine signifikant verkürzte, progressionsfreie Überlebenszeit (Christofanilli *et al.*, 2004). Entsprechende Resultate konnten über dieses Verfahren auch für Krebspatienten mit metastasiertem Prostata- und Kolorektalkarzinom beobachtet werden, wobei der Grenzwert für eine ungünstige Prognose beim Kolorektalkarzinom bei 3 Zellen / 7,5 ml Blut lag (De Bono *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009). Neben diesen Verfahren kann eine Tumorzellselektion über das EpCAM-Protein ebenfalls unter Verwendung des CTC-Chips erfolgen. Nagrath *et al.* waren über diese Mikrofluidik-Technologie in der Lage CTCs in Blutproben von metastasierten Lungen-, Prostata-, Pankreas-, Brust- und Kolonkrebepatienten mit einer Reinheit von 50 % nachzuweisen. Weiterhin konnte in dieser Studie über die CTC-Zahl ein Therapieerfolg dokumentiert werden (Nagrath *et al.*, 2007). Allerdings ist die klinische Relevanz der CTCs, die über den CTC-Chip selektiert wurden aufgrund der kleinen Patienten- und Studienzahl bisher nicht eindeutig belegt. Obwohl manche der antikörperbasierten Nachweisverfahren bereits kommerziell erhältlich sind, ist bis heute lediglich die CellSearch-Methode das einzige von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene System zum Erfassen der CTCs im klinischen Alltag.

1.3.1.2 Nachweismethoden für CTCs über morphologische Eigenschaften

Neben der Anreicherung über epitheliale Marker werden in der derzeitigen Literatur weitere Techniken zum Nachweis der CTCs diskutiert, da der Ansatz der „epithelialen Selektion“ die Tatsache vernachlässigt, dass manche Tumorzellen im Verlauf der Migration ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und mesenchymale Zelltypen bzw. Zellhybridformen ausbilden können (Armstrong *et al.* 2011; Kallergi *et al.* 2011; Lecharpentier *et al.*, 2011). So lassen sich Tumorzellen auch über ihre morphologischen Eigenschaften aus den Blutproben der Krebspatienten nachweisen, wobei CTCs z.B. über die spezifische Dichte (Oncoquick) oder die Zellgröße (ISET) angereichert werden können (Lagoudianakis *et al.*, 2009; Vona *et al.*, 2000). Allerdings ist der Nachweis von CTCs im Blut von Krebspatienten über das Oncoquick-Verfahren im Vergleich zur CellSearch-Methode jedoch deutlich weniger sensitiv (23 % vs. 54 %) (Balic *et al.*, 2005). Die prognostische Relevanz von CTCs, die über die Größe angereichert wurden, konnte bereits in der klinischen Studie von Vona *et al.* dokumentiert werden, wobei das Auftreten von mehr als 4 CTCs / 6 ml Blut mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert war (Vona *et al.*, 2004).

Obwohl der Ansatz der morphologischen Selektion eine vielversprechende Lösung für den Nachweis der Tumorzellen bietet, müssen die Verfahren der Dichten- bzw. Größenanreicherung zukünftig weiter optimiert werden, um die geringe Sensitivität bzw. die geringe Spezifität zu umgehen. Weiterhin müssen größere Studien die Relevanz dieser Verfahren eingehender darstellen, um die Funktionalität der Methoden für den klinischen Alltag zu gewährleisten (Sun *et al.*, 2011).

1.3.1.3 PCR-basierte Methoden zum Nachweis der CTCs

Neben den antikörperbasierten Verfahren oder der morphologischen Selektion kann ein Nachweis von CTCs ebenfalls über PCR-basierte (*polymerase chain reaction*) Techniken erfolgen. Ein Vorteil bei diesen Verfahren ist, dass sich die CTCs über die Amplifikation humaner Gentranskripte molekularbiologisch charakterisieren lassen (Fabisiewicz *et al.*, 2004). Über die molekularbiologische Analyse kann neben dem Mutationsstatus auch der Einblick in aktivierte Signalwege der Zellen gewonnen werden, was die CTCs, im Vergleich zur freien Plasma-RNA bzw. -DNA, als prädiktive Biomarker in der klinischen Situation unentbehrlich macht. Die molekulare Analyse der aktivierten Signalwege kann entscheidende Informationen für die richtige Wahl der Therapie liefern, wodurch möglicherweise eine effektive Verbreitung der

Tumorzellen im Körper der Patienten verhindert werden kann. Aufgrund der extrem hohen Sensitivität der PCR können Kontaminationen der Proben jedoch leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Lambrechts *et al.*, 1999). Quantitative Bestimmungen über die qRT-PCR (*quantitative real time-PCR*) können dieses Problem jedoch umgehen. Die geringen Kosten und die einfache Reproduzierbarkeit der Methode ermöglicht den Nachweis von CTCs in nahe zu jedem Labor.

Für die personalisierte Medizin ist das Markerprofil von lebenden invasiven Zellen für eine Therapieentscheidung essentiell. Ein Nachteil der PCR-Strategie ist, dass sich über die Amplifikation auch CTC-spezifische Gentranskripte vervielfältigen lassen die von Zellfragmenten stammen und sich neben den Tumorzellen im Blut der Patienten ansammeln (Sun *et al.*, 2011). Aufgrund dieser Tatsache müssen Nachweisverfahren etabliert werden, die spezifisch vitale Tumorzellen im Blut der Krebspatienten detektieren können.

1.3.1.4 Methoden zum Nachweis lebender CTCs

Lebende Tumorzellen im Blut der Patienten lassen sich z.B. über den EPISPOT (*EPithelial ImmunoSPOT*), anhand der CK19-Sezernierung (*Cytokeratin-19*) nachweisen, wobei die klinische Relevanz dieser Methode bisher nicht eindeutig belegt werden konnte (Alix-Panabieres *et al.*, 2009). Weiterhin ist der EPISPOT zur Zeit kommerziell nicht erhältlich, was die Etablierung der Methode im Laboralltag nicht ermöglicht. Im Gegensatz dazu konnte über den Vita Assay die klinische Bedeutung vitaler Tumorzellen bereits gezeigt werden (Fan *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010). Bei dieser Methode werden invasive Krebszellen über die Adhäsion an eine Zelladhäsionsmatrix selektiert und können nachfolgend angefärbt, kultiviert oder molekularbiologisch charakterisiert werden. Lu *et al.* haben über dieses Verfahren in 52 % (28 von 54) der Brustkrebspatientinnen (Stadium I - III) CTCs nachweisen können und waren zudem in der Lage, eine Korrelationen zwischen der CTC-Zahl und dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus, einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben zu zeigen.

Trotz erster Erfolge befinden sich die beschriebenen Techniken zum Nachweis vitaler CTCs noch in der Entwicklungsphase. Neben einer langen Aufbereitungszeit der Blutproben, die über den EPISPOT oder den Vita Assay analysiert werden sollen, fehlt zumindest für den EPISPOT der Beweis einer klinischen Relevanz in größeren Studien. Ferner fehlt bisher eine unabhängige Bestätigung der Funktionalität des Vita

Assays, da positive Befunde bislang lediglich in der medizinischen Abteilungen der Stony Brook Universität in New York (USA) beschrieben wurden (Fan *et al.*, 2008; Paris *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). Ergänzende Untersuchungen und die Kommerzialisierung der Methoden könnten möglicherweise einen bedeutungsvollen Beitrag zur personalisierten Medizin leisten, da die molekulare Analyse aktivierter Signalwege von vitalen bzw. invasiven CTCs wichtige Indizien für die Wahl der Therapie liefern kann.

1.3.1.5 Abreicherung der Leukozytenpopulation (negative Selektion)

Neben der positiven Selektion können CTCs auch nach einer Abreicherung der CD45-positiven Zellen (Leukozyten) nachgewiesen werden (negative Selektion) (Pantel und Alix-Panabieres, 2010). Allerdings führen die hohen Kosten der Antikörper, die für die Abreicherung benötigt werden und die geringe Sensitivität bzw. Spezifität dazu, dass die Anforderungen einer geeigneten, zuverlässigen Nachweismethode für alle CTCs ebenfalls nicht zu 100 % erfüllt werden.

Obwohl verschiedene Verfahren zum Nachweis der CTCs im klinischen Alltag bereits angewendet oder getestet werden, konnte bisher kein klinischer Standard etabliert werden, der zuverlässig und spezifisch alle CTC-Populationen im Blut der Patienten detektiert. Demzufolge müssen erstens bestehende Verfahren verbessert und zweitens neue Strategien entwickelt werden, um alle Tumorzellen im Blut verlässlich nachweisen zu können.

1.3.2 Nachweis von CTCs im Tiermodell

Aufgrund der Tatsache, dass CTCs in der humanen Situation eine klinische Bedeutung als pharmakodynamische Biomarker aufgezeigt haben kann die Anwendung von Tiermodellen die Möglichkeit bieten neue Therapieverfahren oder Medikamente präklinisch zu validieren. Die Resultate, die in präklinischen Studien gewonnen werden, können demnach kostengünstige und schnelle Informationen liefern, die für die medizinische Substanzvalidierung essentiell sind. Daher wurde die Bedeutung der CTCs als pharmakodynamische Marker im Tiermodell untersucht. Trotz einer Vielzahl an klinisch erprobten Detektionsmethoden für zirkulierende Tumorzellen konnte bisher kein „Goldstandard“ etabliert werden, der zuverlässig alle CTC-Populationen sensitiv und spezifisch selektiert. Daher sollten im Rahmen der

vorliegenden Arbeit zusätzlich verschiedene Nachweismethoden für CTCs im Tiermodell getestet werden, um die Funktionalität der verschiedenen Ansätze untereinander vergleichen zu können. Der Gebrauch von Tiermodellen bietet ferner die Möglichkeit phänotypische Veränderungen der zirkulierenden Tumorzellen eingehender untersuchen zu können, da dies in der klinischen Situation nur schwer zu verfolgen ist. Humanisierte Tiermodelle können somit zum besseren wissenschaftlichen Verständnis der molekularen Prozesse, die sich im Rahmen der Metastasierungskaskade abspielen, beitragen.

Ein Therapieerfolg im Tiermodell konnte bereits von Barok und Kollegen beobachtet werden, was auf die Möglichkeit der Nutzung von CTCs als pharmakodynamische Biomarker für neu entwickelte Therapieformen hinweist (Barok *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte der Nachweis von CTCs in humanisierten Mausmodellen ebenfalls bereits beschrieben werden. Im Jahr 2008 waren Eliane *et al.* in der Lage, erfolgreich Tumorzellen aus Blutproben xenotransplanteder Nacktmäuse in einem Brustkrebsmodell (MDA-MB-231) unter Verwendung der CellSearch-Methode zu isolieren (Eliane *et al.*, 2008). Neben Eliane und Kollegen konnten CTCs im gleichen Modell auch von Ameri *et al.* detektiert werden, wobei Xenografts, die aus selektierten Tumorzellen generiert wurden, einen deutlich aggressiveren Phänotyp aufwiesen. Die Tumore dieser Versuchstiere zeigten neben einem schnelleren Wachstum auch eine intensivere Streuungsrate, was die Relevanz der CTCs im Prozess der Metastasierung unterstreicht (Ameri *et al.*, 2010). Weiterhin konnten in einem Prostatamodell CTCs nach einer zweiten Runde der *in vivo*-Passagierung im Blut der Tiere nachgewiesen werden (He *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnte die Induzierung des *ABCB5*-Gens (*ATP-binding cassette sub-family B member-5*) auf CTCs in einem humanisierten Hautkrebsmodell gezeigt werden (Ma *et al.*, 2010), was auf phänotypische Veränderungen der CTCs in präklinischen Modellen hindeutet.

Ausgehend von den gegenwärtigen wissenschaftlichen Einsichten sollten im Hauptteil der vorliegenden Arbeit metastasierende Xenograftmodelle etabliert werden, um erstens die Nutzung von CTCs als pharmakodynamische Biomarker zu testen, zweitens die Vergleichbarkeit verschiedener Nachweismethoden für CTCs *in vivo* zu untersuchen und drittens phänotypische Veränderungen der CTCs zu

charakterisieren, wodurch sich der molekulare Prozess der Metastasierungskaskade weiter aufschlüsseln lässt.

1.4 Zellfreie Nukleinsäuren

Neben den CTCs können möglicherweise zellfreie Nukleinsäuren, aus Plasma-, Serum-, Urin- oder Stuhlproben, eine weitere klinisch relevante Biomarkerfunktion im Bereich der Onkologie übernehmen und physiologische bzw. pathologische Informationen über die Biologie des Tumors liefern. Obwohl sich über den Nachweis der freien Nukleinsäuren keine biochemischen Aktivitäten der Signalwege abbilden lassen, bietet die Untersuchung der zellfreien DNA (*deoxyribonucleic acid*) die Möglichkeit erstens den Verlauf der Tumorprogression molekularbiologisch aufzuzeigen und zweitens den Mutationsstatus des Tumors zu erfassen, wodurch sich individuelle Therapiestrategien spezifisch vorhersagen lassen.

Der Nachweis von zellfreier DNA (*cell-free*, cfDNA) in humanen Blutproben wurde in der Literatur zum ersten Mal im Jahr 1948 von Mandel und Metais beschrieben (Mandel und Metais, 1948), wobei erst 29 Jahre später signifikant erhöhte Konzentrationen im Serum von metastasierten Tumorpatienten gemessen werden konnten (Leon *et al.*, 1977). Obwohl bei Tumorpatienten erhöhte Mengen an freien Nukleinsäuren nachweisbar sind, ist der genaue Mechanismus zur Freisetzung der zirkulierenden DNA noch nicht eindeutig geklärt (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Bis heute werden verschiedene Mechanismen, die zur Freisetzung der Nukleinsäuren führen in Erwägung gezogen. Es wird vermutet, dass die DNA-Sequenzen einerseits aktiv von Tumorzellen freigesetzt werden oder andererseits passiv durch nekrotische und apoptotische Zellen in den Umlauf gelangen können (Stroun *et al.*, 2001; Jahr *et al.*, 2001; Gahan *et al.*, 2008; Schwarzenbach *et al.*, 2011). Eine schematische Übersicht der möglichen Entstehungsprozesse an zellfreien Nukleinsäuren ist der Abbildung 1.3 zu entnehmen.

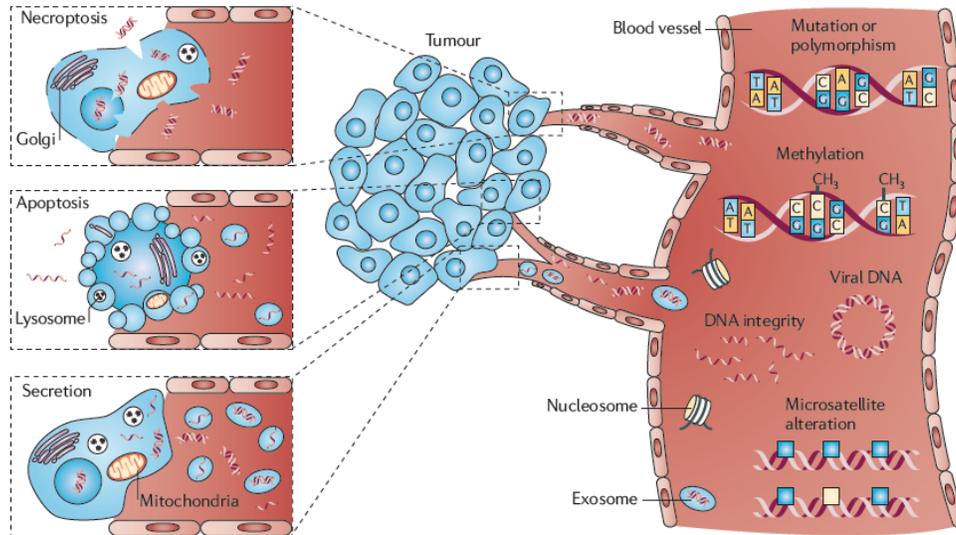


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der zellfreien Nucleinsäuren im Blut. Über den Nachweis der zellfreien DNA lassen sich Mutationsanalysen, Methylierungen oder Mikrosatelliten-Alterationen untersuchen, wobei die zirkulierende (Tumor-)DNA entweder passiv über nekrotische und apoptotische Prozesse oder aktiv ins Blut gelangt (Abbildung wurde übernommen aus der Veröffentlichung von Schwarzenbach *et al.* aus dem Jahr 2011).

Neben den bereits beschriebenen Herkunftsprozessen der freien Nucleinsäuren wird ferner vermutet, dass Tumorkranke aufgrund von entzündlichen Prozessen, die als Folge der Tumorentwicklung auftreten können, erhöhte cfDNA-Werte aufweisen (Fleischhacker und Schmidt, 2007). Zudem wird eine verminderte DNase-Aktivität im Plasma der Krebspatienten als Ursache für Anreicherungen an freien DNA-Sequenzen in der Literatur diskutiert (Cherepanova *et al.*, 2008). 2001 publizierten Jahr *et al.*, dass neben kleineren, zirkulierenden DNA-Fragmenten (70 - 200 bp, Basenpaaren) auch größere DNA-Sequenzen von bis zu 21 kbp in die Umgebung abgesondert werden können (Jahr *et al.*, 2001), wobei doppelsträngige DNA über einen längeren Zeitraum in der Zirkulation nachgewiesen werden kann als einzelsträngige Nucleinsäuren (Bendich und Wilczok, 1965). Für freie, zirkulierende DNA-Moleküle konnten im menschlichen Körper Halbwertszeiten von 4 Minuten bis hin zu mehreren Stunden beschrieben werden, wobei die Nucleinsäuren über die Leber, die Milz oder die Nieren abgebaut bzw. ausgeschieden werden (Lo *et al.*, 1999; Minchin *et al.* 2001; Tamkovich *et al.*, 2006; Korabecna *et al.*, 2008).

In klinischen Studien konnte über quantitative Messungen der zellfreien DNA bereits mehrfach eine Korrelation zwischen der cfDNA-Menge und dem Krankheitsstatus der Krebspatienten aufgezeichnet werden, wobei die Menge an freier DNA mit der Größe des Tumors, dem Stadium oder einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden konnte (Altamari *et al.*, 2008; Catarino *et al.* 2008; Sunami *et al.*, 2008; van der Drift *et al.*, 2010; Schwarzenbach *et al.*, 2008). So haben z.B. Catarino *et al.* neben signifikant erhöhten DNA-Mengen bei Brustkrebspatientinnen, im Vergleich zu gesunden Individuen (105.2 vs. 77.06 ng / ml, $p < 0.001$), einen Konzentrationsabfall nach einer erfolgten Operation beobachten können (105.2 vs. 59.0 ng / ml, $p = 0.001$), was die tumorspezifische Herkunft der freien DNA demonstriert. Auch Kumar und Kollegen waren in der Lage, Therapieerfolge über die Quantifizierung der freien Nukleinsäuren zu beobachten (Kumar *et al.*, 2010). Weiterhin konnten Gautschi *et al.* bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinom einen Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration und der Gesamtüberlebenszeit der Patienten ausmachen, was den prognostischen Wert der freien Nukleinsäuren belegt (Gautschi *et al.*, 2004). Obwohl die Schwellenwerte der freien DNA-Moleküle für eine eindeutige klinisch relevante Aussage noch nicht genau erfasst sind, bietet die quantitative Analyse der cfDNA die Möglichkeit dynamische Prozesse der Tumorprogression widerzuspiegeln und kann somit neben Therapieerfolgen auch Vorhersagen über die Überlebenszeit der erkrankten Personen liefern (Jung *et al.*, 2010; Gal *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2006).

Obwohl manche klinische Studien bereits auf den Wert der cfDNA-Quantifizierung als vielversprechenden Biomarker hingewiesen haben (Sozzi *et al.*, 2003; Gautschi *et al.*, 2004; Sunami *et al.*, 2008), konnten andere Arbeitsgruppen keine eindeutige Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und der Tumorgöße bzw. dem Tumorstadium abbilden (Jung *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2008). Aufgrund der divergenten Studienergebnisse wurde die Bedeutung der cfDNA-Konzentration aus Plasmaproben von Krebspatienten im Rahmen eines Teilprojekts der vorliegenden Arbeit analysiert, um die Relevanz der freien Nukleinsäuren weiter aufzuschlüsseln.

1.4.1 Zellfreie, tumorspezifische Nukleinsäuren

Neben der quantitativen Bestimmung der zellfreien DNA können möglicherweise zellfreie, tumorspezifische Nukleinsäuren (*circulating tumor DNA*, ctDNA), ähnlich wie die zirkulierenden Tumorzellen, als „flüssige Biopsie“ entscheidende Hinweise für die

Wahl der Therapiestrategie liefern, da die Mutationsanalyse der ctDNA das Ansprechen einer Therapie spezifisch vorhersagen kann.

Gegenwärtig erfolgt die Testung des Mutationsstatus noch häufig aus formalinfixiertem Paraffinmaterial von Primärtumoren oder seltener Metastasen. Die Analyse der freien ctDNA in Plasma- Serum-, Stuhl- oder Urinproben ermöglicht über einen nicht-invasiven Eingriff tiefere Einblicke in das spezifische Mutationsprofil der erkrankten Patienten gewinnen zu können, wobei sich über diesen Ansatz auch Mutationsanalysen von Krebspatienten durchführen lassen, deren Biopsie schwer bzw. nicht zugänglich ist. Das größte Problem dieser Strategie ist jedoch die Assay-Spezifität und -Sensitivität. Laut Diehl *et al.* werden pro 100 g Tumor bis zu 3,3 % an Tumor-DNA am Tag in den Blutstrom entlassen (Diehl *et al.*, 2005). Für die Etablierung einer Methode zum Nachweis der ctDNA ist entscheidend, dass gezielt mutierte DNA-Sequenzen vor dem Hintergrund der wild-typischen Nukleinsäuren detektieren werden. Über PCR-basierte Methoden, wie z.B. der „BEAMing-Technologie“ lassen sich bereits kleinste Mengen an krebsrelevanten DNA-Molekülen in Patientenproben aufspüren und quantifizieren (Li *et al.*, 2006; Diehl *et al.*, 2006).

Die Analyse der tumorspezifischen DNA-Moleküle kann wichtige Indizien über die Eigenschaften der persönlichen Krebserkrankung liefern, ohne dass eine Operation erforderlich ist. Weiterhin erlaubt die Bestimmung der molekularen Abweichungen in der „Krebszell-DNA“ Anhaltspunkte auf die Wirksamkeit bestimmter Medikamente, wodurch Therapien über die individuellen Eigenschaften der Krebserkrankung von Patient zu Patient kostengünstig angepasst werden könnten.

1.4.2 Zirkulierende Nukleinsäuren im Tiermodell

Humanisierte Tiermodelle bieten den Vorteil, dass leicht zwischen „fremd“ und „eigen“ unterschieden werden kann, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Nachweis an zirkulierender Tumor-DNA nicht über spezifische Mutationen erfolgen musste. Die pharmakodynamische Bedeutung der ctDNA wurde, im Verlauf des Promotionsvorhabens über die Vervielfältigung humaner, repetitiver *Alu*-Sequenzen aus Plasmaproben der Versuchstiere ermittelt.

Die medizinische Relevanz der zellfreien Nukleinsäuren wird in der aktuellen Literatur noch intensiv diskutiert (Jung *et al.*, 2010). Kostengünstige Tiermodelle können

möglicherweise dabei helfen, die klinische Bedeutung der freien DNA-Moleküle grundlegend und zügig aufzuklären. Bisher haben sich lediglich wenige Arbeitsgruppen mit der Analyse der zirkulierenden DNA im Tiermodell befasst. Dennoch konnten Kamat *et al.* im Jahr 2006 eine Korrelation zwischen der Tumormasse und der Konzentration an freien Nukleinsäuren über den Nachweis von humanem β -Aktin in orthotopen Eierstockkrebsmodellen verfolgen (Kamat *et al.*, 2006). Ein Jahr später waren Rago *et al.* in der Lage, Tumorwachstum über die Amplifikation menschlicher *LINE*-Sequenzen (*long interspersed nuclear elements-1*) im Tiermodell molekular zu beobachten (Rago *et al.*, 2007).

Die beschriebenen Literaturhinweise zeigen, dass sich über die Nutzung der Xenograftmodelle ein Tumorwachstum molekularbiologisch verfolgen lässt. Diese Tatsache begünstigt die Vermutung, dass sich über Tiermodelle mannigfaltige Therapieverfahren präklinisch testen lassen. Daher wurde in einem weiteren Teilabschnitt der eigenen Arbeit die Bedeutung der ctDNA unter Verwendung eines firmeneigenen MEK-Inhibitors untersucht, um die Wirkung des Medikaments molekularbiologisch verfolgen zu können.

1.5 Brustkrebs

Brustkrebs (Mammakarzinom) ist eine maligne Entartung der Brustdrüse und in den westlichen Industrienationen die häufigste Krebserkrankungen bei Frauen (Zwiefel und Janni, 2011). Die Inzidenz des Mammakarzinoms liegt in Deutschland bei etwa 150 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen, wobei statistisch gesehen jede 8. Frau im Verlauf ihres Lebens an Brustkrebs leidet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer Erkrankung mit zunehmendem Alter ansteigt. Allein in Deutschland werden pro Jahr etwa 57.000 Neuerkrankungen und ca. 17.500 Todesfälle registriert (Statistisches Bundesamt, 2006). Obwohl sich seit 1970 die Inzidenz verdoppelt hat, ist die Mortalitätsrate eher rückläufig. Verbesserte, zielgerichtete Therapieansätze ermöglichen heutzutage eine längere Überlebenszeit der Patienten. So hatten krebserkrankte Frauen mit Her2-positivem Mammakarzinom (*human epidermal growth factor receptor-2*) in der Vergangenheit eine ungünstige Prognose. Mit Trastuzumab (Herceptin) ist in der EU seit April 2000 ein Antikörper gegen Her2-Rezeptoren zugelassen worden, der gezielt die Funktion von diesem Rezeptor hemmt, was das erneute Auftreten von Brustkrebs signifikant reduziert und die Überlebensrate der Patienten deutlich verlängert hat (Goddard *et al.*, 2011). Obwohl

die Mortalitätsrate rückläufig ist, ist aufgrund der ansteigenden Neuerkrankungen eine frühzeitige Diagnose der Krankheit von essentieller Bedeutung, da ein Großteil der Patientinnen an einer verspäteten Diagnose verstirbt. Der frühzeitige Nachweis von klinisch relevanten Biomarkern wie z.B. CTCs oder ctDNA kann möglicherweise dazu beitragen die Erkrankung rechtzeitig zu identifizieren. Weiterhin kann über die molekulare Analyse dieser Biomarker ein Ansprechen der Therapie oder eine individuelle Prognose zeitnah abgebildet werden.

Um die Bedeutung der CTCs und der freien Nukleinsäuren ausgiebiger zu analysieren, wurden humanisierte, brustkrebsspezifische Tiermodelle etabliert. Neben der klinischen Relevanz der Brustkrebserkrankung bietet diese Modellform den Vorteil, dass sich orthotope Applikationen der Tumorzellen in die Milchleiste leicht durchführen lassen. Orthotope Injektionsmodelle sind deutlich besser an die *in vivo*-Situation angepasst und spiegeln insbesondere das Metastasierungsverhalten und die lokale Tumordinfiltration sehr gut wider (Killian, 1999). Ergänzend dazu lässt sich der Verlauf der Tumorprogression relativ einfach messen bzw. verfolgen, weshalb diese Modellform im folgenden genutzt und untersucht wurde.

2 Material

2.1 Geräte

Agilent 2100	Agilent Technologies
Adapter zum Vortexen des DNA-Chips	Agilent Technologies
Agilent Chip Priming Station	Agilent Technologies
Autoklav Systec D-65	Systec
Brutschrank BDD6220	Heraeus
CASY® Cell Counter + Analyser Model TT	OMNI Life Science
CellTracks Analyzer II®	Veridex
Digitalkamera Ixus 55	Canon
Durchflusszytometer FACSAria	BD Bioscience
FastPrep®-24 Instrument	MP Biomedicals
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
iBlot® Dry Blotting System	Invitrogen
iBlot® Gel Transfer Device	Invitrogen
ImageQuant	GE Healthcare
Magnetpartikelkonzentrator	Dynal, Invitrogen
Microtom HM355S	Thermo Scientific
Mikroskop IM35	Zeiss
Mikrowaage ME	Sartorius
Mikrozentrifuge Galaxy Mini	VWR
Mirax-Imaging System	Zeiss
NanoDrop ND-1000	Peqlab
Pipettierhilfe	Eppendorf
Real-Time PCR System (7500 Fast)	Applied Biosystems
Sterile Zellkulturbank HERAsafe	Heraeus
Thermomixer Compact	Eppendorf
Überkopfschüttler	Bachofer
Veriti® Thermal Cycler	Applied Biosystems
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Water Purification System Milli-Q	Millipore
Zentrifuge 5424R und 5804R	Eppendorf
Zytozentrifuge Cytospin®4	Thermo Scientific

2.2 Software

CellTracks Analyzer II® Software

CellQuest

CorelDraw

Excel

Expert Software Package

Graphpad Prism

ImageQuant

Microsoft Word

Mirax Viewer Software

Primer3

2.3 Sonstige Materialien

DNA1000 LabCHIP

Agilent Technologies

CellTracks® Cartridge

Veridex

CellTracks® MagNest

Veridex

EDTA-Monovetten

Sarstedt

Kanülen STERICAN

B.Braun

Kryoröhrchen

Greiner

Lysing Matrix D

MP Biomedicals

MagicMark™ XP Western Protein Standard

Invitrogen

NuPAGE® Bis-Tris-Acetate Gel

Invitrogen

Original-Perfusor®-Spritzen

B.Braun

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard

Invitrogen

Shandon EZ Cytofunnel®

Thermo Scientific

SuperFrost®Plus Objektträger

Thermo Scientific

Zellkulturmaterialien

Greiner, Nunc, Falcon

PCR-Gefäße

Sarstedt,

Applied Biosystems

Pipettenspitzen

Eppendorf

2.4 Enzyme

ProteinaseK	Qiagen
Pepsin	DCS Diagnostic
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega
TrypLE™ Express	Invitrogen

2.5 Chemikalien und Substanzen

β-Mercaptoethanol	Sigma
CSFE	Invitrogen
DAB	Roche
DAPI	Invitrogen
DMSO	Sigma
Ethanol	Roth
Hoechst 33342	Invitrogen
Isopropanol	Roth
MEK-Inhibitor (Bay869766)	Bayer HealthCare
Permunt Mounting Medium	Fisher Scientific
Peroxidase-Blocking Reagent	Dako
Tween-20	Sigma
VECTASHIELD® Mounting Media	Vector Labs
Xylol	Merck

2.6 Puffer, Medien und Zusätze

BD Matrigel™	BD Biosciences
DMEM / F-12	Invitrogen
FCS	Invitrogen
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare
Isotone Kochsalzlösung	B.Braun
Ketavet	Bayer HealthCare
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen
PBS	Invitrogen
RBC Lysis Solution	Qiagen
RPMI + Glutamax	Invitrogen

Material

Rompun	Bayer HealthCare
SSC	Kreatech
TBS	Merck

2.7 Kit-Systeme

AdnaTest (BreastCancerSelect)	AdnaGen
AdnaTest (BreastCancerDetect)	AdnaGen
Amersham ECL™ Western Blotting System	GE Healthcare
CELLCAPTURE™ CTC Mouse/Rat Kit	Veridex
DNeasy Mini Kit	Qiagen
Epithelial-Mesenchymal Transition PCR Array	SABiosciences
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
HotStarTaq™ Master Mix Kit	Qiagen
PreAmp cDNA Synthesis Primer Mix (EMT)	SABiosciences
QuantiTec SYBR Green PCR Kits	Qiagen
Qiamp DNA Mini Kit	Qiagen
RNA Protect Animal Blood Tubes	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Protect Animal Blood Kit	Qiagen
Senscript RT-Kit	Qiagen

2.8 Antikörper

Tabelle 2.1: Antikörper

Primärantikörper	Quelle: [Klon], Verdünnung	Verwendung
Maus- α -EpCAM-APC	BD Biosciences: [EBA-1], 1 : 200	FACS, Fluoreszenzmikroskopie
Kaninchen- α -EpCAM	Abcam: [E144], 1 : 100	WB
Maus- α -Pan-CK	AS Diagnostik: [A45-B / B3]	EPISPOT
Kaninchen- α -Ki67	Sigma: [HPA000451], 1 : 500	Histologie
Kaninchen- α -MUC-1	Abcam: [EP1024Y], 1 : 1000	WB
Maus- α -MUC-1-FITC	BD Pharmingen™: [HMPV], 1 : 1000	FACS
Maus- α -Tubulin	Sigma: [B-5-1-2], 1 : 1000	WB
Sekundärantikörper	Quelle [Klon], Verdünnung	Verwendung
Ziege- α -Kaninchen-HRP	GE Healthcare: [NIF824], 1 : 5000	WB
Schaf- α -Maus-HRP	GE Healthcare: [NA9310], 1 : 5000	WB
Ziege- α -Kaninchen-HRP	Dako: [K4010], 1 : 2000	Histologie
Kaninchen- α -CK19-FITC	AS Diagnostik: [A45-B / B3]	EPISPOT

(APC: Allophycocyanin, CK: Zytokeratin, EpCAM: *Epithelial cell adhesion molecule*, EPISPOT: *EPithelial ImmunoSPOT*, FACS: *Fluorescence activated cell sorting*, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, HRP: *Horseradish peroxidase*, WB: Westernblot)

2.9 Zelllinien und Kulturmedien

Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden zusätzlich mit 10 % FCS (Fetales Kälberserum) und 5 % P / S (Penicillin / Streptomycin) versetzt.

Tabelle 2.2: Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Kulturmedium
MDA-MB-231	ECACC, # 92020424	DMEM / F-12, 200 mM Glutamin
MDA-MB-231-GFP	Florian Prinz (Bayer HealthCare, Berlin)	DMEM / F-12, 200 mM Glutamin, 150 µg / ml Hygromycin
MDA-MB-231-SA	Sanna-Maria Käkönen (Bayer HealthCare, Berlin)	DMEM / F-12, 200 mM Glutamin
MDA-MB-453	ATCC, # HTB-131™	DMEM / F-12, 200 mM Glutamin
MDA-MB-468	ATCC, # HTB-132™	DMEM / F-12, 200 mM Glutamin
MCF-7	ATCC, # HTB-22™	DMEM / F-12, 200 mM Glutamin
KPL-4	Kawasaki Medical School	RPMI + Glutamax

(ATCC: *American Type Culture Collection*, ECACC: *European Collection of Cell Cultures*, ml: Milliliter, mM: millimolar)

Oligonukleotide

Oligonukleotide für Transkriptionsstudien und quantitative Analysen wurden bei der Firma TIB Molbiol in Berlin bestellt (Reinheitsgrad: GSF (Sephadex Gelfiltration)). Die Sequenzen der verwendeten *Alu*-Primer wurden aus der Veröffentlichung von Schneider *et al.* aus dem Jahr 2002 übernommen (Schneider *et al.* 2002).

Tabelle 2.3: Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing T (°C)	Amplikongröße (bp)
<i>Aktin</i>	Unbekannt (AdnaGen)	60	111
<i>Alu (for)</i> <i>Alu (rev)</i>	cac ctg taa tcc cag cac ttt ccc agg ctg gag tgc agt	60	130
<i>GAPDH (for)</i> <i>GAPDH (rev)</i>	atc atc cct gcc tct act gg gtc agg tcc acc act gac ac	60	128
<i>EpCAM (GA733-2)</i>	Unbekannt (AdnaGen)	60	395
<i>Her2</i>	Unbekannt (AdnaGen)	60	265
<i>MUC-1</i>	Unbekannt (AdnaGen)	60	299
<i>PPIA (for)</i> <i>PPIA (rev)</i>	ttc atc tgc act gcc aag ac tcg agt tgt cca cag tca gc	60	118
<i>Vimentin (for)</i> <i>Vimentin (rev)</i>	cga aaa cac cct gca atc tt tcc agc agc ttc ctg tag gt	60	618

(bp: Basenpaare, *EpCAM*: *Epithelial cell adhesion molecule*, *for*: *forward*, *GAPDH*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, *Her2*: *Human epidermal growth factor receptor 2*, *MUC-1*: *Mucin 1*, *PPIA*: *Peptidylprolyl-isomerase A*, *rev*: *reverse*, T: Temperatur)

2.10 Versuchstiere und Haltung

Alle Versuchstiere wurden bei der Firma TACONIC bestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Etablierung der Xenograftmodelle ausschließlich weibliche Nacktmäuse (*nu / nu*) im Alter zwischen 5 und 6 Wochen verwendet, da junge Mäuse lediglich wenige NK-Zellen aufweisen, die den Metastasierungsprozess unterdrücken könnten. Zudem tragen Nacktmäuse eine Spontanmutation im *foxn1*-Gen, was neben fehlender Körperbehaarung zu einem athymischen Phänotyp führt. Die Anzahl an B-Zellen ist in der Nacktmaus normal, während reife T-Lymphozyten fehlen (Sprent, 1974). Der Mangel an T-Lymphozyten führt zu einem stark eingeschränkten Immunsystem, was den Organismus zu einem idealen Wirt für artfremde (xenogene)

Transplantationen macht (Schueler, 1999). Alle Mäuse wurden unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur $20 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $60 \pm 5\%$ und Tag-Nacht-Rhythmus für 12 h durch Kunstlicht bei 300 Lux).

Entkeimtes Trinkwasser und pelletiertes Futter stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Alle tierexperimentellen Versuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Anzeige 1403). Die Versuche erfolgten nach den Richtlinien des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und des Arbeitskreises 4 in der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) „Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch“. Ergänzend wurden für alle tierexperimentellen Versuche die Richtlinien für das Wohlergehen von Tieren in der Krebsforschung aus der Veröffentlichung von Workman *et al.* eingehalten (Workman *et al.*, 2010).

2.11 Humane Plasmaproben

Für die vergleichende Analyse von zellfreien DNA-Mengen (*deoxyribonucleic acid*) im EDTA-Plasma von gesunden Individuen und Krebspatienten wurden frische Kontrollproben von 40 Probanden (20 ♀ und 20 ♂) entnommen und präpariert. Ferner wurden EDTA-Plasmaproben von jeweils 20 Brust-, Kolon-, Lungen- und Prostatakrebspatienten von der Firma Indivumed aus Hamburg käuflich erworben und entsprechend prozessiert. Heparin-Proben von Kopf-Hals-Karzinompatienten (n = 58) wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Ingeborg Tinhofer-Keilholz (Klinik für Strahlentherapie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) bereitgestellt und mit Heparin-Proben von gesunden Probanden (n = 20) verglichen.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden mit steriler Ausrüstung unter HERASafe-Sterilbänken durchgeführt. Die Zelldichte von Kulturen wurde unter Verwendung des CASY® Cell Counters bestimmt. Zentrifugationen erfolgten bei 800 g für 5 min bei 4°C. Alle eingesetzten Zellen wurden bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 %igem CO₂-Anteil in Brutschränken der Firma Heraeus kultiviert. Die verwendeten Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 80 % passagiert. Hierfür wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt und die adhärent wachsenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 - 5 min bei 37°C unter Verwendung der TrypLE™ Express-Lösung (1 - 2 ml) vereinzelt, in 10 ml frischem Medium aufgenommen, zentrifugiert und erneut in frischem Medium verdünnt ausgesät.

3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 1 - 2 x 10⁶ Zellen geerntet, in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Nach kurzer Kühlung auf Eis wurden die Zellen direkt bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Kryokulturen nachfolgend bei -196°C im Stickstofftank eingelagert. Das Auftauen eukaryotischer Zellen erfolgte durch Erwärmen im 37°C-Wasserbad und das unmittelbare Aufnehmen in 10 ml Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium ausgesät.

3.3 Methoden zur *in vitro*-Charakterisierung der Brustkrebszellen

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wandert ein SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld einer Gelkammer zum Plus-Pol entlang einer Polyacrylamidmatrix, wobei die Eigenladung der Proteine vom Natriumdodecylsulfat überlagert wird. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht. Für die SDS-PAGE wurden 20 µg Protein aus dem Lysat der Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung von NuPAGE® Bis-Tris-Acetate Gelen

(4 - 12 %) der Firma Invitrogen. Die Größenbestimmung der Proteine wurde durch einen aufgetrennten Proteinstandard (MagicMark™ XP Western Protein Standard, Invitrogen) ermöglicht.

3.3.2 Westernblot

Zur Detektion der EpCAM- und MUC-1-Expression wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Beim Westernblotting werden Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 20 Volt für 10 min mit Hilfe des iBlot® Dry Blotting Systems (Invitrogen). Zur Absättigung freier Bindestellen wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss für ≥ 1 h mit Blockpuffer (PBS mit 0,1 % Tween-20 und 5 % Milchpulver) bei Raumtemperatur (RT) unter Schütteln inkubiert und nachfolgend 3 mal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Die immobilisierten Proteine auf der Westernblot-Membran wurden mit Hilfe der verwendeten, spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 2.1) nachgewiesen. Hierfür wurde die Membran zuerst mit dem entsprechenden Primärantikörper für ≥ 1 h bei 4°C inkubiert, 3 mal mit PBS-T für je 10 min gewaschen und für weitere 45 min mit geeigneten, sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten α -Immunglobulin-Antikörpern inkubiert. Die Membran wurde daraufhin erneut gewaschen und die Proteine unter Verwendung des Amersham ECL™ Western Blotting Systems (GE Healthcare) sichtbar gemacht. Die Auswertung der Daten erfolgte am Imagequant-Gerät der Firma GE Healthcare mit der Imagequant-Software. Die Proteinexpression von Tubulin wurde als Ladekontrolle bei allen untersuchten Zelllinien entsprechend mitgemessen.

3.3.3 Expressionsanalyse von Oberflächenproteinen am Durchflusszytometer (FACS)

Zur Analyse der Oberflächenexpression von EpCAM und MUC-1 wurden 5×10^5 Zellen der MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 Linien geerntet, mit 5 ml PBS gewaschen und nachfolgend in 0,2 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten α -EpCAM- oder α -MUC-1-Antikörpern (Tabelle 2.1) im Dunkeln für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen erneut in 0,5 ml PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen. Ungefärbte Zellen der entsprechenden Linien wurden als Kompensationskontrollen mitgeführt. Der Ausschluss toter Zellen erfolgte über eine

Anfärbung mittels DAPI (1 µg / ml) für 2 min. Innerhalb dieser Zeit kann der Fluoreszenzfarbstoff intakte Zellmembranen nicht passieren und färbte demnach lediglich tote Zellen an.

3.3.4 Expressionsstudien von Proteinen am Fluoreszenzmikroskop

Der Nachweis der Proteinexpression von EpCAM und MUC-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch erbracht. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst wie unter **3.3.3** beschrieben behandelt und mit den entsprechenden Antikörpern (Tabelle 2.1) im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte für 5 min bei RT durch Zugabe von Hoechst. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen über eine Zytozentrifugation mittels Cytospin®4 (Fisher Scientific) bei 950 rpm (*rounds per minute*) für 5 min auf einen Objektträger gebracht, luftgetrocknet und zur Darstellung am Fluoreszenzmikroskop eingesetzt.

3.4 Tierversuche

Für Xenotransplantationsexperimente wurden ausschließlich Tumorzellen verwendet, die in der Kultur eine Konfluenz von mindestens 80 % und ein Viabilität von ≥ 90 % aufwiesen. Sofern die Zellen mit Matrigel (BD Matrigel™, BD Biosciences) appliziert wurden, wurde dieses vor der jeweiligen Injektion auf eine Temperatur von 4°C gebracht. Alle weiteren für die Zellapplikation notwendigen Verbrauchsmaterialien wurden ebenfalls bei einer Temperatur von 4°C gelagert, um die Fluidität des Matrigels zu gewährleisten. Vor der Applikation wurden die verwendeten Zellen vom Flaschenboden gelöst, gewaschen und in 10 ml kaltem PBS aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde genau soviel der Zellsuspension abzentrifugiert, dass die gewünschte Zellmenge für die jeweilige Applikation (+ 50 % Überschuss) erreicht wurde. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut mit einer kalten PBS-Lösung resuspendiert und bei Bedarf mit der entsprechenden Menge an Matrigel im Verhältnis von 1 : 1 gemischt, auf Eis gelagert und innerhalb von 30 min in die Versuchstiere appliziert.

3.4.1 *In vivo*-Injektionsmodelle

Eine subkutane Zellapplikation entspricht der *in vivo*-Situation nur begrenzt, während orthotope Injektionsmodelle deutlich besser die *in vivo*-Situation und insbesondere

das Metastasierungsverhalten und die lokale Tumordinfiltration widerspiegeln (Jerald J. Killian 1999). Zum genauen Vergleich wurden daher beide Applikationsarten durchgeführt. Für die Versuche wurden 5×10^5 - 2×10^6 Zellen subkutan (s.c.) in die rechte Flanke (MCF-7 und MDA-MB-231) oder orthotop in die Milchleiste (*mammary fat pad*) der Versuchstiere injiziert (MDA-MB-231, MDA-MB-231-SA, MDA-MB-468, KPL-4). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus Xenografts mit Tumorgößen zwischen 20 - 200 mm² gewonnen und analysiert.

Um kurzfristige Expressions- und Transkriptionsänderungen zirkulierender Zellen verfolgen zu können, wurden zusätzlich intravenöse (Schwanzvene) und intrakardiale Modelle (Herz) mit Zellen der MDA-MB-231 und der KPL-4 Linien etabliert. Für die Analyse dieser Modelle wurden 1 - 5×10^5 Zellen in die Versuchstiere appliziert und Blut- bzw. Organproben nach 30 min - 5 h untersucht. Vor der Sektion wurden alle Tiere mit einer Rompun-Ketavet-Kochsalzlösung narkotisiert, wobei die Sektion der Tiere erst nach Erreichen des Toleranzstadiums erfolgte.

3.4.2 Blutentnahme

Blutproben der Tiere wurden in sterile EDTA-Monovetten der Firma Sarstedt aufgenommen und bis zur Aufarbeitung bei RT gelagert. Die Blutentnahme erfolgte je nach Versuch über eine Herzpunktion, die Hohlvene (*Vena cava inferior*) oder die „äußere Drosselvene“ (*Vena jugularis externa*). Das gewonnene Blutvolumen lag zwischen 0,5 (*Vena jugularis externa*) und 1,2 ml (Herzpunktion und *Vena cava inferior*).

3.4.3 Behandlungsversuch

Zur Validierung der CTCs und der zellfreien Nukleinsäuren als pharmakodynamische Biomarker wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Behandlungsstudie unter Verwendung des MEK-Inhibitors (Bay869766) durchgeführt. Den Versuchstieren wurden bei diesem Vorhaben 1×10^6 Zellen der MDA-MB-231 Linie appliziert und ab einer Tumorgöße von 50 mm² mit der Substanz (3 mg / ml) + Vehikellösung (30 % Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Wasser, 10 ml / kg p.o.) oder nur mit der Vehikellösung behandelt. Nach 2, 5, 8, 11 und 15 Tagen erfolgte die Blut-, Tumor- und Organentnahme von jeweils 6 Tieren pro Gruppe zum Nachweis der CTCs bzw. der ctDNA und der Lymphknotenmetastasen. Als Positivkontrolle bzw.

Negativkontrolle wurden Proben von 6 Tieren mit Tumoren (50 mm²) bzw. 6 tumorfreie, naive Mäuse identisch aufgearbeitet und untersucht.

3.5 Isolierung von genomischer DNA aus Blut- und Plasmaproben

Die Isolierung von genomischer DNA aus Blut- oder Plasmaproben wurde mit Hilfe des DNeasy Mini Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei das EDTA-Plasma über einen Zentrifugationsschritt bei 2500 g für 10 min (RT) gewonnen wurde.

3.6 RNA-Aufreinigung aus Gewebestücken

Tumorproben, Gewebestücke der Lunge, Leber oder der Milz sowie *axiale* bzw. *inguinale* Lymphknoten (LN1 / LN2) wurden unmittelbar nach Tötung des Tieres in sterile Eppendorfgefäße überführt und nachfolgend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Stabilität des mRNA-Profiles zu gewährleisten. Die langfristige Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C. Zur Aufreinigung der RNA wurden die Proben bei 4°C angetaut und in ein steriles Reaktionsgefäß (Lysis Matrix Typ D) umgesetzt, welches zuvor mit 550 µl sterilem Lysepuffer (RLT) und 5,5 µl β-Mercaptoethanol befüllt wurde. Lysis Matrix Typ D-Gefäße enthalten zweierlei Arten von Keramik-Kügelchen, die zum mechanischen Aufschluss der Gewebeproben dienen. Die Homogenisierung der Proben erfolgte für 45 s (Sekunden) bei 2000 rpm unter Verwendung des FastPrep[®]-24 Instruments. Die nachfolgende Aufreinigung der RNA geschah unter Verwendung des RNeasy Mini Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Das Kit-System beruht auf der spezifischen Bindung der RNA an die Oberfläche von Silicagel bei hohen Salzkonzentrationen. Nach zweimaligem Waschen wurde die RNA in 30 - 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und anschließend bei -80°C gelagert. Um die Humanspezifität der Primer zu bestätigen, wurden 20 Organproben naiver Mäuse in einem identischen Verfahren aufgearbeitet und analysiert.

3.7 Quantitative und qualitative Bestimmungen isolierter DNA / RNA

Für die quantitative Untersuchung wurden 1 µl der extrahierten DNA bzw. RNA mit dem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer nach Anleitung des Herstellers vermessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die optische Dichte (OD) der DNA- bzw. RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur

Qualitätskontrolle wurde der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} ermittelt. Ein $OD_{260/280}$ Wert von 1,8 entspricht einer 100 %igen Reinheit der DNA. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 kann eine ausreichende Sauberkeit angenommen werden. Werte unter 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Bei Werten über 2,0 liegt die Verunreinigung an vorhandener RNA oder denaturierter DNA vor. Für RNA entspricht ein $OD_{260/280}$ Wert von 2,0 für eine genaue Reinheit. Für nachfolgende molekularbiologische Analyseverfahren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich reine Proben mit entsprechenden $OD_{260/280}$ Werten von 1,8 - 2,0 (DNA) bzw. 2,0 - 2,2 (RNA) verwendet.

3.8 cDNA-Synthese

3.8.1 AdnaTest

Die Synthese der cDNA (*complementary DNA*) (Kogan *et al.*, 1987) aus Tumorzelllysaten, die über den AdnaTest gewonnen wurden, erfolgte wie von der Firma AdnaGen vorgegeben mit dem Senscript-Kit von Qiagen. Die cDNA wurde zunächst für 60 min bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert, anschließend für 5 min bei 93°C denaturiert und kurzzeitig bei 4°C bzw. längerfristig bei -20°C (max. 14 Tage) bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.8.2 Übrige Proben (Blut- und Gewebelysate)

Die RNA-Proben aus Blut- und Gewebelysaten zum Nachweis der CTCs bzw. der Metastasen wurden mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Zur reversen Transkription wurden für die Detektion von CTCs 800 ng der isolierten RNA aus Blutproben eingesetzt, während aus den Proben der Gewebelysate 400 ng umgeschrieben wurden. Für die cDNA-Synthese wurden folgende Bedingungen gewählt: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C. Im Anschluss an das Umschreiben wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

3.9 Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Markerexpression

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurden mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) Proben aus Blut- und Gewebepreparaten auf die Transkription humaner Gene (*GAPDH*, *PPIA*, *EpCAM*, *MUC-1*, *Her2* und *Vimentin*)

untersucht. Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation spezifisch definierter Nukleinsäureabschnitte durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Fallona, 1987; Saiki *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Für die vorliegende Dissertationsschrift wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*forward*- und *reverse*-Primer) zur Amplifikation der definierten DNA-Bereiche eingesetzt (siehe Tabelle 2.3). Die Primer lagern sich antiparallel zueinander an komplementäre Sequenzen der Ziel-DNA (*template*) an und legen somit die Startpunkte der Synthese fest. Für die PCR wurde das HotStarTaq™ Master Mix Kit der Firma Qiagen verwendet. Die PCR-Reaktion wurde unmittelbar in einen auf 95°C vorgeheizten PCR-Cycler eingesetzt, um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden (*pseudo hot start*).

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde ein Mastermix mit 5 µl komplementärer DNA zusammen mit 12,5 µl des HotStarTaq™ Master Mix Kits hergestellt. Primer wurden in einer finalen Konzentration von 0,5 µM (AdnaTest-Primer: 2 µl) zugegeben und der Ansatz insgesamt auf 25 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt: nach 15 min Denaturierung bei 95°C folgten 40 Reaktionszyklen (Denaturierung: 94°C für 45 s, Primerbindung: 60°C für 45 s und Elongation: 72°C für 30 - 60 s). Anschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. Die Analyse der PCR-Produkte wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser System unter Verwendung der DNA 1000 LabChips nach Herstellerangaben durchgeführt. *Peaks* der korrekten Amplikons mit Konzentrationen ≥ 1 ng / µl wurden als positive Signale gewertet und sind im Rahmen dieser Arbeit als erkennbare Bande dargestellt.

3.10 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde für Quantifizierungen der zellfreien Nukleinsäuren im Plasma und zur Quantifizierung der Tumorzellen im Blut eingesetzt. Die qRT-PCR erlaubt, den Verlauf einer PCR-Reaktion in Echtzeit verfolgen zu können (Holzapfel und Wickert, 2007). Hierbei erfolgt die Quantifizierung über Fluoreszenzmessungen am Ende eines PCR-Zyklus. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der SYBR-Green-Farbstoff von Qiagen (QuantiTec SYBR Green PCR Kit) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert mit doppelsträngigen Nukleinsäuren. Während der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Zielsequenz in jedem Zyklus unter optimalen PCR-Bedingungen. Daher nimmt das

Fluoreszenzsignal während dieser Phase proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was die Quantifizierung möglich machte. Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz anstieg, wurde als CT-Wert (*Cycle-Threshold*) definiert. Über eine Standardkurve war es möglich, aus dem CT-Wert einer Probe die Konzentration an spezifischer Probenmenge zu bestimmen (quantitative PCR-Messung). Als Negativkontrollen sind Wasserproben und Proben von tumorfreien Mäusen im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen worden. Die qRT-PCR erfolgte unter Verwendung des 7500 FAST-Geräts der Firma Applied Biosystems, wobei die Datenanalyse über die mitgelieferte Software erfolgte. Die weitere Verarbeitung der Rohdaten wurde mittels Excel durchgeführt, während für die graphische Darstellung Graphpad Prism und CorelDraw verwendet wurden.

3.11 Biomarkernachweismethoden

3.11.1 Nachweismethoden von zirkulierenden Tumorzellen

3.11.1.1 AdnaTest

Bei dem Testsystem der Firma AdnaGen (AdnaTest) wurden die Tumorzellen durch eine immunomagnetische Anreicherung und eine nachfolgende Multiplex-PCR im peripheren Blut nachgewiesen (Ziegelschmid *et al.* 2005). Im ersten Schritt des Verfahrens wurden humane Karzinomzellen durch eine Immunselektion mit Antikörpern gegen die epithelialen Oberflächenproteine EpCAM und MUC-1 aus Blutproben angereichert und nachfolgend lysiert. Im zweiten Schritt wurde die mRNA der selektierten Zellen mittels Oligo (dT)₂₅-gekoppelten Magnetpartikeln isoliert. Im Anschluss erfolgte über die reverse Transkriptase das Umschreiben der mRNA in cDNA, die als Ausgangsmaterial für eine Multiplex-PCR zum Nachweis der Tumorzellen diente. Es wurden *EpCAM*, *MUC-1* und *Her2* als Tumormarker sowie *Aktin* als konstitutiv transkribiertes Kontrollgen (*house-keeping-Gen*) amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer System und DNA 1000 LabChips nach Angaben der Firma AdnaGen.

Das maximale Blutvolumen der Mäuse lag nach der Sektion zwischen 1 und 1,2 ml, weshalb die Antikörpermenge zur Anreicherung der CTCs um ein Fünftel reduziert wurde, da der AdnaTest in der klinischen Anwendung für ein Blutvolumen von 5 ml entwickelt wurde. Alle übrigen Prozesse erfolgten nach Angaben des Herstellers. Für

die Etablierung der Methode wurden 1 - 50 Zellen der MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 Linien unter mikroskopischer Kontrolle in 1 ml frisches, natives EDTA-Mausblut überführt und prozessiert. Als Negativkontrollen wurden 20 Blutproben tumorfreier Mäuse unter identischen Bedingungen analysiert und ausgewertet.

3.11.1.2 CellSearch®

Die CellSearch-Methode basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung über α -EpCAM-Antikörper, die mit mikroskopischen Eisenpartikeln (Ferrofluids) verbunden werden (Siewerts *et al.* 2009), wobei sich die Verbindungen aus Antikörpern und Ferrofluids spezifisch an die epithelialen Tumorzellen binden. Spezielle Magneten reichern nachfolgend die Krebszellen aus der Blutprobe an. Die angereicherten Zellen werden daraufhin fixiert, permeabilisiert und mit DAPI und fluoreszenzmarkierten α -CK-Antikörpern eingefärbt, so dass die CTCs eindeutig als solche identifiziert werden können. Der Ausschluss falsch positiver Zellen erfolgt bei dieser Methode normalerweise über eine zusätzliche Anfärbung von CD45 (Leukozytenmarker). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse der Xenograftproben das CELLCAPTURE™ CTC Mouse/Rat Kit von der Firma Veridex nach Angaben des Hersteller angewendet, wobei die CD45-Analyse bei diesem Ansatz nicht zum Bestandteil des Kits gehört. Für die Analyse wurden 100 μ l frisches EDTA-Blut verwendet.

Zur Validierung wurden 500 Zellen der KPL-4 Linie über eine Verdünnungsreihe gewonnen und in frisches, natives EDTA-Mausblut überführt. Nachfolgend wurde die Probe nach Herstellerangaben bearbeitet und im Anschluss an die Färbung in eine CellTracks® Cartridge übertragen. Diese wurde daraufhin in magnetische MagNest-Kammern überführt, wobei die angereicherten, angefärbten Zellen sich innerhalb der MagNest-Kammern über magnetische Anziehungskräfte entlang der Cartridge-Oberfläche anlagern konnten. Die quantitative, automatisierte Analyse der Proben erfolgte am CellTracks Analyzer II®. Als Negativkontrolle dienten 3 naive Mausblutproben. Die Aufarbeitung und Auswertung der Proben erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Pantel (UAG Riethdorf) am Institut für Tumorbologie in der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (UKE).

3.11.1.3 Qualitative CTC-Detektion ohne Antikörperanreicherung (PCR)

Für den Nachweis von CTCs ohne eine vorangestellte, antikörperbasierte Anreicherung wurden 100 µl einer frischen EDTA-Mausblutprobe in Animal Blood Tubes der Firma Qiagen überführt und für ≥ 2 h bei RT inkubiert, um die roten Blutzellen zu lysieren, wobei gleichzeitig die zelluläre RNA stabilisiert wurde. Nach der Inkubation erfolgte die Aufreinigung der RNA unter Verwendung des Animal Blood Protect Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die anschließende cDNA-Synthese wurde mit 800 ng RNA durchgeführt. Nachfolgend wurde die Probe auf die Transkription der humanen Gene *GAPDH*, *PPIA*, *EpCAM*, *MUC-1*, *Her2* und *Vimentin* untersucht. Hierfür wurden 5 µl der cDNA zusammen mit 12,5 µl des HotStarTaq™ Master Mix Kits gemischt und auf 25 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Primer wurden in einer finalen Konzentration von 0,5 µM (2 µl AdnaTest-Primer) zugegeben. Der Abbruch der PCR-Reaktion erfolgte nach 42 Zyklen. Zur Etablierung der Methode wurden 1 - 10.000 Zellen der Linien MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 in frisches EDTA-Blut naiver Mäuse überführt und die Proben entsprechend aufgearbeitet. Zur Bestätigung der Humanspezifität wurden 20 Blutproben tumorfreier Mäuse identisch prozessiert und ausgewertet.

3.11.1.3.1 Nachweis von epithelial-mesenchymalen Veränderungen auf CTCs

Die unter 3.11.1.3 beschriebene Methode zur Isolierung der RNA von zirkulierenden Tumorzellen wurde ebenfalls für die relative Quantifizierung der Genexpression angewendet. Hierfür wurden RNA-Proben unter Verwendung des Epithelial-Mesenchymal Transition PCR Arrays (SABiosciences) nach Herstellerangaben analysiert. Für die vergleichende relative Transkriptionsanalyse von adhärent wachsenden KPL-4 Zellen aus der Zellkultur mit CTCs aus entsprechenden Xenografts wurden zunächst 10 KPL-4 Zellen aus der Kultur in 500 µl naives Mausblut überführt („epitheliale Kontrollprobe“) und die Transkription der Gene in Bezug auf das *house-keeping-Gen* (*GAPDH*) ausgewertet (Δ CT). Diese Werte wurden in Relation zu entsprechend prozessierten Blutproben bzw. Δ CT-Werten von 5 xenotransplantierten Tieren mit Tumorgrößen von 150 mm² ausgewertet ($\Delta\Delta$ CT). Zur Kontrolle der Humanspezifität des Assays wurden 2 naive Mausblutproben identisch prozessiert. Für die Auswertung wurden ausschließlich die Gene gewählt, die keine Amplifikationssignale nach 36 Zyklen in Blutproben der naiven Versuchstiere aufwiesen.

3.11.1.4 CTC-Detektion über den Zytospin

Zum quantitativen Nachweis der CTCs unter Verwendung der Zytospinzentrifuge wurden zunächst die roten Blutzellen einer Probe unter Verwendung des RBC-Lysepuffers (Qiagen) lysiert, die PBMC / CTC Fraktion bei 450 g für 10 min pelletiert und anschließend 3 mal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechst für 5 min bei RT im Dunkeln. Für die Etablierung der Methode wurden 1 - 10.000 Zellen einer GFP-exprimierenden MDA-MB-231 Zelllinie in 200 µl Mausblut überführt und die Probe wie beschrieben aufgearbeitet. Die analytische Auswertung des Präparats erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Im Tiermodell wären CTCs anhand der Zellgröße, der Morphologie und der Expression von epithelzellspezifischen Markern wie EpCAM und CK-19 identifiziert worden.

3.11.1.5 CTC-Nachweis mittels EPISPOT (*Epithelial ImmunoSPOT*)

Mit Hilfe des EPISPOT-Verfahrens (Alix-Panabières *et al.* 2009) können vitale Tumorzellen aus Blutproben von Krebspatienten selektiert werden. Die Methode beruht auf dem Prinzip des ELISPOTs (*Enzyme Linked Immuno Spot Technique*) (Slota *et al.* 2011), wobei beim EPISPOT sezerniertes CK-19 (Zytokeratin-19) nachgewiesen wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die EPISPOT-Analyse zunächst eine Membran mit einem spezifischen α -CK-19-Antikörper (Tabelle 2.1) beschichtet und diese in eine 96-Wellplatte gestanzt. Nachfolgend wurden kernhaltige Zellen aus Blutproben über FICOLL-Gradientenzentrifugation angereichert und diese in Kulturmedium überführt. Anschließend wurde die Probe für 2 Tage in einem Inkubationsschrank auf der beschichteten Membran kultiviert. Nach weiteren Waschschritten und Zugabe des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers gegen CK-19 konnten lebende Zellen aufgrund der Zytokeratinabsonderung detektiert und ausgezählt werden, wobei die Zellen als sogenannte „Spots“ sichtbar wurden. Jeder „Spot“ entsprach demnach einer lebenden Tumorzelle, die in der Probe zu finden war.

Um die Sensitivität der Methode zu testen, wurden 500 Zellen der KPL-4 Zelllinie in 700 µl natives EDTA-Mausblut überführt und die Probe wie beschrieben aufgearbeitet. Als Positivkontrolle dienten 1×10^6 Zellen der KPL-4 Linie, während für die Negativkontrolle lediglich die Leukozytenpopulation aus nativem Mausblut verwendet wurde. Die Auszählung der „Spots“ erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Die Durchführung dieser Methode wurde gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Sabine Riethdorf am UKE in Hamburg Eppendorf durchgeführt.

3.11.1.6 CTC-Detektion über einen Nanodetektor (GILUPI GmbH)

Mit Hilfe eines α -EpCAM-beschichteten Katheters (Nanodetektor) der GILUPI GmbH aus Potsdam sollten CTCs aus Blutproben tumortragender Mäuse quantitativ in einem *in vitro*-Fließsystem gemessen werden. In der klinischen Situation wird der Nanodetektor, wie bei einer Blutentnahme, vorübergehend in eine entsprechende Vene eingeführt und nach 30 min wieder entnommen. Die α -EpCAM-Antikörper werden auf der Oberfläche des Drahtes kovalent an eine funktionalisierte Goldschicht gebunden und ermöglichen somit die Anreicherung epithelialer, EpCAM-positiver Zellen. Diese Zellen werden im weiteren Verlauf mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Zytokeratin sowie DAPI angefärbt und können anschließend ausgezählt werden. Falsch-positiv gebundene Leukozyten werden über α -CD45-Färbungen ausgeschlossen. Ein enormer Vorteil dieser Methode ist das große Blutvolumen, das am Detektor während der Inkubation vorbeifließt (ca. 130 l pro 30 min), während der AdnaTest und die CellSearch Methode auf 5 bzw. 7,5 ml Blut beschränkt sind.

Zur Etablierung der Methode wurden Zellen der KPL-4 Linie mit DAPI angefärbt und 10 - 1250 Zellen / ml Mausblut für 1 Stunde an einem Nanodetektor in einem *in vitro*-Fließsystem unter konstanten, laminaren Bedingungen vorbeigeführt (Abbildung 3.1). Als Positivkontrolle wurde der Draht in ein Eppendorfgefäß mit 1×10^6 Zellen der KPL-4 Linie gehalten und für 15 min unter Schwenken inkubiert. Als Negativkontrollen dienten 2 Blutproben naiver Mäuse, die entsprechend bearbeitet und untersucht wurden.

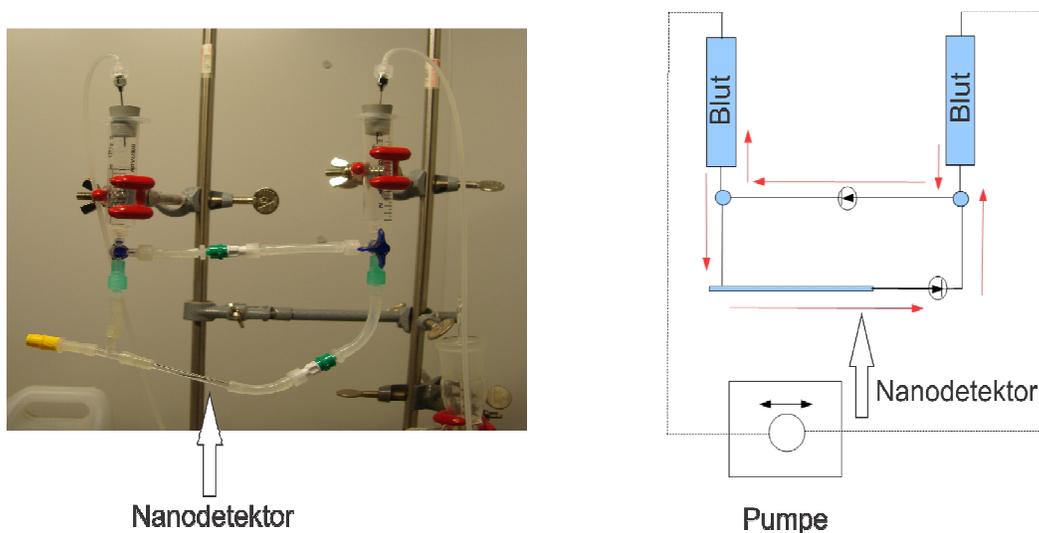


Abbildung 3.1 Graphische und schematische Darstellung des *in vitro*-Fließsystems. Blutproben wurden mit Tumorzellen angereichert, in eine Spritze gefüllt und über mechanisches Pumpen für 1 h an dem Nanodetektor (siehe Pfeil) vorbeigeführt.

3.11.1.7 Quantitative Bestimmung der CTCs über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen (qRT-PCR)

Ein weiterer quantitativer und antikörperunabhängiger Nachweis von humanen Tumorzellen erfolgte über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen mittels qRT-PCR. Für die Analyse wurden zunächst die Erythrozyten einer frischen Blutprobe (200 μ l) mit Hilfe des RBC-Lysepuffers (Qiagen) für 10 min bei 4°C lysiert und die verbleibende PBMC- / Tumorzellfraktion bei 450 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml sterilem PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen erneut pelletiert und in 200 μ l PBS aufgenommen. Daraufhin wurde die DNA der Probe unter Verwendung des DNeasy Mini Kits (Qiagen) isoliert und in einem Volumen von 150 μ l eluiert. Nach der Aufreinigung wurden 5 μ l des Eluats für die qRT-PCR eingesetzt und die Anzahl der CTCs anhand einer mitgeführten „Verdünnungsreihe“ der entsprechenden Zelllinie ermittelt. Zur Etablierung der Methode wurden 1 - 10.000 Zellen in naive Mausblutproben überführt und analysiert. Als Negativkontrolle dienten aufgereinigte DNA-Proben aus Blutpräparaten tumorfreier Mäuse sowie Nuklease freies Wasser.

3.11.2 Nachweis von zellfreien Nukleinsäuren

Der quantitative Nachweis zirkulierender Nukleinsäuren erfolgte über die Vervielfältigung humaner *Alu*-Sequenzen mittels qRT-PCR. Für die Etablierung der Methode wurde DNA aus Zellkulturproben isoliert und in definierter Konzentration (0,001 ng - 10 ng / μ l) einer naiven, murinen Plasmaprobe (200 μ l) zugeführt und die DNA wie unter **3.5** beschrieben aufgereinigt. Für den quantitativen Nachweis wurden 5 μ l des Eluats einem 25 μ l Gesamtansatz zugegeben (Primerkonzentration 0,5 μ M). Für die Amplifikation wurden folgende Bedingungen gewählt: nach 10 Minuten der Denaturierung bei 95°C folgten 40 Zyklen (95°C für 30 s, 60°C für 30 s und 72°C für 30 s) und ein finaler Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. Für die *in vivo*-Studien wurden Plasmaproben xenotransplantiertes und naiver Mäuse entsprechend aufgearbeitet und untersucht.

Bei der Untersuchung der Humanproben von gesunden Individuen und Krebspatienten wurde die DNA aus 50 μ l Plasma isoliert und für die quantitative Bestimmung eingesetzt. Für die Berechnung des Δ CT-Wertes wurde als Referenzwert der CT-Wert der Wasserkontrolle benutzt, wobei der CT-Wert der Humanprobe vom CT-Wert der Wasserprobe subtrahiert wurde.

3.12 Histologische Färbung proliferierender Zellen auf Tumorschnittpräparaten

Zum Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 auf Tumorpräparaten wurden FFPE-Proben MEK-behandelter und unbehandelter Tiere (**3.4.3**) zunächst mit Hilfe eines Microtoms (Thermo Scientific) geschnitten, auf einen Objektträger überführt und angetrocknet. Die Schnittpräparate wurden unter Verwendung von Xylol entparaffiniert und mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert. Die anschließende Demaskierung erfolgte bei 98°C für 40 min in einem Dampfkocher unter Verwendung des Demaskierungspuffers (pH-Wert: 6) der Firma Dako. Nach erfolgter Demaskierung wurde das Präparat mit 100 μ l Peroxidase-Block-Lösung (Dako) für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde zweimal mit 0.05 % Tween-20 in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers gegen den Proliferationsmarker Ki-67 für 90 min in der Feuchtkammer. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper bei RT für 60 min hinzugefügt. Im Anschluss wurde das Substrat der Peroxidase (DAB) für 10 min zugegeben, das Präparat gewaschen und unter Verwendung von Hämatoxylin die

Kerne angefärbt. Nachfolgend wurde wiederholt gewaschen und das Schnittpräparat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Das Eindecken der Probe erfolgte unter Verwendung des Permount Mounting Mediums (Fisher Scientific). Die Objektträger wurden am Mirax-Imaging System (Zeiss) unter Verwendung der Mirax-Viewer Software eingescannt.

3.13 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis humaner Zentromere auf Tumorschnittpräparaten

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) diente dem Nachweis humaner Zentromere an Tumorproben von FFPE-Schnittpräparaten xenotransplantierte Versuchstiere. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen nachzuweisen. Bei diesem Verfahren wird eine künstlich hergestellte fluoreszierende Sonde eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure hybridisiert. Zur Erfassung humaner Zentromere wurde die "All human centromers"-Sonde von Kreatech (KBI-20000) verwendet. Hierfür wurden FFPE-Präparate zunächst in Xylol entparaffinisiert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurde die Probe in 1 mM Citrat-Puffer (pH-Wert: 6) für 20 min im Dampfgarer gekocht. Nach 20 minütiger Kühlung bei RT wurde mit H₂O und 2 x SSC Puffer für 5 min gewaschen und das Präparat einer Proteasebehandlung unterzogen (15 min mit Pepsin von DCS Diagnostic, Hamburg). Nachfolgende Hybridisierungs- und Post-hybridisierungsschritte wurden nach Angaben des Sondenherstellers durchgeführt. Das fertige Präparat wurde zur langfristigen Aufbewahrung mit dem Vectashield anti-fade Reagenz eingedeckelt und zur Messung am Fluoreszenzmikroskop eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Zirkulierende Tumorzellen

In der klinischen Situation werden gegenwärtig noch verschiedene Verfahren zum Nachweis der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) getestet, wobei bisher kein „Goldstandard“ für den gesicherten Nachweis der gesamten CTC-Population etabliert werden konnte. Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit

1. verschiedene Methoden zum Nachweis der CTCs im präklinischen Modell *ex -* und *in vivo* miteinander verglichen werden, um die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Verfahren detailliert aufzeigen zu können.

2. Weiterhin sollte über die Persistenz oder das Verschwinden von CTCs der Erfolg einer Therapie im translationalen Ansatz aufgezeichnet werden.

3. Zusätzlich sollten molekulare Veränderungen der CTCs untersucht werden, um die Prozesse, die im Rahmen der Metastasierung stattfinden weiter aufzuschlüsseln.

4.1.1 Humane Tumorzellen lassen sich mit dem AdnaTest in Abhängigkeit der EpCAM-Expression nachweisen

In der klinischen Situation konnte unter Verwendung des AdnaTests (Schmitt und Foekens, 2009) bereits gezeigt werden, dass der Nachweis von CTCs im Blut von Tumorpatienten ein neuer Parameter zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und der Therapieoptimierung sein kann (Tewes *et al.*, 2004; Aktas *et al.*, 2010). Da die Wirkung von Arzneistoffen ebenfalls im präklinischen Modell über den Nachweis von CTCs untersucht werden sollte, wurde der AdnaTest im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet. Um die Sensitivität und die Spezifität des AdnaTests für nachfolgende Xenograftstudien zu testen, wurden 1 - 50 humane Brustkrebszellen der Linien MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 in 1 ml naives Mausblut überführt und die Probe wie unter **3.11.1.1** beschrieben prozessiert.

Der Zellenachweis über den AdnaTest zeigte eine äußerst hohe Sensitivität, wobei sich Zellen der MDA-MB-468 und der KPL-4 Linie *ex vivo* bereits auf Einzelzellebene nachweisen ließen. Die Detektionsgrenze für Zellen der MDA-MB-231 Linie lag indessen bei 10 Zellen / ml Mausblut (Abb. 4.1). Die Spezifität dieser Methode wurde

Ergebnisse

anhand der Negativkontrollen naiver Mausblutproben belegt, da in diesen Proben keine Transkriptionssignale zu erkennen waren.

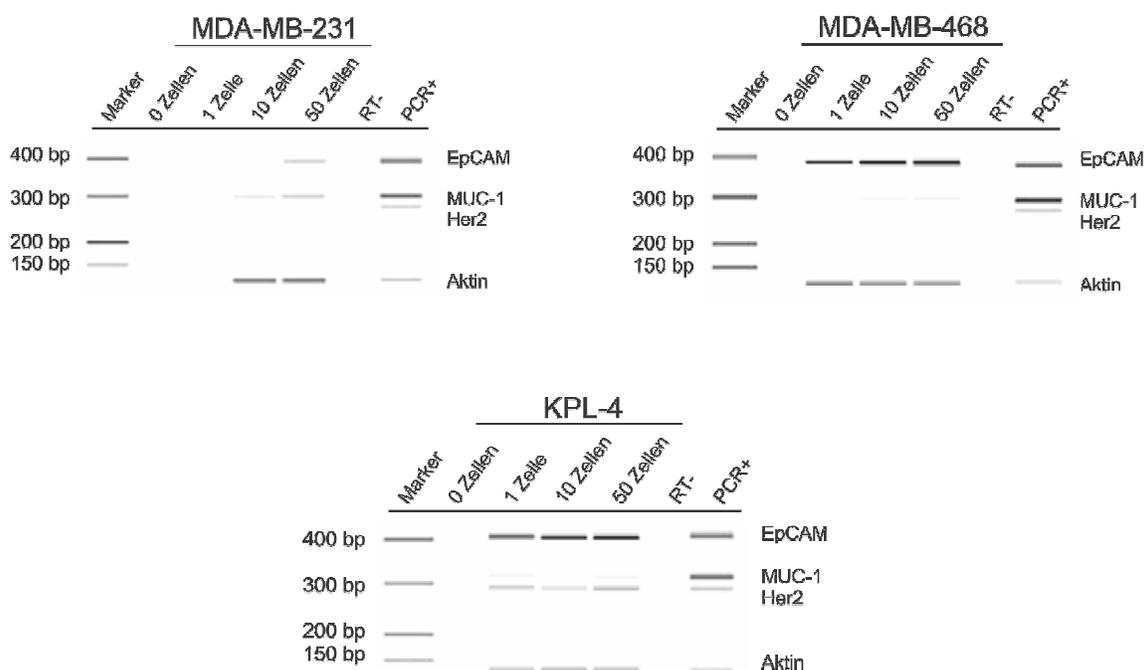


Abbildung 4.1 AdnaTest (ex vivo). Tumorzellen der Linien MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 wurden in naives Mausblut überführt und unter Verwendung des AdnaTests nachgewiesen. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des Agilent Systems mit DNA 1000 LabChips sichtbar gemacht. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Herstellerangaben der Firma AdnaGen bzw. Agilent Technologies.

Zur Klärung der Frage, weshalb Zellen verschiedener Linien mit ungleicher Sensitivität nachgewiesen werden konnten, wurden nachfolgend Proteinexpressionsstudien durchgeführt. Für die Analyse wurde die Expression von EpCAM und MUC-1 untersucht, da aktuelle Literaturhinweise die Relevanz der Markerexpression für die Effizienz antikörperbasierter Detektionsmethoden dokumentieren (Königsberg *et al.* 2011; Punnoose *et al.*, 2010). Anhand der Expressionsstudien konnte eine differentielle EpCAM-Expression der untersuchten Zelllinien aufgezeigt werden (Abb. 4.2 a - c), wobei Zellen der MDA-MB-231 Linie im Gegensatz zu Zellen der MDA-MB-468 und der KPL-4 Linie eine sehr schwache Expression des epithelialen Markers aufwiesen. Die Untersuchung der MUC-1-Expression zeigte bei allen drei Brustkrebszelllinien lediglich schwache Proteinsignale (Abb. 4.2 b).

Die Befunde belegten in Übereinstimmung mit den Resultaten von Königsberg und Punnoose *et al.* die Bedeutung der Markerauspression für antikörperabhängige Verfahren, wobei sich Zellen mit starker EpCAM-Expression unter Verwendung des AdnaTests deutlich sensitiver nachweisen ließen als Zellen mit geringer EpCAM-Expression.

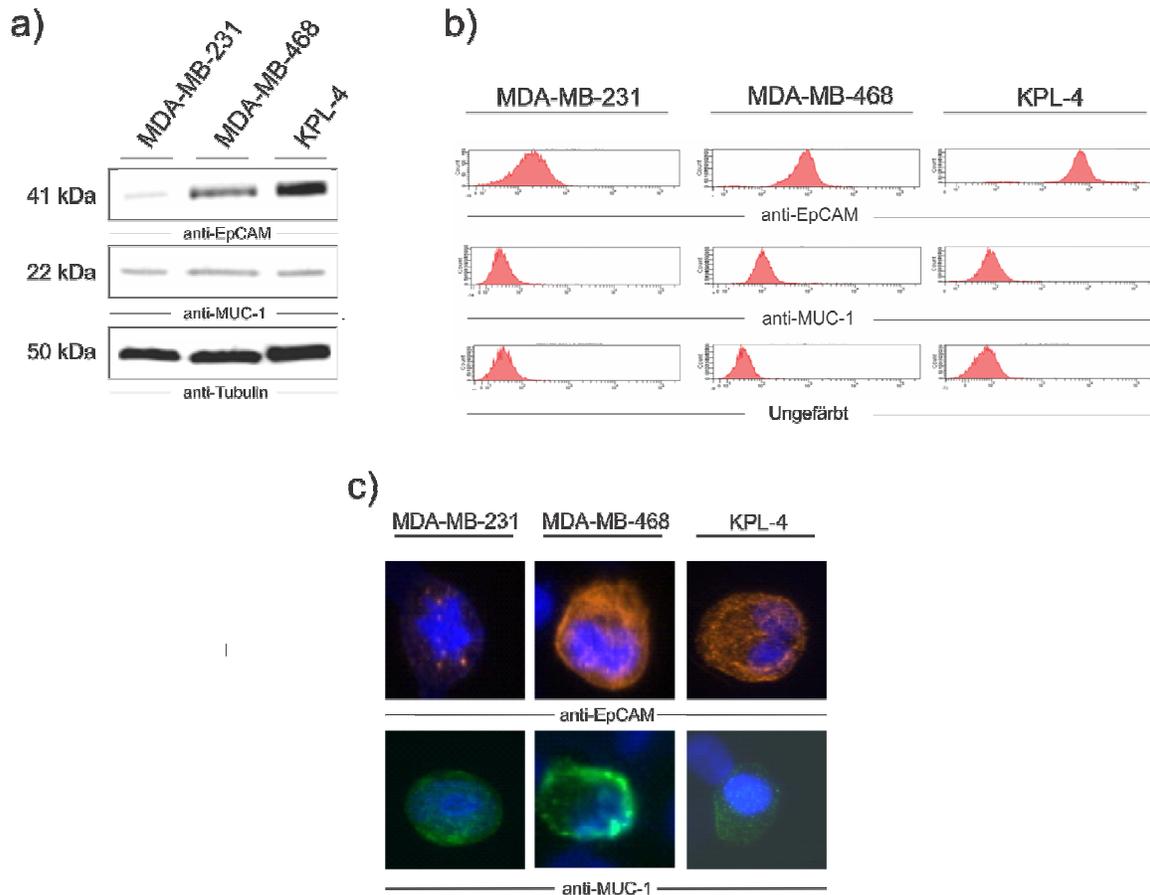


Abbildung 4.2 In vitro-Charakterisierung der Tumorzellen. Tumorzellen der Linien MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 wurden mittels Westernblot- und FACS-Analysen sowie immunzytochemischen Messungen auf die Expression von EpCAM und MUC-1 hin untersucht. Für die Westernblot-Analyse wurde Tubulin als Ladekontrolle mitgemessen (a). Ungefärbte Zellen der untersuchten Linien dienten bei den FACS-Messungen als Kompensationskontrollen (b). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte unter Verwendung des Hoechst-Farbstoffs (c).

4.1.2 Mit der CellSearch-Methode lassen sich *ex vivo* 350 von 500 Zellen (70 %) wiederfinden

Ausgehend von der FDA-Zulassung und der klinischen Bedeutung der CellSearch-Methode wurde diese Technik ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Effizienz des Verfahrens im Tiermodell zu testen. Im Vergleich zum AdnaTest können über diese Methode CTC-Zahlen exakt quantifiziert werden. Da eine Korrelation zwischen der Markerexpression und der Sensitivität antikörperabhängiger Methoden gezeigt werden konnte (Abb.4.1 und 4.2), wurde für diese Studien eine Zelllinie mit intensiver EpCAM-Expression eingesetzt (KPL-4). Im Rahmen des Vorversuches wurden 500 Zellen der KPL-4 Linie in naives Mausblut zugegeben und die Probe wie unter 3.11.1.2 beschrieben aufgearbeitet.

Von den 500 Ausgangszellen ließen sich *ex vivo* 350 Zellen (70 %) wiederfinden. Blutproben tumorfreier Mäuse zeigten hingegen keine Zellsignale (Abb. 4.3 oben). Der exemplarische Nachweis einer detektierten, EpCAM-positiven Tumorzelle der KPL-4 Linie ist der Abbildung 4.3 (unten) zu entnehmen, wobei die Tumorzelle über die Kern- (DAPI) bzw. Zytokeratin-Färbung nachgewiesen wurde.

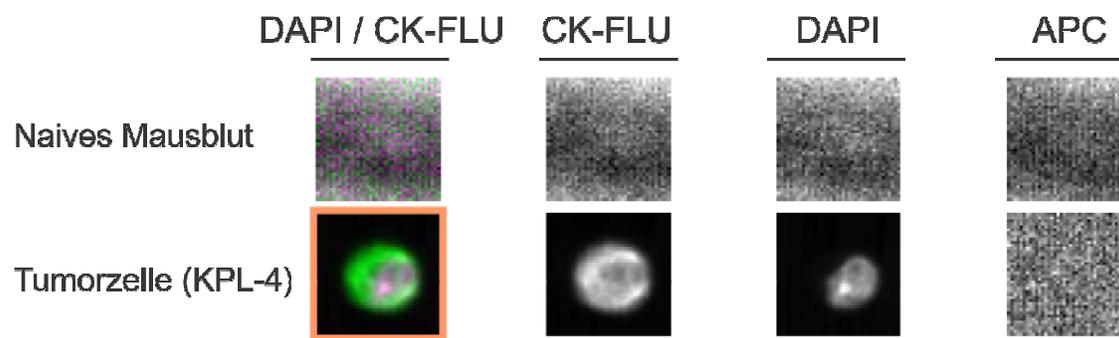


Abbildung 4.3 CellSearch (*ex vivo*). Tumorzellen der Linie KPL-4 wurden in naives Mausblut überführt und über das CELLCAPTURE CTC Mouse / Rat Kit von der Firma Veridex nach Angaben des Herstellers selektiert, fixiert und angefärbt. Nachfolgend wurden die Tumorzellen im CellTracks Analyzer II nach Anregung im DAPI- bzw. FITC-Kanal (Zytokeratin-Fluoreszenz, CK-FLU) anhand der Kernfärbung und der Zytokeratin-Expression detektiert (unten). Naives Mausblut wurde entsprechend aufgearbeitet und diente als Negativkontrolle (oben).

4.1.3 Humane Tumorzellen lassen sich auch ohne Antikörperanreicherung sensitiv im Blut der Mäuse nachweisen

Xenograftmodelle bieten den Vorteil, dass leicht zwischen „fremd“ und „eigen“ unterschieden werden kann. In Anbetracht dieser Tatsache sollten sich humane Tumorzellen bzw. deren Gentranskripte auch ohne vorige Anreicherung in murinen Blutproben nachweisen lassen. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden 2 - 10.000 Zellen der MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 Linie in naives Mausblut überführt und die Probe wie unter **3.11.1.3** beschrieben aufgearbeitet.

Über die qualitative PCR ließen sich humane Brustkrebszellen anhand von konstitutiv transkribierten Genen (*house-keeping*-Gene) reproduzierbar bereits ab 2 Zellen spezifisch nachweisen (MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4). Neben den *house-keeping*-Genen konnten Zellen der MDA-MB-231 Linie auch über die *Vimentin*-Transkription identifiziert werden, wobei die Nachweisgrenze ebenfalls bei 2 Zellen lag (Abb. 4.4). Das Intermediärfilament Vimentin kommt im Zytoplasma von Zellen mesenchymaler Herkunft vor und wurde als Marker für EMT-spezifische Prozesse untersucht. Brustkrebszellen der MDA-MB-231 Linie weisen einen epithelialen-mesenchymalen Geno- und Phänotyp auf, was die hohe Transkriptionsrate dieses Markers erklärt (Mendez *et al.*, 2010). Transkriptionssignale für dieses Gen waren bei Zellen der epithelspezifischen KPL-4 Linie selbst bei einer Konzentration von 10.000 Zellen / 100 µl Mausblut nicht zu beobachten, während Zellen der MDA-MB-468 Linie ab 1000 Zellen *Vimentin*-Signale zeigten. Die Analyse des *EpCAM*-Profils zeigte in Ergänzung zu den Proteinexpressionsstudien, dass sich Transkriptionssignale für dieses Gen früher abbilden ließen, wenn Proben mit EpCAM⁺-Zellen (MDA-MB-468 oder KPL-4) aufkonzentriert wurden.

Es konnte somit eindeutig bestätigt werden, dass sich humane CTCs im Tiermodell über den Unterschied zwischen „fremd“ und „eigen“ spezifisch darstellen lassen, da sich in naiven Mausblutproben, die entsprechend behandelt wurden keine Transkriptionssignale erkennen ließen.

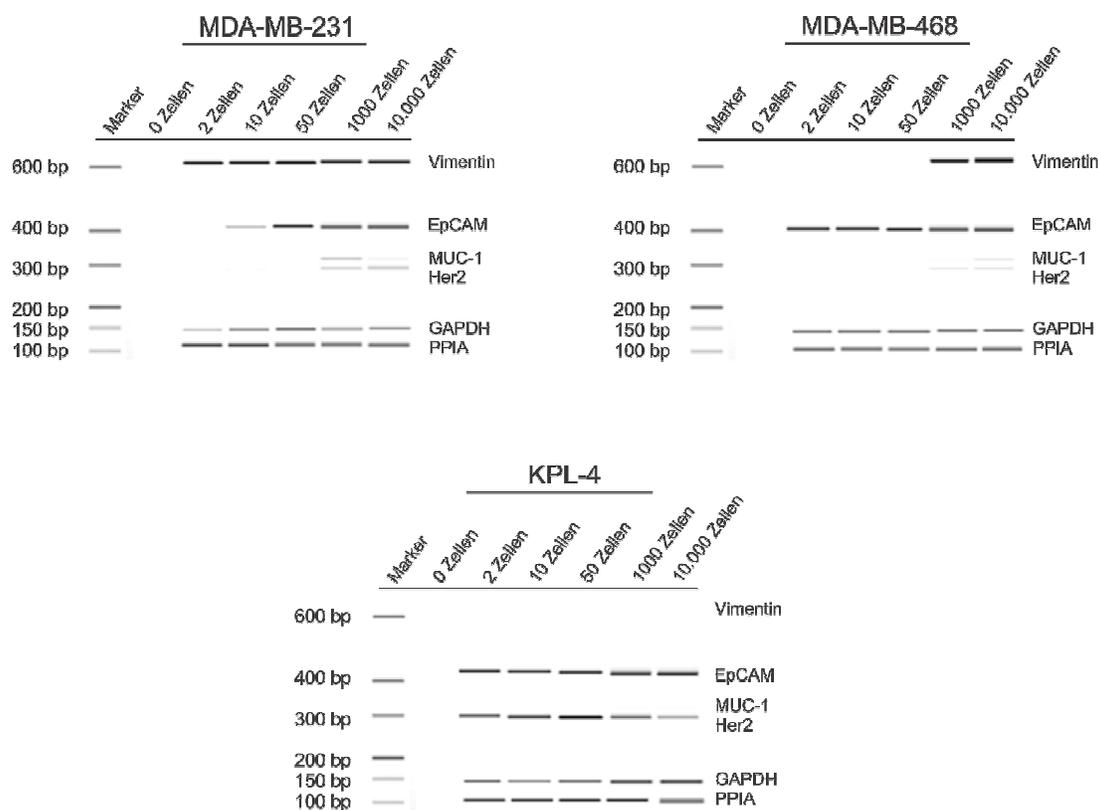


Abbildung 4.4 Antikörperunabhängiger Tumorzellnachweis (qualitative PCR). Tumorzellen der Linien MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4 wurden in naives Mausblut überführt und über die Amplifikation humaner Gentranskripte (*GAPDH*, *PPIA*, *EpCAM*, *MUC-1*, *Her2* und *Vimentin*) spezifisch nachgewiesen. Proben naiver Mäuse wurden als Negativkontrollen mitgemessen (0 Zellen).

4.1.4 Der Nachweis von vitalen Tumorzellen ist mit dem EPISPOT möglich

Alix-Panabieres und Kollegen konnten unter Verwendung des EPISPOTs in klinischen Proben bereits vitale CTCs im Blut von Krebspatienten nachweisen (Alix-Panabieres *et al.*, 2009). Vitale CTCs sind für die Verbreitung des Tumors unerlässlich (Fidler *et al.*, 2003). Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert werden, die lebensfähige CTCs im Blut der tumortragenden Versuchstiere detektieren kann. Zum Nachweis von vitalen Tumorzellen wurde der EPISPOT eingesetzt. Zur Testung der Sensitivität wurden 500 Zellen der KPL-4 Linie über eine Verdünnungsreihe gewonnen, in naives Mausblut überführt und die Probe prozessiert (siehe Material und Methoden **3.11.1.5**).

Über den EPISPOT ließen sich vitale Tumorzellen anhand der Zytokeratin-Sezernierung charakteristisch nachweisen, wobei allerdings nur 30 der 500 Ausgangszellen wiedergefunden werden konnten. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von lediglich 6 %. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse muriner Leukozyten (Negativkontrolle), die vergleichbar behandelt wurden, zeigten hingegen keine Fluoreszenzsignale, was die Spezifität der Methode belegte (Abb. 4.5 rechts). Obwohl nur geringe Zellzahlen unter Verwendung des EPISPOTs wiedergefunden werden konnten, wurde der Nachweis von CTCs über dieses Verfahren für anknüpfende *in vivo*-Studien weiter verfolgt.

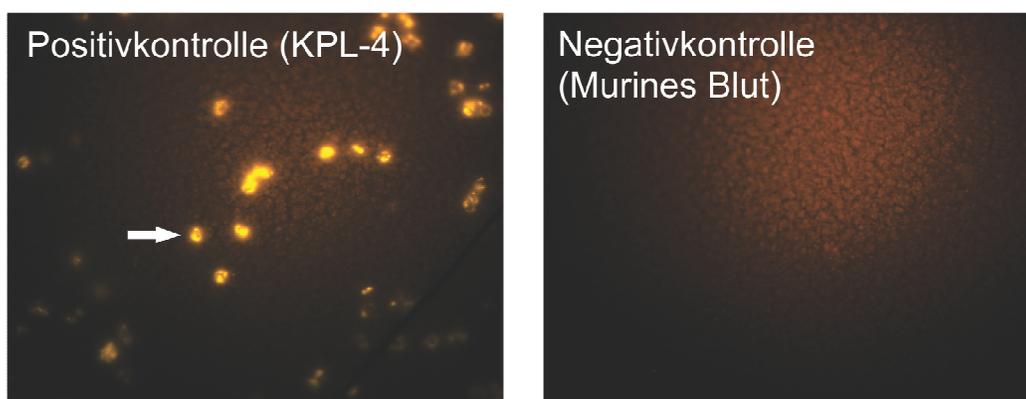


Abbildung 4.5 EPISPOT (*ex vivo*). Tumorzellen der Linie KPL-4 wurden in murine Blutproben überführt, mittels FICOLL-Dichtegradientenzentrifugation angereichert und nachfolgend anhand der Zytokeratin-Sezernierung unter Verwendung des EPISPOTs detektiert. Lebende Zellen wurden als sogenannter *Spot* sichtbar (Positivkontrolle, siehe Pfeil). Blutproben eines naiver Tiere dienten als Negativkontrolle (rechts).

4.1.5 Der Nanodetektor zeigt im Fließsystem eine geringe Sensitivität

Über den AdnaTest, die CellSearch-Methode oder den EPISPOT werden CTCs in definierten Blutvolumen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wird der Nanodetektor der GILUPI GmbH in der klinischen Situation wie bei der Applikation eines Katheters vorübergehend in eine Vene eingeführt und nach 30 min wieder entnommen (siehe Material und Methoden **3.11.1.6**). Im menschlichen System konnte dem Nanodetektor im Vergleich zur CellSearch-Methode bereits eine höhere Sensitivität zugeschrieben werden (unveröffentlichte Daten). Daher wurde diese Technik ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Um die Funktionalität dieses Prinzips *ex vivo* testen zu können wurden humane Brustkrebszellen in murine Blutproben überführt und in einem *in vitro*-Fließsystem untersucht (siehe Abb. 3.1). Die Verwendung des Fließsystems war erforderlich, weil der Nanodetektor aufgrund der Größe und der Mobilität der Xenografts *in vivo* nicht appliziert werden konnte.

Zur Testung der Empfindlichkeit wurden zunächst 10 - 1250 Zellen der KPL-4 Linie in Mausblut überführt und die Proben nachfolgend im Fließsystem inkubiert. In Ergänzung dazu wurden Positiv- und Negativkontrollen wie unter **3.11.1.6** beschrieben mitgeführt, um die Spezifität des Detektors zu gewährleisten. Die Kontrollen belegten die Funktionalität des Detektors (Abb. 4.6a). Allerdings ließen sich nach der Inkubation im Fließsystem keine Brustkrebszellen am „einfachen“ Draht (Nanodetektor) nachweisen (nicht dargestellt). Die PCR-basierte Analyse des Blutprobenüberstands zeigte, dass sich die Tumorzellen weiterhin im Überstand der Probe befanden (Abb. 4.6b). Daher wurde in einem nachfolgenden Versuchsansatz die Detektoroberfläche vergrößert, um die Sensitivität des Drahtes zu steigern. Dies wurde über die Spiralisierung von drei Drähten, die ineinander gewunden wurden, erreicht („spiralisierter“ Draht). Nach der Oberflächenvergrößerung konnten erfolgreich Zellen am funktionellen Draht ausgezählt werden. Allerdings lag die Wiederfindungsrate nur zwischen 0,2 und 0,8 %. Obwohl mit ansteigender Zellzahl mehr positive Zellereignisse am Draht sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 4.6c), wurde ein Nachweis von CTCs über den Nanodetektor im Fließsystem aufgrund der geringen Sensitivität für die *in vivo*-Studien ausgeschlossen.

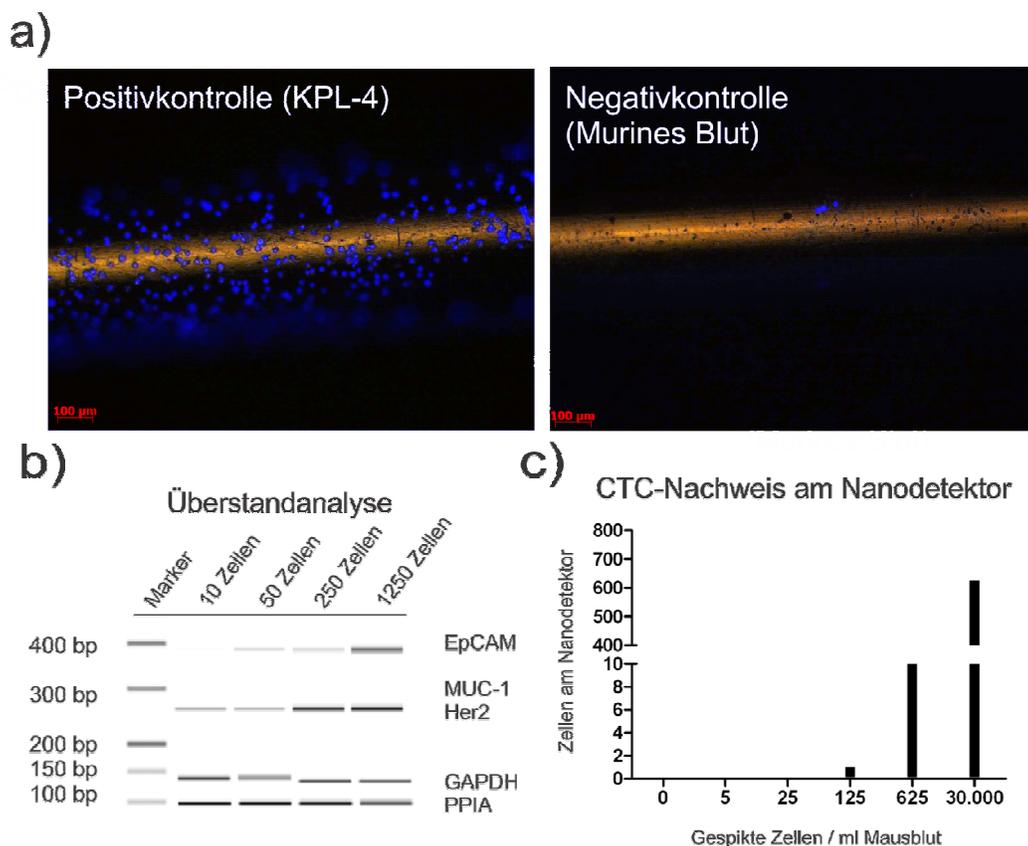


Abbildung 4.6 Nanodetektor (ex vivo). Tumorzellnachweis von Zellen der KPL-4 Linie über den Nanodetektor (Positivkontrolle). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI. Murine Blutproben wurden als Negativkontrolle mitgeführt (a). Tumorzellen der „Spikeprobe“, die während der Inkubation im Fließsystem nicht an den Draht gebunden haben, konnten nachfolgend über die Amplifikation humanspezifischer Gentranskripte im Überstand detektiert werden (b). Wiederfindungszahlen von überführten Tumorzellen unter Verwendung des „spiralisierten“ Nanodetektors (c).

4.1.6 Der Nachweis von Tumorzellen über den Zytospin weist einen hohen Zellverlust auf

Neben der qualitativen PCR oder dem EPISPOT ließen sich Tumorzellen *ex vivo* markerunabhängig auch nach einer Zytospinzentrifugation detektieren. Für die Etablierung wurden 1 - 10.000 Zellen einer GFP-exprimierenden MDA-MB-231 Linie wie unter 3.11.1.4 beschrieben behandelt und nachfolgend über die Zellgröße, die Morphologie und die GFP-Fluoreszenz detektiert. Eindeutige Zellsignale konnten erst ab 1000 Zellen ausgemacht werden (Abb. 4.7). Möglicherweise führten die Waschschriffe des Zellpellets nach der Erythrozytenlyse zu Zellverlusten bei Proben mit geringeren Tumorzellzahlen.

Dies war anzunehmen da der Einfluss von Waschschritten auf die Detektionsrate von CTCs bereits von Flores und Kollegen beschrieben wurde (Flores *et al.*, 2009). Aufgrund der wenigen Tumorzellzahlen, die in der klinischen Situation im Blut der Patienten gefunden werden, ist nicht davon auszugehen, dass sich viele CTCs im Blut von Xenografts erwarten lassen. Daher wurde ein Nachweis von CTCs über den Zytospin für weitere *in vivo*-Studien ausgeschlossen.

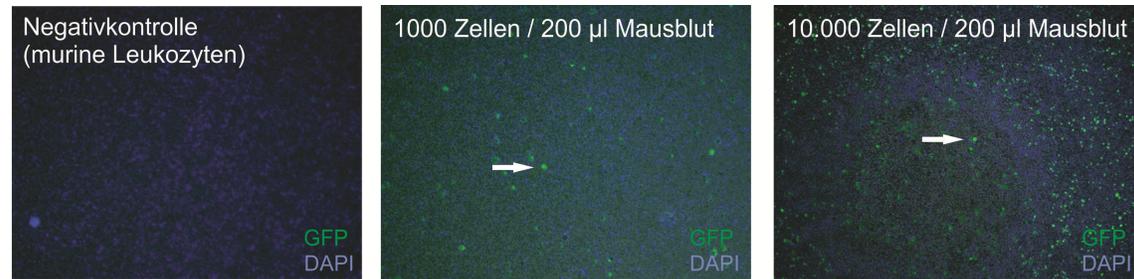


Abbildung 4.7. Zytospin (*ex vivo*). GFP-exprimierende Tumorzellen der MDA-MB-231 Linie wurden in naives Mausblut überführt und nach der RBC-Lyse mittels Hoechst angefärbt und unter Verwendung der Zytospinzentrifuge auf einen Objektträger gebracht. Der Nachweis der Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (siehe Pfeil).

4.1.7 Über die quantitative Bestimmung humaner *Alu*-Sequenzen gehen Tumorzellen auf Einzelzellebene verloren

Neben einer qualitativen Auflösung bietet die PCR zusätzlich die Möglichkeit, humane Tumorzellen im Tiermodell quantitativ zu erfassen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit über die Vervielfältigung humaner *Alu*-Sequenzen erreicht. Für die Etablierung des Verfahrens wurden 1 - 10.000 Zellen der MDA-MB-231, MDA-MB-231-SA und der KPL-4 Linien in Mausblut überführt und die Probe wie unter 3.11.1.7 beschrieben prozessiert. In etwa 60 % der Vorversuche (5 / 8) ließen sich humane Zellen bereits auf Einzelzellebene spezifisch nachweisen. Der Verlust von einzelnen Tumorzellen ist möglicherweise ebenfalls auf die Waschschriffe zurückzuführen, die vor der DNA-Aufarbeitung laut Protokoll durchgeführt werden mussten. Obwohl demnach vereinzelt Tumorzellen verloren gingen, konnte über die qRT-PCR ein Verfahren etabliert werden, dass spezifisch und markerunabhängig humane Tumorzellen im Blut der Versuchstiere sensitiv quantifizieren kann. Die exemplarische Darstellung eines erfolgreichen „Spike-Experiments“ ist der Abbildung 4.8 zu entnehmen.

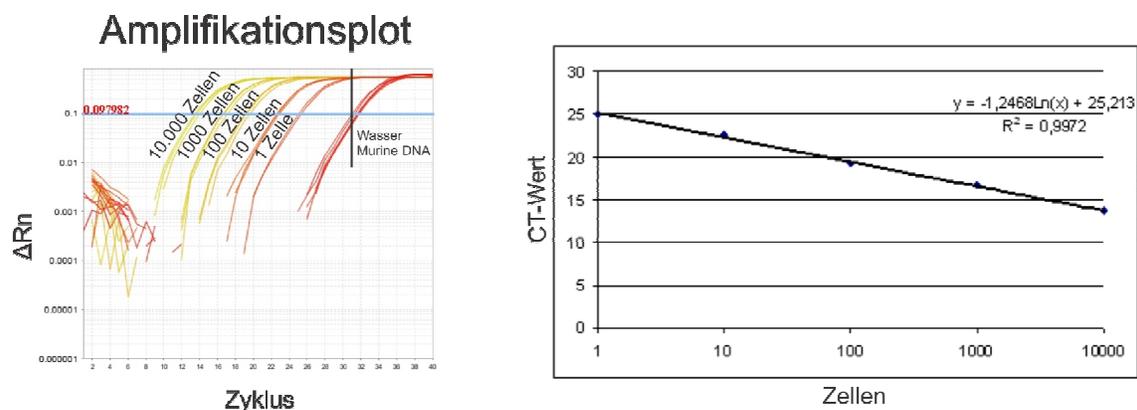


Abbildung 4.8 Antikörperunabhängiger Tumorzellnachweis (qRT-PCR). Tumorzellen wurden in naives Mausblut überführt und über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen quantifiziert. Schematische Darstellung des Anstiegs der Fluoreszenzstrahlung (ΔRn) nach erfolgter qRT-PCR. Für die qRT-PCR-Reaktion wurde das QuantiTec SYBR Green PCR-Kit verwendet. Die Messung erfolgte am Real-Time PCR-System (7500 Fast) in Triplikaten (links). Graphische Darstellung einer Regressionsgeraden (rechts), bei der die ermittelten CT-Werte gegen die Anzahl an gespickten Tumorzellen gegenübergestellt wurden ($R^2 = 0,9972$). Die Regressionsgleichung wurde unter Verwendung von Excel berechnet.

Zusammengefasst zeigten die *ex vivo*-Studien, dass sich humane Tumorzellen über die antikörperbasierten Methoden (AdnaTest und CellSearch), die qualitative Amplifikation humaner Gentranskripte und die quantitative Bestimmung humaner *Alu*-Sequenzen extrem sensitiv im Blut von tumorfreien Mäusen nachweisen ließen. Im Gegensatz dazu konnte der spiralisierte Nanodetektor im Fließsystem lediglich geringe Zellzahlen wiederfinden, weshalb dieser für nachfolgende *in vivo*-Studien ausgeschlossen wurde. Ein markerunabhängiger Tumorzellverlust war auch unter Verwendung des Zytospins oder dem EPISPOT nicht zu vermeiden, was möglicherweise auf die wiederholten Waschschrte bzw. die FICOLL-Anreicherung zurückzuführen ist. Über den EPISPOT konnte allerdings ein Nachweis von vitalen Tumorzellen verfolgt werden, weshalb dieser Ansatz für nachfolgende *in vivo*-Studien weiterhin genutzt wurde. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *ex vivo*-Studien ist der Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der durchgeführten Detektionsmethoden zum Nachweis der CTCs (*ex vivo*)

Methode	Prinzip der CTC-Anreicherung	Identifizierung und Charakterisierung der CTCs	Wiederfindungsrate
AdnaTest	EpCAM und MUC-1	Molekulare Analyse der Gentranskripte: <i>EpCAM</i> , <i>MUC-1</i> , <i>Her2</i> und <i>Aktin</i>	1 Zelle / ml (in Abhängigkeit der EpCAM-Expression)
CellSearch	EpCAM	Anfärbung von Zytokeratinen und DAPI	350 von 500 Zellen / 100 µl
Qualitative PCR	Erythrozytenlyse	Amplifikation humaner Gentranskripte: <i>GAPDH</i> , <i>PPIA</i> , <i>EpCAM</i> , <i>MUC-1</i> , <i>Her2</i> und <i>Vimentin</i>	2 Zellen / 100 µl (in Abhängigkeit des Gentranskripts)
Quantitative RT-PCR	Erythrozytenlyse	Quantitative Amplifikation humaner <i>Alu</i> -Sequenzen	1 Zelle / 200 µl
EPI SPOT	FICOLL-Gradientenzentrifugation	Nachweis von vitalen CTCs über die CK-19-Sekretion	30 von 500 Zellen / 700 µl
Nanodetektor (einfach)	EpCAM (im Fließsystem)	Anfärbung von Zytokeratinen und DAPI	0
Nanodetektor (spiralisiert)	EpCAM (im Fließsystem)	Anfärbung von Zytokeratinen und DAPI	1 von 125, 10 von 625, 69 von 30.000 Zellen / ml
Zytospin	Erythrozytenlyse	Nachweis der CTCs über die GFP-Expression und DAPI	ab 1000 Zellen / 200 µl

4.2 Nachweisstudien von CTCs in murinen Xenografts (*in vivo*)

4.2.1 CTCs lassen sich über epitheliale Marker *in vivo* nicht anreichern

Über den AdnaTest oder die CellSearch-Methode konnten epitheliale Brustkrebszellen *ex vivo* sensitiv und spezifisch im Blut detektiert werden. Daher wurde der Nachweis von CTCs *in vivo* zunächst unter Verwendung dieser Methoden untersucht. Es wurden Blutproben von subkutanen (MCF-7 und MDA-MB-231) und orthotopen Brustkrebsmodellen (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, KPL-4) auf CTCs analysiert. Um die Wahrscheinlichkeit der Zellmigration zu erhöhen wurden auch subkutane und orthotope Tumoren parallel in eine Gruppe der Versuchstiere gesetzt (MDA-MB-231). Insgesamt wurden 105 Blutproben von Versuchstieren mit

Tumorgrößen zwischen 20 - 200 mm² auf humane CTCs untersucht. Eine Gesamtübersicht der durchgeführten Versuche ist der Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Tabelle 4.2 Gesamtübersicht der durchgeführten *in vivo*-Versuche zum Nachweis humaner CTCs unter Verwendung der antikörperabhängigen Methoden (AdnaTest und CellSearch).

Modell (Tierzahl)	Applikationsort (Zellzahl)	Tumorgröße (mm ²)	Blutentnahme	CTC-Methode (CTC-Status)
MCF-7 (n = 9)	Subkutan (1 x 10 ⁶)	100	<i>Vena jugularis externa</i>	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-231 (n = 8)	Subkutan (1 x 10 ⁵)	100	<i>Vena cava inferior</i>	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-231 (n = 5)	Subkutan und orthotop (1 x 10 ⁶)	100	<i>Vena cava inferior</i>	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-231 (n = 8)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	50 - 200	Herzpunktion	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-231-SA (n = 8)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	100	Herzpunktion	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-453 (n = 4)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	50	<i>Vena cava inferior</i>	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-468 (n = 8)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	30 - 60	<i>Vena cava inferior</i>	AdnaTest (negativ)
MDA-MB-468 (n = 4)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	50	Herzpunktion	AdnaTest (negativ)
KPL-4 (n = 42)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	20 - 200	Herzpunktion / <i>Vena cava inferior</i>	AdnaTest (negativ)
KPL-4 (n = 9)	Orthotop (1 x 10 ⁶)	50 - 150	Herzpunktion	CellSearch (negativ)

Alle tumortragenden Versuchstiere zeigten nach erfolgter Zellapplikation ein stetiges Tumorwachstum und eine intensive Neovaskularisierung der Tumore (Abb. 4.9). Obwohl bisher keine Korrelation zwischen der Tumorgröße und der CTC-Zahl dokumentiert werden konnte (Budd *et al.*, 2006), wären CTC-Signale im Blut der Tiere aufgrund der enormen Tumormasse zu erwarten gewesen. Erstaunlicherweise ließen sich jedoch keine CTCs im Blut der Xenografts detektieren, obwohl über den AdnaTest Tumorzellen *ex vivo* bereits auf Einzelzellebene nachgewiesen werden konnten.



Abbildung 4.9 Exemplarisch fotografierte Versuchstiere bei denen eine Vaskularisierung des Primärtumors zu erkennen ist. Maus 1: Ventralansicht eines Versuchstiers 18 Tage nach Tumorzellinjektion mit 1×10^6 Zellen der MDA-MB-231 Linie. Maus 2: Ventralansicht eines präparierten Versuchstiers 30 Tage nach Tumorzellapplikation mit 1×10^6 Zellen der KPL-4 Linie. Zu erkennen ist eine deutliche Neovaskularisierung der Primärtumore (siehe Pfeil).

Für die negativen Befunde der Blutproben waren weder die Tumorgöße, die verwendete Zelllinie, der Applikationsort oder die Lokalität der Blutentnahme entscheidend. Obwohl die gesamten Blutproben negativ für CTCs waren, konnte die Metastasierung der Tumorzellen anhand von molekularbiologischen Analysen der Organe beobachtet werden. Es war zu erkennen, dass zunächst der regionäre Wächterlymphknoten (*sentinel lymphnode*) des Primärtumors befallen wurde und mit zunehmender Tumorgöße Metastasen in der Lunge und der Leber bzw. weiter entfernten Lymphknoten auszumachen waren. Eine solche Kinetik der Metastasierung wird häufig auch in der klinischen Situation beobachtet, was die biologische Vergleichbarkeit der etablierten Tiermodelle belegt. Repräsentative Befunde für den Nachweis der Tumorstreuung sowie Resultate der AdnaTest-Auswertung sind der Abbildung 4.10 zu entnehmen.

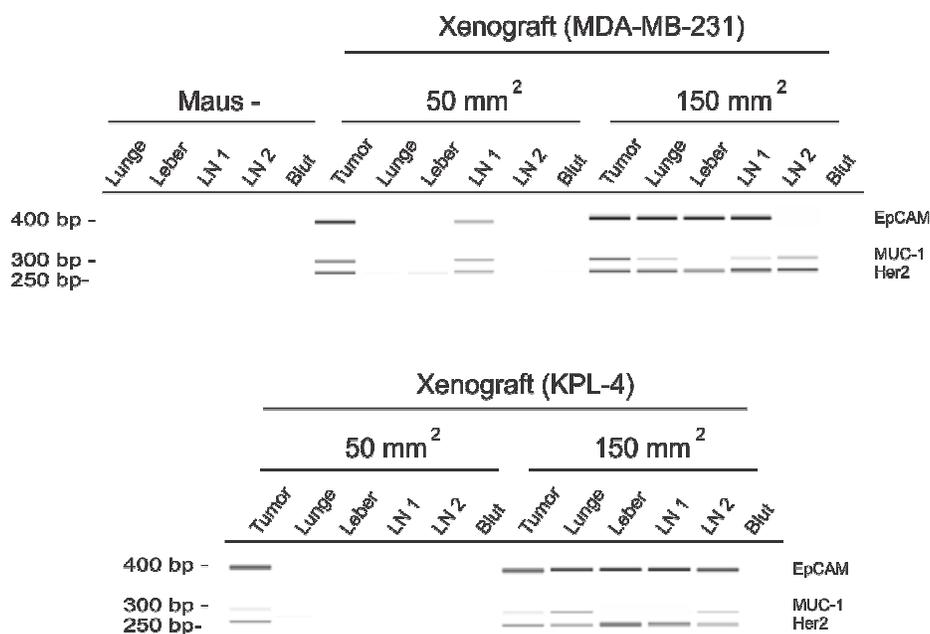


Abbildung 4.10 Organ- und Blutanalysen von tumorfreien Mäusen und tumortragenden Versuchstieren. Tumor- und Organproben wurden auf die Expression humaner Marker (*EpCAM*, *MUC-1* und *Her2*) untersucht. Ergänzend wurden Blutproben unter Verwendung des AdnaTests auf CTCs analysiert. Proben naiver Tiere dienten als Negativkontrolle (Maus -)

Erstaunlicherweise konnte in manchen Metastasen eine veränderte Genexpression im Vergleich zum Primärtumor beobachtet werden, wobei die *EpCAM*- und besonders die *MUC-1*-Transkription betroffen war (Abb. 4.10 und 4.11). Da *ex vivo* die Expression dieser Marker als essentielle Basis für den Nachweis der CTCs über antikörperabhängige Verfahren identifiziert wurde, ist naheliegend, dass der Verlust dieser Marker die Detektion von CTCs über den AdnaTest oder das CellSearch-Verfahren beeinflusst.

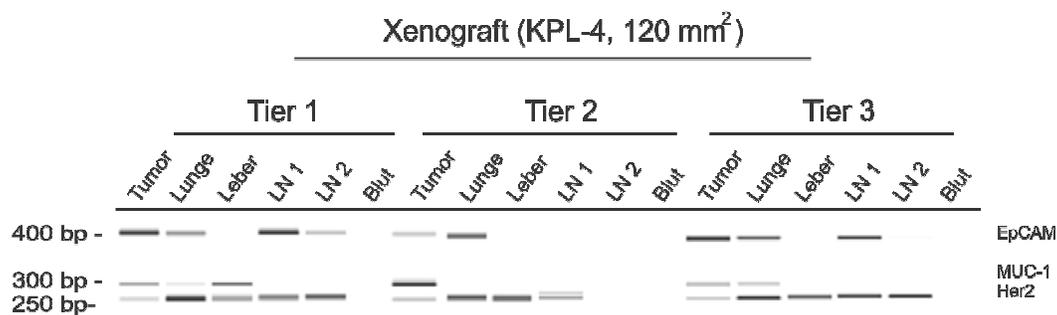


Abbildung 4.11 Expressionsveränderungen zwischen Primärtumor und Organproben xenotransplanteder Versuchstiere. Tumor- und Organproben wurden auf die Expression der humanen Marker *EpCAM*, *MUC-1* und *Her2* untersucht. Ergänzend wurden Blutproben unter Verwendung des AdnaTests auf CTCs analysiert.

Die Resultate der Profilanalysen wiesen auf EMT-ähnliche Prozesse hin, die bereits im Rahmen der Embryonalentwicklung beschrieben wurden (Lee *et al.*, 2006). Bei der epithelialen-mesenchymalen Transition können Epithelzellen ihre spezifischen Eigenschaften verlieren, wobei epitheliale Marker wie z.B. *EpCAM* oder *E-Cadherin* herunterreguliert werden (Krantz *et al.*, 2011). Ausgehend von diesen Veränderungen können die Zellen im Organismus migrieren und die Basalmembran passieren. Neben der Reduzierung von epithelialen Markern wird bei diesem Prozess im Gegenzug eine verstärkte Regulation von mesenchymalen Markern wie z.B. *Vimentin*, *EGFR* oder *Twist* auf den mobilen Zellen induziert (Lo *et al.*, 2007).

Genotypische Modifikationen der Tumorzellen konnten im Verlauf der Metastasierung im Gewebe beobachtet werden (Abbildung 4.10 und 4.11), wobei sich aktuell auch Literaturhinweise für EMT-ähnliche Veränderungen auf CTCs finden lassen (Armstrong *et al.*, 2011; Kallergi *et al.*, 2011). Aufgrund der Veränderungen im Genexpressionsprofil von unter anderem solchen Gentranskripten, die für den AdnaTest oder die CellSearch-Methode essentiell sind, wurden nachfolgend markerunabhängige Verfahren zum Nachweis der CTCs im Tiermodell angewendet.

4.2.2 CTCs zeigen den Verlust von *EpCAM*, *MUC-1* und *Her2*

Um zu überprüfen, ob EMT-assoziierte Prozesse die Effizienz der antikörperbasierten CTC-Nachweismethoden einschränken wurden Blutproben tumortragender Versuchstiere (MDA-MB-231, MDA-MB-468 und KPL-4) über markerunabhängige Techniken untersucht.

Über die qualitative PCR ließen sich CTCs über die Transkription der humanen *house-keeping*-Gene bereits ab einer Tumorgröße von 50 mm² im Blut der Xenografts nachweisen. CTCs zeigten im Vergleich zum Primärtumor und adhärent wachsenden Zellen aus der Zellkultur keine Signale für *EpCAM* bzw. *MUC-1*, was die negativen Befunde der antikörperabhängigen Methoden begründen kann. Interessanterweise blieb der mesenchymale Marker *Vimentin* auf zirkulierenden Zellen im MDA-MB-231-Modell weitestgehend stabil transkribiert oder wurde auf Tumorzellen im Blut der Xenografts im Verlauf der Zellwanderung sogar heraufreguliert (KPL-4-Modell). Repräsentative Tumorwachstumskurven und Resultate der Blutanalysen sind der Abbildung 4.12 zu entnehmen.

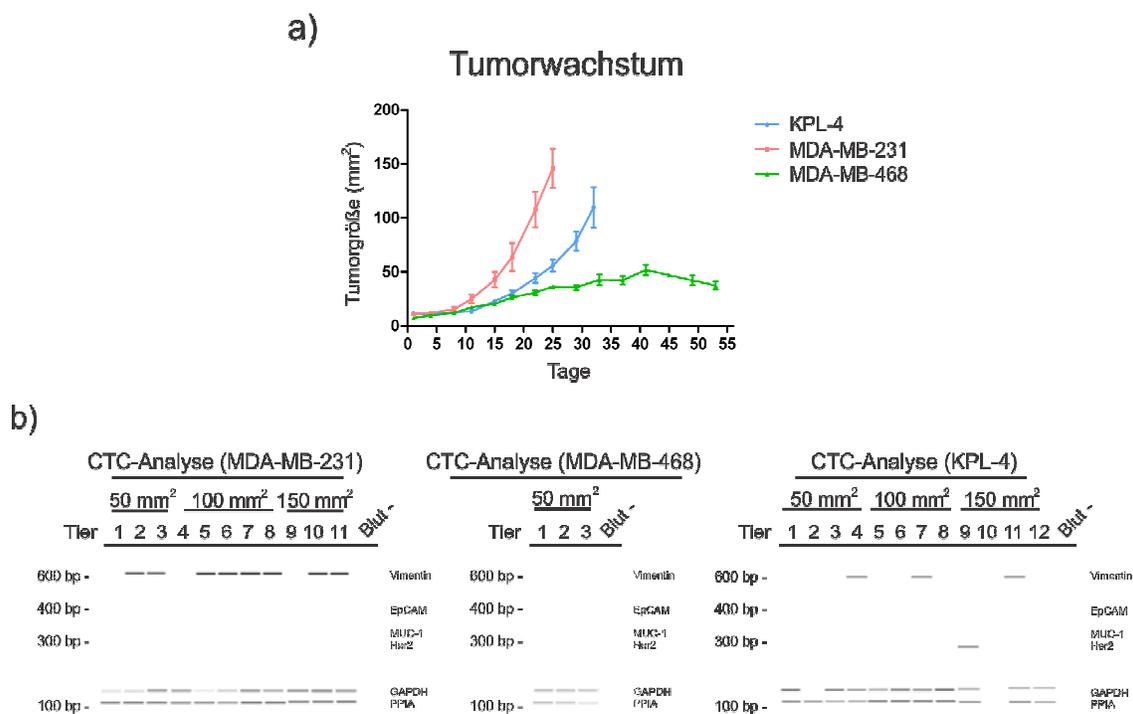
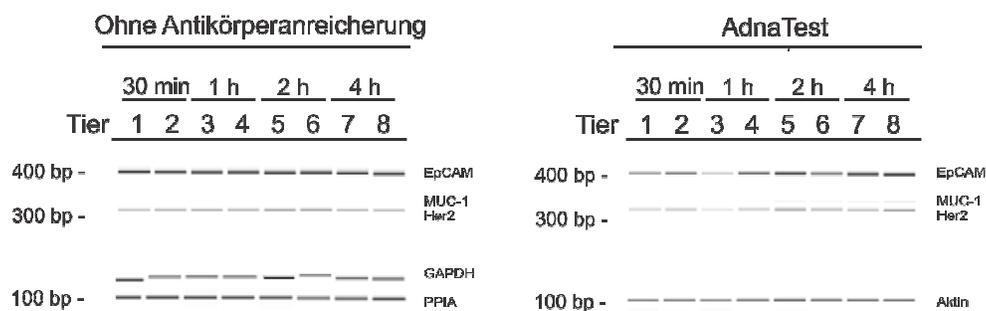


Abbildung 4.12 Tumorwachstumskurven und antikörperunabhängige CTC-Blutanalysen. Xenografts, die mit Zellen der MDA-MB-231 Linie appliziert wurden, zeigten nach der Injektion ein aggressives Tumorwachstum, während bei Versuchstieren mit Zellen der MDA-MB-468 Linie lediglich Tumorgrößen bis 50 mm² ausgemacht werden konnten (a). CTC-Blutanalysen der tumortragenden Tiere über die qualitative PCR-Methode. Zur Kontrolle der Spezifität wurden Blutproben naiver Tiere mit untersucht (Blut -) (b).

Um die Dynamik der phänotypischen Veränderungen mobiler Tumorzellen eindeutiger charakterisieren zu können, wurden 1×10^5 Zellen der KPL-4 Linie in die Schwanzvene naiver Versuchstiere injiziert und Blutproben unter Verwendung des AdnaTests bzw. der markerunabhängigen PCR-Methoden 30 min, 1 h, 2 h und 4 h nach der Zellapplikation analysiert. Zur Kontrolle der Stabilität der Markereexpression wurden 10 Zellen der KPL-4 Linie in 1 ml bzw. 100 μ l natives Blut überführt und die Proben entsprechend der oben aufgeführten Zeitpunkte aufgearbeitet und ausgewertet. *Ex vivo* ließen sich die Zellen über den AdnaTest und die qualitative PCR zu jedem Zeitpunkt nachweisen, was für eine stabile *EpCAM*-Transkription und *EpCAM*-Expression sprach (Abb. 4.13 oben). Nach der intravenösen Tumorzellapplikation konnten jedoch lediglich über die qualitative PCR Tumorzellen im Blut der Tiere nachgewiesen werden, was auf einen überraschend schnellen Verlust der *EpCAM*-Expression auf mobilen Zellen hindeutete. Der Verlust des Oberflächenproteins wurde deutlich, als die zirkulierenden Zellzahlen quantitativ ermittelt wurden. Über den Nachweis humaner *Alu*-Sequenzen ließen sich nach der i.v. Applikation zu jedem Zeitpunkt zwischen 5 und 25 Zellen der KPL-4 Linie in der Zirkulation detektieren (nicht dargestellt). Diese Zellzahlen sind ausgehend von den Ergebnissen der *ex vivo*-Studien für den Nachweis über den AdnaTest ausreichend (Detektionslimit: 1 Zelle / ml). Neben der kurzen Halbwertszeit der brustkrebspezifischen Proteine zeigten die Resultate der qualitativen PCR ergänzend, dass die *EpCAM*-Transkription bei Zellen, die sich in der Zirkulation befanden, ebenfalls bereits 30 min nach Tumorzellapplikation reduziert wurde (Abb. 4.13 unten). Zusätzlich konnte bei den CTCs ein Verlust von *Her2* beobachtet werden, was auch bei Xenografts mit soliden Tumoren zu beobachten war (Abb. 4.12).

10 Zellen der KPL-4 Linie (*ex vivo*)



100.000 Zellen der KPL-4 Linie (*in vivo*)

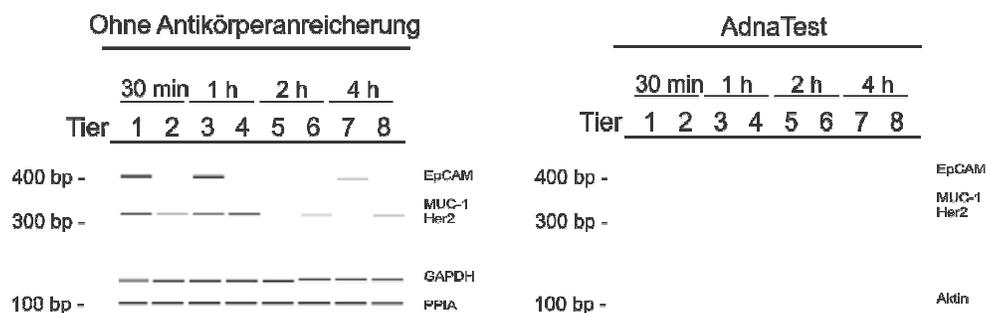


Abbildung 4.13 Zeitabhängiger Nachweis von Tumorzellen *ex vivo* und nach i.v. Applikation. Tumorzellen der KPL-4 Linie wurden in naives Mausblut überführt und über die Amplifikation humaner Gentranskripte oder den AdnaTest *ex vivo* nachgewiesen (oben). Tumorzellnachweis über die Amplifikation humaner Gentranskripte oder den AdnaTest nach i.v. Applikation (unten).

Während die Transkription des epithelialen Markers *EpCAM* auf mobilen Zellen nachweislich reduziert wurde, blieb dieser Marker auf Zellen, die im Lungengewebe adhärten über den gesamten Zeitverlauf stabil reguliert (nicht dargestellt). Übereinstimmende Resultate konnten nach einer intrakardialen Injektion von 5×10^5 Zellen der MDA-MB-231 Linie beobachtet werden, wobei die Transkription des mesenchymalen Markers *Vimentin* im Gegensatz zu den epithelialen Markern auf zirkulierenden Zellen im Blut der Tiere stabil blieb (Abb. 4.14).

500.000 Zellen der MDA-MB-231 Linie (*in vivo*)

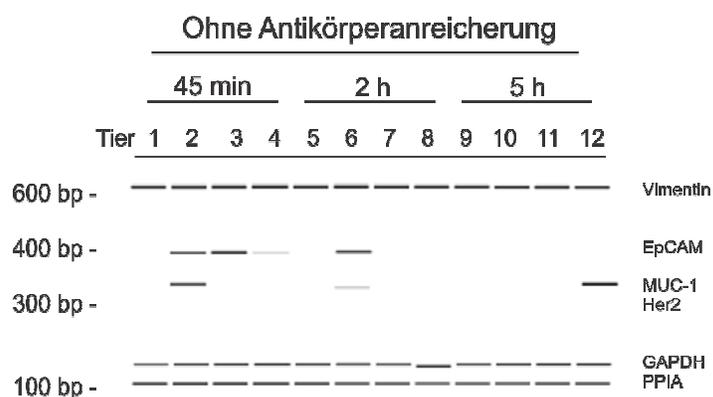


Abbildung 4.14 Zeitabhängiger Tumorzellnachweis nach intrakardialer Injektion. Tumorzellen der MDA-MB-231 Linie wurden intrakardial in die Versuchstiere appliziert und Blutproben über die Amplifikation humanspezifischer Gentranskripte auf zirkulierende Zellen untersucht.

In der aktuellen Literatur werden verschiedene EMT-assoziierte Marker auf Tumorzellen diskutiert (Bonnomet *et al.*, 2010). Zur weiteren Analyse der epithelial-mesenchymalen Veränderungen wurden Proben unter Verwendung eines EMT-spezifischen Arrays der Firma SABiosciences analysiert, wobei das Transkriptionsprofil einer „Spikeprobe“ mit dem Transkriptionsprofil von zirkulierenden Zellen aus Blutproben tumortragender Versuchstiere (KPL-4-Modell) verglichen wurde. Die Resultate zeigten, dass migrierende Zellen im Vergleich zu adhären Zellen aus der Kultur ein divergentes Markerprofil aufwiesen, wobei ein eindeutiger Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp beobachtet werden konnte. Neben der Herunterregulierung von epithelialen Markern wie z.B. *SPP1* oder *KRT19* wurden mesenchymale Gene wie *EGFR* oder *Twist* auf CTCs heraufreguliert (Abb. 4.15). Alle in der Abbildung 4.15 dargestellten Marker waren in Kontrollblutproben naiver Mäuse (n = 2) nicht nachweisbar, was die Humanspezifität der gewählten Marker belegte (nicht dargestellt).

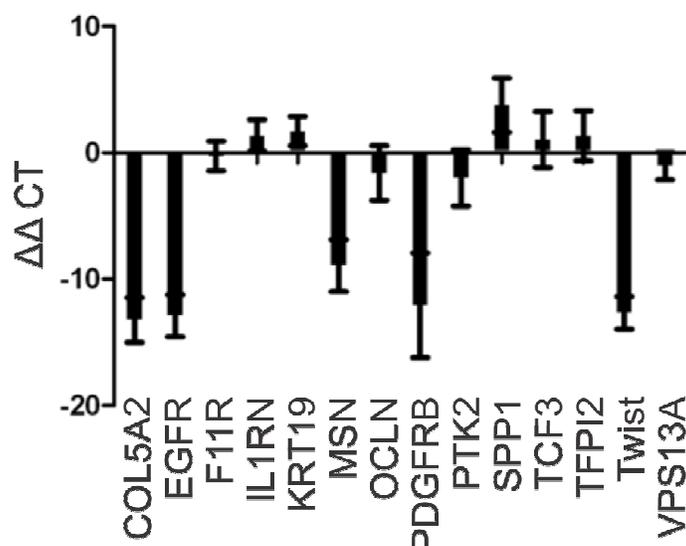


Abbildung 4.15 Relative Transkription epithelialer und mesenchymaler Marker auf CTCs im Vergleich zu Zellen aus der Kultur. Tumorzellen der KPL-4 Linie wurden in naives Mausblut überführt und das Transkriptionsprofil über einen EMT-spezifischen Array der Firma SABiosciences ermittelt. Der relative Nachweis der Markertranskription wurde über das *house-keeping*-Gen (*GAPDH*) berechnet (ΔCT). ΔCT -Werte der „Spikeprobe“ wurden in Relation zu ΔCT -Werten, die aus Blutproben xenotransplantiert Mäuse gewonnen wurden (KPL-4-Modell), gesetzt, wodurch der $\Delta\Delta CT$ -Wert ermittelt werden konnte. Dargestellt sind lediglich die Gene, die in Blutproben von naiven Mäusen nicht nachweisbar waren.

Zusammenfassend konnte über die EMT-assoziierten Profilstudien gezeigt werden, dass sich CTCs aufgrund von epithelialen-mesenchymalen Veränderungen mit antikörperabhängigen Methoden wie dem AdnaTest oder der CellSearch-Methode *in vivo* nicht nachweisen ließen. Die molekularbiologische Analyse der CTCs belegte, dass Marker wie EpCAM oder MUC-1 im Verlauf der Migration verloren gingen, während die Transkription von mesenchymalen Markern wie *EGFR*, *Twist* oder *Vimentin* hochreguliert wurde bzw. stabil blieb.

Die Befunde dieser Arbeit sind für eine Verbesserung der etablierten Nachweismethoden für CTCs im klinischen Alltag essentiell, da über die Profilstudien neue Marker wie z.B. *EGFR* für die Anreicherung oder den Nachweis von CTC-Subpopulationen identifiziert werden konnten. Ergänzend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der alleinige Nachweis von CTCs über die „epitheliale Selektion“ zumindest im Tiermodell zum Verlust der gesamten CTC-Population führte, was die

geringen CTC-Findungsraten des AdnaTests oder der CellSearch-Methode auch in Patientenproben erklären könnte.

4.2.3 Der qualitative CTC-Nachweis kann einen Therapieerfolg nicht aufzeigen

CTCs können im klinischen Alltag neben einem prognostischen Wert auch Informationen über den Erfolg oder Misserfolg einer Behandlung liefern (Pachmann *et al.*, 2005). Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Behandlungsstudie im Tiermodell durchgeführt, um die Eigenschaft der CTCs als pharmakodynamische Biomarker zu testen. Für die *in vivo*-Studie wurden Tiere der Behandlungsgruppe mit einem MEK-Inhibitor (Bay869766) behandelt und eine Vehikelgruppe zur Kontrolle entsprechend mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden Blut- und Organproben tumorfreier Mäuse untersucht (-), während die Positivkontrolle Proben von tumortragenden Versuchstieren (50 mm²) beinhaltete (+). Die Blut- und Organproben tumorfreier Mäuse zeigten nach der Analyse über die qualitative PCR keine Tumorzellsignale (nicht abgebildet). In tumortragenden Mäusen konnten hingegen Tumorzellen über die Amplifikation menschlicher Gentranskripte in den untersuchten Blutproben und den Wächterlymphknoten nachgewiesen werden, was eine Streuung der Zellen zu diesem Zeitpunkt belegte (nicht dargestellt). Da ab dieser Tumorgröße eine Zellstreuung zu beobachten war, wurde mit der Behandlung der Versuchstiere begonnen (Abb. 4.16, siehe Punkt 0 auf der X-Achse). Xenografts der Vehikelgruppe zeigten ein ungehindertes Tumorstadium, während bei den Versuchstieren der Behandlungsgruppe eine Tumorschrumpfung bereits 2 Tage nach erfolgter MEK-Inhibierung zu beobachten war (Abb. 4.16).

Tumorwachstum

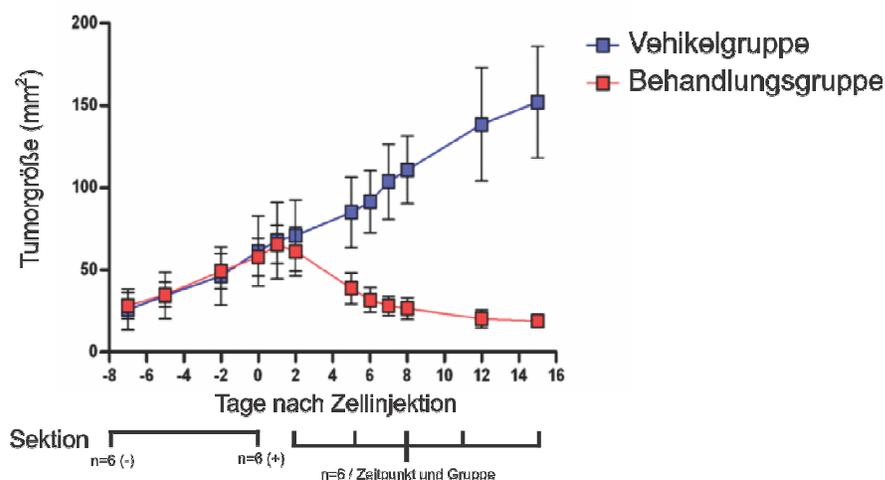


Abbildung 4.16 Tumorwachstum nach MEK-Inhibierung oder Zugabe der Trägersubstanz (Vehikel). Versuchstiere wurden ab einer Tumorgöße von 50 mm² mit einem MEK-Inhibitor (Bay869766) behandelt (n = 28). Zum Vergleich wurde eine Gruppe mit entsprechender Tierzahl mitgeführt und lediglich mit der Trägersubstanz behandelt (Vehikelgruppe). Blut- und Organproben von jeweils 6 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wurden 2, 5, 8, 11 und 15 Tage nach Versuchsbeginn analysiert. Als Negativ- bzw. Positivkontrollgruppe wurden 6 naive Tiere bzw. 6 Xenografts mit Tumorgößen von 50 mm² untersucht (- und +).

Blutanalysen der Tiere zeigten, dass CTCs in allen Proben der Vehikelgruppe detektiert werden konnten (100 %). Die Behandlung führte jedoch zu keiner Reduktion der CTCs und 89 % der Proben blieben positiv für CTC-Signale. Allerdings führte die Behandlung zum kompletten Verlust der *Vimentin*-Transkription in allen CTC-Proben. In Übereinstimmung dazu dokumentieren Literaturhinweise von Ozawa *et al.* die Regulierung von *Vimentin* über den MEK-Signalweg (Ozawa *et al.*, 2006). Während die *Vimentin*-Transkription auf CTCs herunterreguliert wurde, konnte dieser Marker in der Vehikelgruppe in 82 % der Proben nachgewiesen werden (Abb. 4.17).

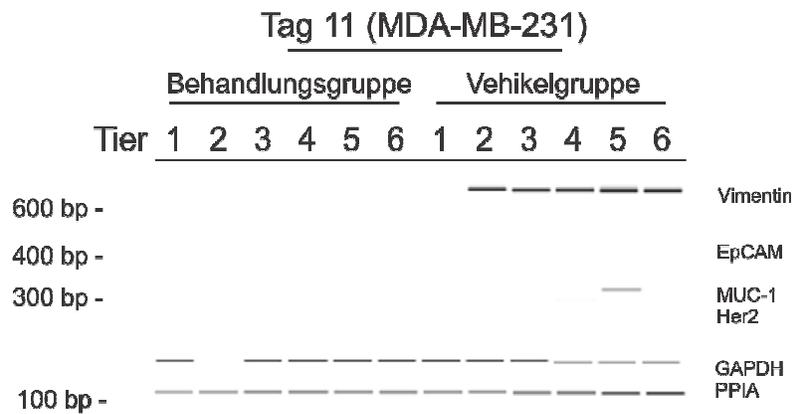


Abbildung 4.17 CTC-Nachweis im Blut 11 Tage nach Behandlungsstart mit einem MEK-Inhibitor. Blutproben der Xenografts wurden über die Amplifikation humaner Gentranskripte (*GAPDH*, *EpCAM*, *Her2*, *MUC-1*, *PPIA* und *Vimentin*) auf CTCs untersucht.

Obwohl 15 Tage nach Beginn der Behandlung mit dem MEK-Inhibitor eine deutliche Abnahme der Tumormasse zu erkennen war (Abb. 4.16), ließen sich unverändert CTCs im Blut der Tiere nachweisen. Die Analyse des Primärtumors ergab, dass selbst 15 Tage nach Beginn der Behandlung noch proliferierende (Ki-67-positive) Zellen im Primärtumor detektiert werden konnten. Demzufolge muss von einer weiteren Tumorzellstreuung ausgegangen werden (Abb. 4.18).

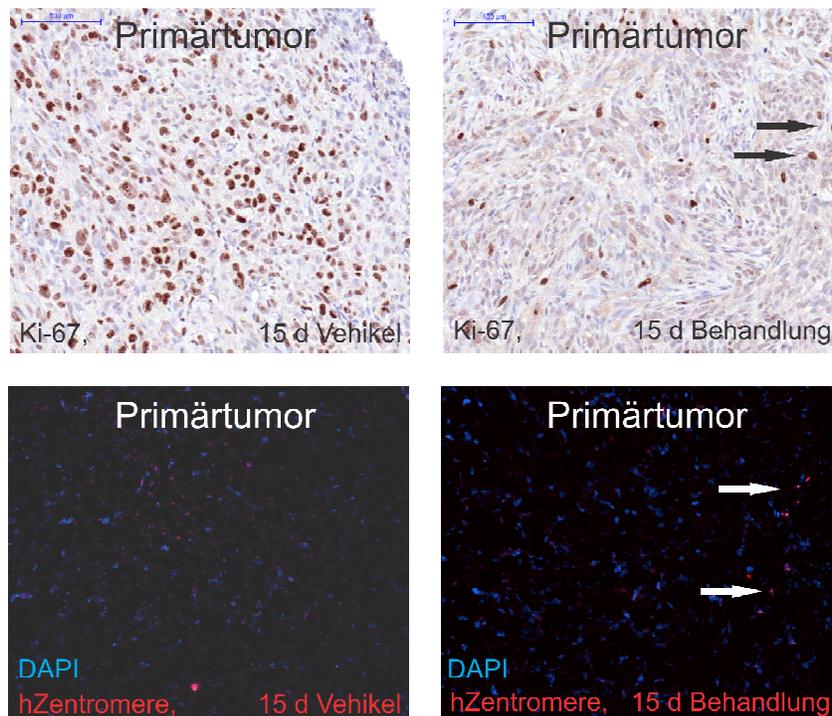


Abbildung 4.18 Vergleichende Analyse der Primärtumore auf die Expression humaner Ki-67 positiver Zellen. Tumorschnittpräparate wurden wie unter 3.11 und 3.12 beschrieben prozessiert und ausgewertet. Die Darstellung belegt, dass sich 15 Tage nach Behandlung mit einem MEK-Inhibitor noch proliferierende, humane, Ki-67-positive Zellen im Primärtumor finden lassen, wobei deutlich weniger proliferierende Zellen im Tumor der Behandlungsgruppe auszumachen waren (siehe Pfeil).

Grundsätzlich weist die qualitative PCR zum Nachweis der CTCs den Nachteil auf, dass Tumorzellen über diesen Ansatz nicht quantifiziert werden können, weshalb der Nachweis von CTCs im Blut von tumortragenden Versuchstieren nicht als eindeutiger Parameter zur Überwachung des Krankheitsverlaufs etabliert werden konnte. Daher widmeten sich nachfolgende *in vivo*-Studien dem quantitativen CTC-Nachweis.

4.3 *In vivo*-Studien zum quantitativen Nachweis der CTCs

4.3.1 Die quantitative Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen kann zum Nachweis von CTCs genutzt werden

Für den quantitativen Nachweis von CTCs wurden Versuchstiere mit Zellen der MDA-MB-231, der MDA-MB-231-SA und der KPL-4 Linie appliziert (n = 59). Um die Verbindung zwischen der Tumorgröße und der CTC-Zahl erforschen zu können wurden Blutproben aus Versuchstieren mit Tumorgrößen zwischen 20 und 140 mm² untersucht. Die genaue Anzahl der CTCs wurde über eine entsprechend mitgeführte „DNA-Kontrollreihe“ der jeweiligen Zelllinie ermittelt (Abb. 4.8).

Über die qRT-PCR konnten CTCs *in vivo* in 20 - 30 % der Blutproben nachgewiesen werden. In einem orthotopen MDA-MB-231-Modell waren 4 von 20 Tieren (20 %) positiv für CTC-Zahlen zwischen 5 und 15 Zellen / ml Blut. CTCs ließen sich allerdings erst ab einer Tumorgröße von 80 mm² detektieren. In einem subkutanen MDA-MB-231-Modell (n = 20) konnten hingegen keine CTCs im Blut der Tiere nachgewiesen werden. Laut Literatur lassen sich subkutane Metastasierungsmodelle nur schwer etablieren (Francis *et al.*, 1984), was möglicherweise auf die geringe Streuungsrate dieses Modells zurückzuführen ist. Zellen der MDA-MB-231-SA Linie zeigen *in vivo* ein sehr aggressives Tumorwachstum und besitzen eine auffällige Neigung zur Knochenmetastasierung (Strube *et al.*, 2009). Aufgrund der invasiven Eigenschaft wurden Zellen dieser Linie ebenfalls in naive Versuchstiere (n = 9) appliziert und CTCs detektiert. Im Vergleich zum MDA-MB-231-Modell konnten CTCs in diesem Modell in 30 statt 20 % der Proben nachgewiesen werden. Dabei wurden

in dem MDA-MB-231-SA-Modell zudem bis zu 20 Zellen / ml Mausblut detektiert (MDA-MB-231-Modell: maximal 15 Zellen / ml Mausblut), was die Invasivität der modifizierten Linie bestätigt.

In einem weiteren Versuchansatz wurden Blutproben aus einem orthotopen KPL-4-Modell mit Tumorgößen zwischen 50 - 120 mm² analysiert. Hier zeigten 2 von 9 Tieren (22 %) Signale für 15 bzw. 20 CTCs. *Ex vivo* konnten unter Verwendung des AdnaTests Zellen dieser Linie bereits auf Einzelzellebene detektiert werden. Da ein Nachweis von CTCs über den AdnaTest in entsprechenden Blutproben nicht erbracht werden konnte, wird der Verlust der EpCAM-Expression auf mobilen Zellen im Xenograftmodell erneut verdeutlicht. Zum analytischen Vergleich wurde bei allen 59 Blutproben die qualitative PCR-Methode mitgeführt. Über diesen Ansatz ließen sich in allen Blutproben CTCs nachweisen, was die höhere Sensitivität der qualitativen PCR im Vergleich zur quantitativen qRT-PCR belegte (nicht dargestellt). Eine Gesamtübersicht der Ergebnisse der quantitativen Studien ist der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Tabelle 4.3 Gesamtübersicht der *in vivo*-Versuche zum quantitativen CTC-Nachweis im Blut xenotransplanteder Versuchstiere über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen.

Modell (Zellzahl)	Applikationsort	Tumorgröße (Tierzahl)	Tiere positiv für CTCs (Anzahl an Zellen / ml)
MDA-MB-231 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	20 mm ² (n = 5)	0 / 5
MDA-MB-231 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	50 mm ² (n = 5)	0 / 5
MDA-MB-231 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	80 mm ² (n = 5)	3 / 5 (5, 10 und 15)
MDA-MB-231 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	120 mm ² (n = 5)	1 / 5 (7)
MDA-MB-231 (1 x 10 ⁶)	Subkutan	20 - 120 mm ² (n = 20)	0 / 20
MDA-MB-231-SA (1 x 10 ⁶)	Orthotop	60 mm ² (n = 4)	0 / 4
MDA-MB-231-SA (1 x 10 ⁶)	Orthotop	80 mm ² (n = 3)	2 / 3 (15 und 20)
MDA-MB-231-SA (1 x 10 ⁶)	Orthotop	140 mm ² (n = 3)	1 / 3 (5)
KPL-4 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	50 mm ² (n = 3)	0 / 3
KPL-4 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	80 mm ² (n = 2)	1 / 2 (20)
KPL-4 (1 x 10 ⁶)	Orthotop	120 mm ² (n = 4)	1 / 4 (15)

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der quantitativen CTC-Analysen, dass zumindest in manchen Blutproben der Xenografts eine für den AdnaTest ausreichende CTC-Anzahl im Blut der Tiere nachgewiesen werden konnte. Da in entsprechenden Proben tumortragender Versuchstiere allerdings keine CTCs unter Verwendung des AdnaTests oder der CellSearch-Methode detektiert wurden, wird die Herunterregulierung der EpCAM-Expression auf migrierenden Zellen im Tiermodell deutlich. Weiterhin ließen sich im Rahmen der Studien CTCs in allen Blutproben über die Amplifikation humaner Gentranskripte nachweisen, was die höhere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur quantitativen RT-PCR belegte.

4.3.2 Der Nachweis von vitalen Tumorzellen kann unter Verwendung des EPISPOTs im Tiermodell verfolgt werden

Für die Tumorstreuung sind überlebensfähige Zellen essentiell. Der Beweis, dass die CTCs im Blut der untersuchten Xenografts vital sind, konnte über den EPISPOT erbracht werden. Ergänzend konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an positiven CTC-Befunden und der TumorgroÙe aufgezeigt werden. Während bei TumorgroÙen von 50 mm² lediglich eins von drei Tieren (33 %) positiv für ein Zellsignal war, lieÙen sich ab einer TumorgroÙe von 100 mm² vitale CTCs bei zwei von drei Tieren (66 %) detektieren (Tabelle 4.4). Aufgrund der geringen Wiederfindungsrate in „Spiking-Experimenten“ (6 %) ist von weiteren Zellen, die sich in der Zirkulation befanden, auszugehen. Der Nachweis von einer Zelle entspricht bei einer Wiederfindungsrate von 6 % einer hypothetischen Gesamtzellzahl von umgerechnet etwa 17 Zellen. Diese hochgerechneten CTC-Werte spiegeln die CTC-Zahlen, die unter Verwendung der quantitativen RT-PCR-Methode ermittelt wurden demnach relativ gut wider (zwischen 5 und 20 Zellen / ml Mausblut).

Tabelle 4.4 *In vivo*-Nachweis vitaler Tumorzellen über den EPISPOT.

Tier (n = 9)	TumorgroÙe 50 mm ²	TumorgroÙe 100 mm ²	TumorgroÙe 150 mm ²
1	1 Zelle	1 Zelle	1 Zelle
2	0 Zellen	1 Zelle	1 Zelle
3	0 Zellen	0 Zellen	0 Zellen

Anhand der gesammelten Ergebnisse der *ex-* und *in vivo*-Studien lässt sich zusammenfassend für diese Arbeit sagen, dass

1. CTCs in Abhängigkeit der EpCAM-Expression über den AdnaTest nachweisbar sind,
2. CTCs im Verlauf der Migration epitheliale Eigenschaften verlieren und somit über EpCAM-basierte, antigenabhängige Methoden im Blut nicht detektiert werden können, wobei alternative, markerunabhängige Methoden zum Nachweis der CTCs das „Detektionsproblem“ im Xenograftmodell umgehen können,
3. mesenchymale Gentranskripte auf zirkulierenden Zellen herauf reguliert werden,
4. der qualitative Nachweis von CTCs über die Amplifikation humaner Gentranskripte für pharmakodynamische Studien nicht geeignet ist,
5. die *in vivo*-Studien unter Verwendung der quantitativen Nachweismethoden demonstrieren, dass lediglich geringe CTC-Zahlen in Blutproben xenotransplantierte Mäuse zu finden sind, wobei
6. die Vitalität der Zellen über die EPISPOT-Analyse belegt werden kann.

4.4 Nachweis von humaner-DNA in murinen Plasmaproben (*ex vivo*)

Neben den CTCs könnte der Nachweis von zellfreien Nukleinsäuren möglicherweise weitere pharmakodynamische und prognostische Informationen über den individuellen Krankheitszustand der Krebspatienten liefern, weshalb in einem weiteren Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit dieser Biomarker im Tiermodell molekularbiologisch begutachtet wurde, um die Bedeutung der DNA-Moleküle im Plasma zu klären.

4.4.1 Im Tiermodell kann humane-DNA spezifisch vor dem murinen Hintergrund detektiert werden

Zum Nachweis der humanen DNA im Plasma xenotransplanteder Versuchstiere wurden im Rahmen eines Vorversuchs menschliche DNA-Mengen zwischen 0,001 - 10 ng in 200 μ l murines Plasma überführt und die DNA der Probe isoliert. Nach erfolgter DNA-Isolierung wurden über die quantitative Bestimmung der *Alu*-Sequenzen mittels qRT-PCR menschliche Nukleinsäuren in der Probe detektiert. Die Resultate zeigten, dass sich humane DNA-Mengen aus Zelllysaten zwischen 0,001 und 10 ng spezifisch vor dem murinen Hintergrund oder der mitgeführten Wasserprobe nachweisen ließen (Abb. 4.20).

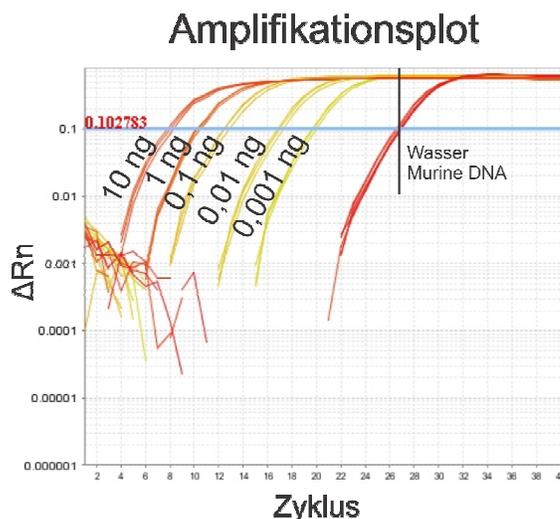


Abbildung 4.20 DNA-Nachweis humaner *Alu*-Sequenzen im murinen Plasma über die quantitative RT-PCR. Abgebildet ist eine schematische Darstellung des Anstiegs der Fluoreszenz (ΔRn) nach erfolgter qRT-PCR. Die Messung erfolgte am Real-Time PCR System (7500 Fast) in Triplikaten.

4.5 Humane Tumor-DNA in Plasmaproben xenotransplanteder Mäuse

4.5.1 Die Mengen an zellfreien, tumorspezifischen Nukleinsäuren korreliert im Tiermodell mit der Tumorgröße

Über den Unterschied zwischen „fremd“ und „eigen“ konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Nachweis von tumorspezifischen, zellfreien Nukleinsäuren (ctDNA) über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen im Xenograftmodell erbracht werden. Nach erfolgter Methodenetablierung wurden Proben orthotoper ($n = 15$) und subkutaner ($n = 15$) MDA-MB-231-Modelle auf den Status der ctDNA-Konzentration im Plasma verglichen, wobei Proben aus Xenografts mit Tumorgößen zwischen 50 und 150 mm² analysiert wurden. Das Anwachsen der Tumore zeigte zwischen subkutanen und orthotopen Modellen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.21, links). Dies spiegelte sich auch bei der molekularen Analyse der ctDNA-Quantifizierung wider. In Übereinstimmung zu klinischen Befunden zeigten die Resultate der ctDNA-Messungen, dass in Abhängigkeit der Tumorgröße die Konzentration an ctDNA im Plasma der Tiere anstieg, wobei der Applikationsort der Tumorzellen keinen Unterschied bezüglich der freien ctDNA-Mengen machte (Abb. 4.21, rechts).

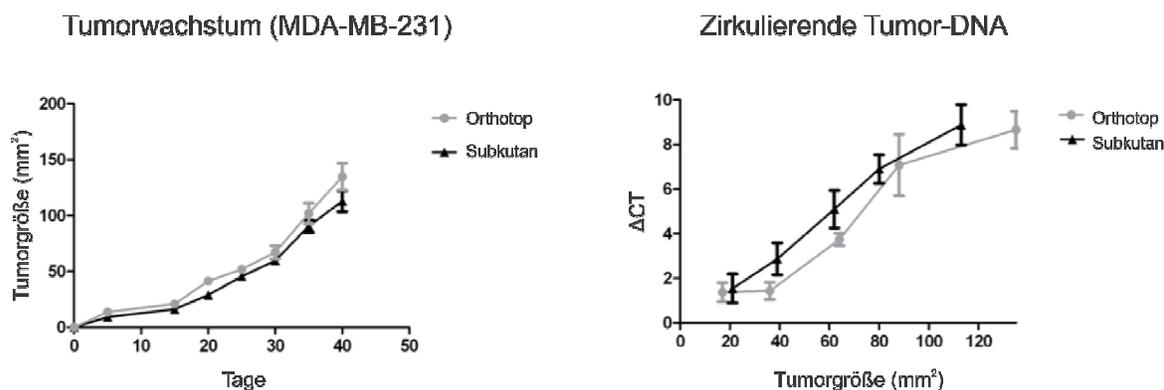


Abbildung 4.21 Tumorstudium und Konzentrationsbestimmungen von zirkulierender TumordNA im Plasma von Xenograftmodellen. Versuchstiere wurden mit Tumorzellen in die rechte Flanke oder orthotop in die Milchleiste (*mammary fat pads*) appliziert (links). Die Konzentration an zellfreier TumordNA im Plasma der Versuchstiere wurde über die quantitative Bestimmung humaner *Alu*-Sequenzen dokumentiert (rechts). Der Δ CT-Wert wurde in Bezug zu den CT-Werten der Negativkontrollen (H₂O und murines Plasma) ermittelt, wobei der CT-Wert der Xenograftprobe vom gemittelten CT-Wert der Negativkontrollen subtrahiert wurde.

4.5.2 Der ctDNA-Nachweis bildet die Pharmakodynamik im Therapiemodell ab

Für das Überleben der Krebspatienten ist es essentiell, den Erfolg oder Misserfolg einer Therapie zeitnah aufzuzeigen. In einem Behandlungsversuch wurde die ctDNA im Plasma bestimmt, um die tumorspezifischen, zellfreien Nukleinsäuren im Tiermodell als pharmakodynamischen Biomarker zu validieren (siehe 4.2.3). Das Tumorwachstum ist der Abbildung 4.16 zu entnehmen. Tiere der Vehikelgruppe zeigten ein ungehindertes Wachstum der Tumore, während bei den Tumoren der Behandlungsgruppe eine deutliche Abnahme der Tumormasse im Verlauf der Therapie zu beobachten war. Die molekulare Analyse der Plasmaproben zeigte, dass die Quantifizierung der ctDNA den Behandlungserfolg eindeutig aufzeigen konnte. Während in Plasmaproben der Vehikelgruppe ein Anstieg der ctDNA-Konzentration zu verzeichnen war, reduzierte sich die Menge an zellfreien, tumorspezifischen Nukleinsäuren im Plasma der Behandlungsgruppe bereits 5 Tage nach Substanzzugabe und blieb ab dem achten Tag sogar unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 4.22).

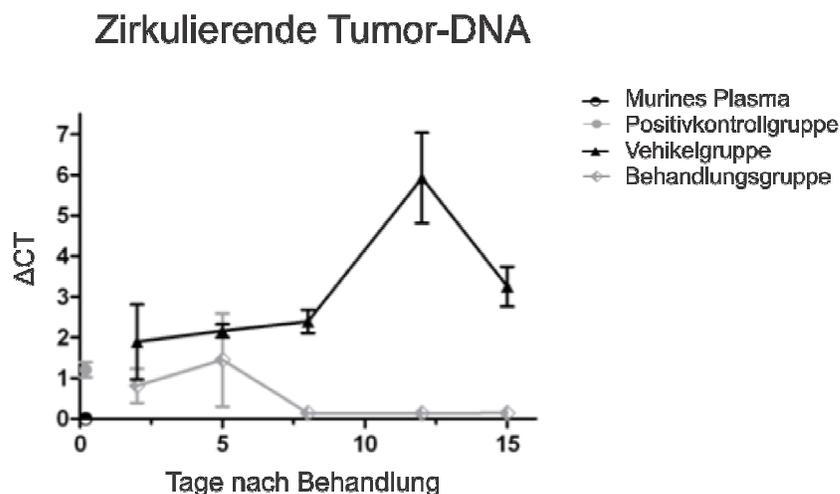


Abbildung 4.22 Nachweis von ctDNA im Plasma xenotransplantierter Versuchstiere im Verlauf einer Behandlungsstudie. Plasmaproben wurden 2, 5, 8, 11 und 15 Tage nach dem Versuchsbeginn entnommen und die ctDNA-Konzentration bestimmt. Der Δ CT-Wert wurde in Bezug zu Durchschnittswerten der CT-Daten von Plasmaproben der naiven Kontrollgruppe ermittelt, wobei der ermittelte CT-Wert des tumortragenden Tiers vom CT-Wert der Negativkontrollen subtrahiert wurde.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der *in vivo*-Studien, dass

1. Konzentrationsbestimmungen von zellfreien Nukleinsäuren über die Quantifizierung humaner *Alu*-Sequenzen die Tumorprogression im Tiermodell widerspiegeln können,
2. Messungen der ctDNA-Mengen die Tumordynamik unter Behandlung eindeutig aufzeigen, wobei
3. kein Unterschied zwischen subkutanen und orthotopen Modellen erkennbar ist.

Die Erkenntnis, dass über die Bestimmung der ctDNA-Mengen ein Tumorwachstum und das Ansprechen von Therapien im Tiermodell molekular verfolgt werden kann, könnte möglicherweise für die präklinische Validierung neuer Therapieverfahren genutzt werden. Zusätzlich könnte über dieses Verfahren der Verlauf einer Tumorprogression in orthotopen Modellen gemessen werden, dessen Wachstum optisch nur schwer zu verfolgen ist wie z.B. orthotope Lungen- oder Leberkrebsmodelle.

4.6 Quantitativer Nachweis von zellfreier DNA im Plasma von Humanproben

4.6.1 Die Konzentration an zellfreier DNA ist in Plasmaproben von Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erhöht

Über die Nutzung von Xenograftmodellen kann relativ einfach zwischen „fremd“ und „eigen“ unterschieden werden, wodurch die Messung der Tumor-DNA im Plasma der Tiere ohne eine spezifische Mutationsanalyse möglich war. Aufgrund der Tatsache, dass der quantitative Nachweis für freie Nukleinsäuren in den klinischen Plasmaproben ebenfalls über die Amplifikation der *Alu*-Sequenzen erfolgte, ist zu berücksichtigen, dass sich von nun an lediglich quantitative, unspezifische Bestimmungen der gesamten, zellfreien DNA (cfDNA) im Plasma der Patienten detektieren ließen.

Obwohl die Relevanz der zellfreien Nukleinsäuren in der klinischen Situation bereits beschrieben werden konnte, wird der Nutzen der reinen Quantifizierung in der Literatur noch intensiv diskutiert (Altimari *et al.*, 2008; Catarino *et al.* 2008; Sunami *et*

al., 2008; van der Drift *et al.*, 2010; Schwarzenbach *et al.*, 2008; Sozzi *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004). Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zellfreie DNA-Moleküle aus Patientenproben untersucht, um die Bedeutung der cfDNA weiter aufzuschlüsseln.

Zum Nachweis der zellfreien DNA-Moleküle wurden im ersten Teilabschnitt 58 Heparin-Plasmaproben von Kopf-Hals-Tumorpatienten auf den cfDNA-Status untersucht und mit 20 Plasmaproben von gesunden Individuen verglichen. Die Analyse der Proben zeigte, dass Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Menschen signifikant erhöhte Konzentrationen (p -Wert $< 0,05$) an zellfreien Nukleinsäuren im Plasma aufwiesen (Abb. 4.23). Allerdings ließ sich keine Korrelation zwischen dem Stadium, der Tumorgröße oder weiteren klinischen Parametern feststellen (nicht dargestellt).

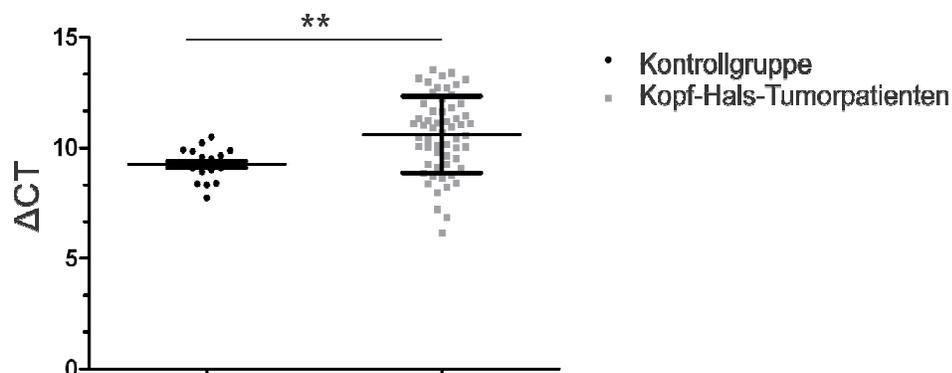


Abbildung 4.22 Vergleichende Analyse von zellfreien DNA-Mengen im Plasma von gesunden Menschen und Kopf-Hals-Karzinompatienten. Die Menge an zellfreier DNA wurde über die Amplifikation der *Alu*-Sequenzen im Heparin-Plasma von 20 gesunden Individuen und 58 Kopf-Hals-Karzinompatienten ermittelt (** p -Wert $< 0,05$, ungepaarter T-Test ermittelt über GraphPad Prism). Der Δ CT-Wert wurde über die mitgeführte Negativkontrolle (H_2O) ermittelt (Δ CT-Wert = CT-Wert der Wasserprobe minus CT-Wert der Humanprobe).

Zusätzlich zu den Proben der Kopf-Hals-Karzinompatienten wurden 80 Patientenproben im Vergleich zu Proben von 40 gesunden Individuen auf den Status der zellfreien Nukleinsäuren im Plasma (EDTA) untersucht, wobei jeweils 20 Lungenkrebs-, 20 Kolonkrebs-, 20 Prostatakrebs- und 20 Brustkrebsproben zur Verfügung standen. Die Auswertung der Proben bestätigte, dass Krebspatienten

signifikant erhöhte Konzentrationen an zellfreier DNA im Plasma im Vergleich zu gesunden Individuen aufzeigen (p-Wert 0,0001) (Abb. 4.23).

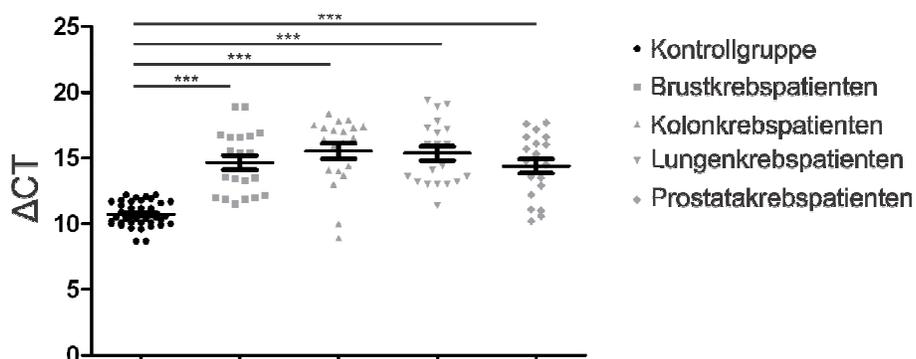


Abbildung 4.23 Vergleichende Analyse der Konzentration von zellfreier DNA zwischen gesunden Probanden und Karzinompatienten. Die Menge an zellfreien Nukleinsäuren wurde über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen in EDTA-Plasmaproben von gesunden Individuen (n = 40) und 80 Karzinompatienten (Brust, Kolon, Lunge und Prostata) ermittelt und graphisch dargestellt (***) p-Wert 0,0001, ungepaarter T-Test ermittelt über GraphPad Prism). Der Δ CT-Wert wurde über die mitgeführte Negativkontrolle (Wasser) ermittelt (Δ CT-Wert = CT-Wert der Wasserprobe minus CT-Wert der Humanprobe).

Bei den zusätzlich untersuchten Patientenproben konnte auch keine eindeutige Korrelation zwischen der cfDNA-Menge und der Tumorgroße oder dem Tumorstadium ausgemacht werden (nicht dargestellt). Lediglich bei den Proben der Kolonkrebspatienten war eine Tendenz in Relation zum Stadium zu beobachten. Zudem zeigten die Plasmaproben dieser Patientenkohorte eine deutliche Korrelation zum Metastasesstatus. Patienten, die in Voruntersuchungen positiv für das Auftreten von Metastasen getestet wurden, weisen die höchsten Konzentrationen an zellfreien Nukleinsäuren im Plasma auf (Abb. 4.24).

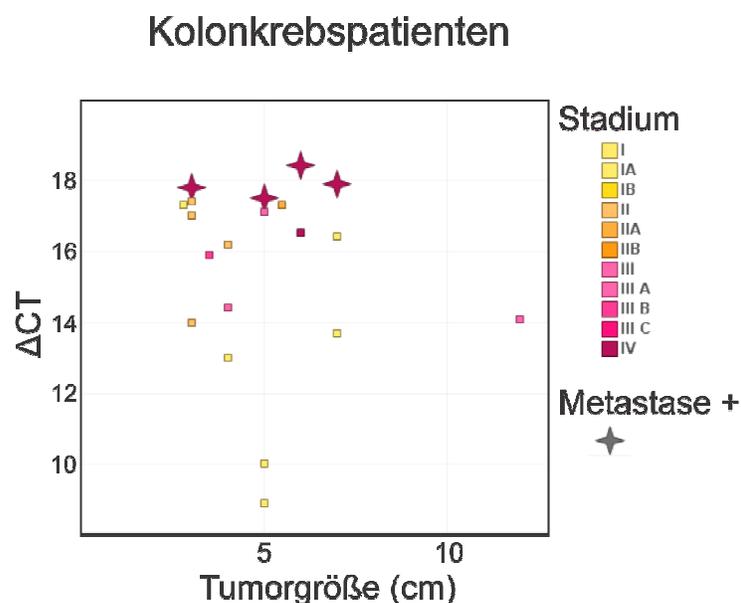


Abbildung 4.24 Vergleichende Analyse zwischen zellfreier DNA im Plasma, Tumorgröße, Stadium und Metastasesstatus. Die Konzentration an zellfreier DNA aus EDTA-Plasmaproben von 20 Kolonkrebspatienten wurde über die Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen ermittelt und in Korrelation zur Tumorgröße, Stadium und Metastasesstatus der jeweiligen Patienten gesetzt.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Untersuchung vom klinischen Material, dass Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Menschen signifikant erhöhte Konzentrationen an zellfreien Nukleinsäuren im Plasma aufwiesen. Die Resultate der Analyse der Kolonkrebskohorte zeigten zudem, dass eine Korrelation zwischen dem Metastasesstatus und der DNA-Konzentration im Plasma besteht. Leider konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der kurzen Zeit und dem geringen Probenumfang kein Zusammenhang zwischen der DNA-Konzentration und dem Gesamtüberleben der Patienten dokumentiert werden, wobei die Kohorte der Kopf-Hals-Karzinompatienten für diese Fragestellung noch unter Beobachtung steht. Ergänzend stand kein Probenmaterial zur Verfügung, dass eine Aussage über die Eigenschaft der cfDNA als pharmakodynamischen Marker erlaubte, weshalb weitere Studien zur Klärung dieser Fragestellung angefertigt werden müssen, um die Relevanz der cfDNA eindeutig bestätigen zu können.

5 Diskussion

5.1 Zirkulierende Tumorzellen

Zurzeit werden verschiedene Verfahren zum CTC-Nachweis in der Klinik angewendet oder erprobt (Yu *et al.*, 2011; Lianidou und Markou, 2011). Obwohl CTCs als diagnostische, pharmakodynamische und prognostische Marker genutzt werden können (Xenidis *et al.*, 2009; Pachmann *et al.*, 2008; Christofanilli *et al.*, 2004; De Bono *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009; Kurihara *et al.*, 2008), ließ sich bisher kein „Goldstandard“ für den gesicherten Nachweis aller Tumorzellen im Blut der Patientenprobe etablieren. In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene CTC-Nachweismethoden miteinander verglichen, um Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren detailliert aufzuzeigen. Ferner wurde die Persistenz oder das Verschwinden von CTCs unter Therapie im Tiermodell untersucht, um den Stellenwert von zirkulierenden Tumorzellen als pharmakodynamische Biomarker zu bestimmen. Ergänzend wurden molekulare CTC-Profilstudien durchgeführt, um Differenzierungsprozesse, die im Rahmen der Metastasierung stattfinden, weiter aufzuschlüsseln.

Bis heute ist lediglich ein einziges Verfahren zum Nachweis der CTCs von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) im klinischen Alltag zugelassen worden (CellSearch). Diese Methode scheint im Vergleich zu anderen Detektionstechniken auch deutlich sensitiver zu sein (Balic *et al.*, 2005; van der Auwera *et al.*, 2009; Hofman *et al.*, 2011). Balic *et al.* konnten unter Verwendung der CellSearch-Methode in 54 % der Patientenproben zirkulierende Tumorzellen detektieren, während über eine Dichtegradientenzentrifugation (OncoQuick) lediglich in 23 % der Proben CTCs nachgewiesen werden konnten. Die CellSearch-Methode basiert wie auch der AdnaTest, der CTC-Chip oder der Nanodetektor der GILUPI GmbH auf der „epithelialen Selektion“. Über EpCAM-basierte Verfahren ließen sich bereits klinische Therapieerfolge über die Persistenz oder das Verschwinden von CTCs aufzeichnen, wobei zudem prognostische Aussagen über den weiteren Krankheitsverlauf getroffen werden konnten (Tewes *et al.*, 2004; Christofanilli *et al.*, 2004; Nagrath *et al.*, 2007; De Bono *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009). Obgleich der klinischen Relevanz der CTCs, die über EpCAM-basierte Verfahren detektiert

wurden, weist die „epitheliale Selektion“ klare Nachteile auf, die in der eigenen Arbeit aufgezeigt werden konnten und nachfolgend diskutiert werden.

Ex vivo ließen sich Tumorzellen über den AdnaTest und das CellSearch-Verfahren sensitiv nachweisen, wobei in Übereinstimmung zur aktuellen Literatur die Relevanz der EpCAM-Expression für die Effizienz der Anreicherung aufgezeigt werden konnte (eigene Daten; Königsberg *et al.*, 2011; Punnoose *et al.*, 2010). Über das CellSearch-Verfahren ließen sich im Vorversuch allerdings nur 350 von 500 Tumorzellen wiederfinden während der AdnaTest Tumorzellen bereits auf Einzelzellebene detektieren konnte. Ausgehend von Literaturhinweisen von Andreopoulou und van der Auwera *et al.* wäre eine höhere Sensitivität der CellSearch-Methode zu erwarten gewesen, da klinische Daten auf eine äquivalente (Andreopoulou *et al.*, 2011) bzw. eine höhere Sensitivität der CellSearch-Methode im Vergleich zum AdnaTest hindeuten (van der Auwera *et al.*, 2010). Die eindeutige Effizienz der CellSearch-Methode ließ sich in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestimmen, da die Ausgangszellzahl lediglich über eine Verdünnungsreihe ermittelt worden war. Inwiefern sich die beiden Methoden hinsichtlich der genauen Sensitivität unterscheiden, bleibt demnach zu klären. Im Gegensatz zum AdnaTest oder dem CellSearch-Verfahren konnten im Vorversuch über den Nanodetektor im Fließsystem nur sehr geringe Zellzahlen wiedergefunden werden. Obwohl die Vergrößerung der Detektoroberfläche (Spiralisierung) eine gesteigerte Effizienz des Verfahrens zur Folge hatte, wurde der Nachweis von CTCs im Fließsystem aufgrund der geringen Sensitivität für anknüpfende *in vivo*-Studien ausgeschlossen. Dessen ungeachtet belegen aktuelle klinische Daten der GILUPI GmbH eine Überlegenheit des Nanodetektors im Vergleich zum CellSearch-Verfahren. Diese unveröffentlichten Daten sind höchstwahrscheinlich auf das große Blutvolumen zurückzuführen, das im Verlauf der Inkubation am Draht vorbeifließt (7,5 ml Blut pro CellSearch-Analyse vs. geschätzt ca. 130 l Blut pro Nanodetektor-Analyse).

Über den AdnaTest und das CellSearch-Verfahren ließen sich in tumortragenden Versuchstieren allerdings keine CTCs nachweisen, obwohl eine Metastasierung der Brustkrebszellen in umliegende Gewebe zu beobachten war. CTCs konnten lediglich antikörperunabhängig über die Amplifikation humaner Gentranskripte (qualitative PCR) (~ 100 %) oder die quantitative Amplifikation humaner *Alu*-Sequenzen (qRT-

PCR) detektiert werden (20 - 30 %). Die unterschiedlichen Detektionsraten sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass im Verlauf der Probenaufarbeitung für die qRT-PCR Tumorzellen während der Waschschriffe verloren gingen (Flores *et al.*, 2009; persönliches Gespräch mit Prof. Klaus Pantel). Zudem wurde die Probe zur Isolierung der Tumorzell-RNA laut Protokoll des Herstellers zweimal bei 5000 g zentrifugiert, während Tumorzellen zum quantitativen Nachweis insgesamt viermal bei nur 450 g zentrifugiert wurden. Weiterhin könnte die Anzahl der mRNA-Moleküle der *house-keeping*-Gene die Kopienzahl der *Alu*-Sequenzen übersteigen, was die höhere Sensitivität begründen könnte. Der genaue Aufschluss dieser Frage bleibt jedoch zu klären.

Neben einer höheren Sensitivität zeigte die qualitative Tumorzellanalyse, dass epithelzellspezifische Marker wie *EpCAM* und *MUC-1* im Verlauf der Metastasierung hinunterreguliert wurden. In der Fachliteratur wird die Metastasierung als mehrstufiger Prozess beschrieben (Wagener und Müller, 2010), dem molekulare Entwicklungsvorgänge der Tumorzellen zugrunde liegen, welche die Intravasation, das Überleben in der Blutbahn, die Extravasation und das sekundäre Tumorwachstum am neuen Ort erst ermöglichen (Fidler *et al.*, 2003; Bonnomet *et al.*, 2010). Diese Veränderungen beinhalten die Hinunterregulation epithelialer Proteine, wohingegen die Transkription von mesenchymalen Genen aktiviert wird (Royer und Lux, 2011). Die Prozesse führen zum Verlust der Zellpolarität und der Zell-Zellkontakte, wodurch die nun mobilen Tumorzellen die Basalmembran passieren können. Dieser Differenzierungsvorgang wurde unter anderem von Yang und Weinberg als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) zusammengefasst (Yang und Weinberg, 2008). Obwohl der kausale Zusammenhang zwischen EMT und Metastasierung umstritten ist (Bonnomet *et al.*, 2010), zeigten die Resultate der vorliegenden Doktorarbeit einen klaren Zusammenhang zwischen der Zellstreuung und der Abnahme epithelialer bzw. brustkrebsspezifischer Marker. Dieser Befund erklärt zugleich die negativen Blutproben, die über den AdnaTest oder die CellSearch-Methode beobachtet wurden, da die Effizienz der CTC-Anreicherung von der Expression dieser Marker bestimmt wird (eigene Daten; Sieuwerts *et al.*, 2009; Punnoose *et al.*, 2010).

Affirmativ zu den eigenen Daten wurde der Verlust von epithelzellspezifischen Markern wie *MUC-1* und *Her2* auf CTCs auch von Helzer und Kollegen in einem murinen Prostata-Modell beobachtet (Helzer *et al.*, 2008). Allerdings ließen sich bei der Studie von Helzer *et al.* im Vergleich zur eigenen Arbeit keine genregulatorischen Abweichungen zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen ausmachen. Die Abnahme der Oberflächenmoleküle im lebenden Tier war auffallend schnell und kann möglicherweise auf Abspaltungsprozesse extrazellulärer Domänen des EpCAM-Proteins zurückgeführt werden (Denzel *et al.*, 2009; Maetzel *et al.*, 2009). Warum jedoch brustkrebsspezifische Transkriptionssignale auf zirkulierenden Zellen nach erfolgter i.v. Applikation ebenfalls bereits nach 30 min verloren gingen, bleibt zu klären.

Im Gegensatz zu den eigenen Befunden waren Eliane und Helzer in der Lage, CTCs über EpCAM-spezifische Verfahren in Xenograftmodellen nachzuweisen (Eliane *et al.*, 2008; Helzer *et al.*, 2008). Eliane *et al.* haben *in vivo* bis zu 1000 CTCs über eine modifizierte Variante der CellSearch-Methode (MDA-MB-231-Modell) finden können. Obwohl das Detektionslimit für den AdnaTest (*ex vivo*) bei 10 MDA-MB-231 Zellen pro ml Mausblut liegt, konnten in der eigenen Arbeit im gleichen Modell keine CTCs im Blut der Xenografts gefunden werden. Auch der quantitative CTC-Nachweis über die Amplifikation der humanen *Alu*-Sequenzen konnte maximal bis zu 20 Zellen detektieren. Die geringen CTC-Zahlen, die in präklinischen Brustkrebsmodellen gemessen werden konnten, wurden zudem unlängst von Bonnomet und Kollegen bestätigt (Bonnomet *et al.*, 2011). Die hohen CTC-Zahlen, die in der Studie von Eliane *et al.* ermittelt wurden, gehen daher möglicherweise auf falsch-positive Ereignisse zurück, da CTC-Signale im Rahmen dieser Studie auch in Kontrollblutproben detektiert wurden. Da in der eigenen Arbeit ergänzend keine CTCs über das CellSearch-Verfahren im Tiermodell detektiert werden konnten, wird die Annahme der Hinunterregulation epithelialer Marker auf CTCs bestätigt.

Neben einer Reduzierung der epithelialen Marker konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine stabile Transkription bzw. Induktion des mesenchymalen Markers *Vimentin* auf CTCs gezeigt werden. Das Intermediärfilament Vimentin wurde bereits als Indiz für EMT beschrieben (Ivaska, 2011). Ryu und Kollegen zeigten, dass eine aberrante Expression dieses Proteins bei Krebspatienten als signifikanter

Marker für besonders aggressive Tumoren angesehen werden kann (Ryu *et al.*, 2011). Neben *Vimentin* konnten in der vorliegenden Arbeit weitere EMT-assoziierte Marker wie *COL5A2*, *EGFR*, *MSN*, *PDGFRB* und *Twist* auf CTCs nachgewiesen werden. Laut Asiedu führte eine Zellbehandlung mit TGF- α und - β (*transforming growth factor- α* und - β) zum mesenchymalen Phänotyp mit erhöhter *COL5A2*-Transkriptionsaktivität (Asiedu *et al.*, 2011). Überdies scheint dem EGFR-Signalweg eine Schlüsselfunktion im Metastasierungsprozess bzw. der Tumorprogression zuzukommen (Verbeek *et al.*, 1998; Bruns *et al.*, 2000; Matsou *et al.*, 2003; Tsuji *et al.*, 2008). Im Einklang mit den Arbeiten von Verbeek, Bruns, Matsou und Tsuli *et al.* konnte eine gesteigerte *EGFR*-Transkription auf Tumorzellen beobachtet werden. Die Stimulation von epithelialen Brustkrebszellen mit EGF führte zudem zu erhöhter *Twist*-Transkription (Lo *et al.*, 2007). Unterstützt durch die eigenen Ergebnisse konnte *Twist* als Regulator für EMT-kennzeichnende Prozesse bereits beschrieben werden, wobei eine Inhibierung von *Twist* zu einer reduzierten Tumorzellmobilität führte (Yang *et al.*, 2004).

EMT-spezifische Differenzierungsvorgänge werden aktuell auch mehrfach in CTCs in klinischen Proben beobachtet (Armstrong *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011; Kallergi *et al.*, 2011; Mego *et al.*, 2011; Raimondi *et al.*, 2011), was die Relevanz der *in vivo*-Tumormodelle unterstützt. Armstrong *et al.* konnten epithelial-mesenchymale CTC-Mischpopulationen mit stammzellspezifischen Markern im Blut von Krebspatienten nachweisen. In Übereinstimmung zu den eigenen Befunden zeigen die Daten von Kallergi und Kollegen ebenfalls eine Hinaufregulation von *Vimentin* und *Twist* als Marker für EMT in CTCs (Kallergi *et al.*, 2011). Studien von Chandra, Thurm und Rao *et al.* verdeutlichen hingegen den Verlust von epithelialen Eigenschaften der zirkulierenden bzw. disseminierten Tumorzellen (Thurm *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2005). Chandra und Kollegen konnten eine 10-fache Reduzierung des EpCAMs auf CTCs im Vergleich zum Primärtumor oder Metastasen beobachten (Chandra *et al.*, 2005). In Ergänzung dazu waren Königsberg und Kollegen in der Lage, über eine EpCAM-unabhängige Methode deutlich mehr CTCs in Blutproben von Brustkrebspatienten zu detektieren als über eine EpCAM-abhängige Methode (69,2 % vs. 42,3 %). Als Ergebnis der Studie postuliert Königsberg, den prognostischen Wert aller CTC-Populationen zu untersuchen (Königsberg *et al.*, 2011).

Die EpCAM-positiven Zellen scheinen daher nur einen geringen Anteil der gesamten CTC-Population im Blut der Krebspatienten auszumachen, weshalb sich der alleinige Nachweis von CTCs über epithelzellspezifische Antikörper als ungenügend darstellt.

Alternativ können Antikörper gegen mesenchymale Oberflächenmoleküle wie z.B. EGFR oder N-Cadherin zur Anreicherung der CTCs in Kombination mit epithelialen Markern verwendet werden. N-Cadherin stimuliert die Migration und Invasion von Zellen, wobei die Überexpression dieses Markers als Faktor für EMT-kennzeichnende Prozesse bereits beschrieben werden konnte (Nakajima *et al.*, 2004). Zudem wurde eine Expression von N-Cadherin auf CTCs von Armstrong und Kollegen bereits gezeigt, was die Nutzung dieses Proteins als möglichen Detektionsmarker belegt (Armstrong *et al.*, 2011).

Neben den antikörperabhängigen Verfahren lassen sich CTCs z.B. auch über den Vita Assay (Paris *et al.*, 2009) oder den EPISPOT nachweisen (Alix-Panabieres *et al.*, 2009), wobei über diese Verfahren markerunabhängig vitale Tumorzellen im Blut der Patienten nachgewiesen werden. Vitale CTCs sind für die Verbreitung des Tumors unerlässlich (Wagner und Müller, 2010) und bieten den Vorteil, dass aktivierte Signalwege der Zellen biochemisch untersucht werden können, was für die Etablierung der personalisierten Medizin strategisch genutzt werden kann. Zum Überleben müssen migrierende Zellen Mechanismen entwickeln, um den programmierten Zelltod (Apoptose) zu umgehen. Im Tiermodell konnte bereits die Induzierung des anti-Apoptosemarkers *Bcl-2* (*B-cell lymphoma-2*) in CTCs dokumentiert werden (Helzer *et al.*, 2009). Vitale CTCs ließen sich in der eigenen Arbeit allerdings nur mit einer Wiederfindungsrate von 6 % über den EPISPOT detektieren.

Ergänzend bietet die CTC-Selektion über die Zellgröße (ISET) eine vielversprechende Lösung für den Nachweis der Tumorzellen, wobei weitere Studien die Relevanz dieses Verfahrens eingehender darstellen müssen, um die Funktionalität der Methode für den klinischen Alltag zu gewährleisten (Sun *et al.*, 2011).

Die Nutzung von CTCs als pharmakodynamische Biomarker konnte über den qualitativen CTC-Nachweis leider nicht erbracht werden, obwohl ein Therapieerfolg über die Schrumpfung des Tumors im Tiermodell zu beobachten war. Allerdings

konnte das Ansprechen der Therapie anhand der Reduzierung der *Vimentin*-Transkription auf den CTCs beobachtet werden, wobei die Regulation von *Vimentin* über den MEK-Signalweg bereits beschrieben wurde (Ozawa *et al.*, 2006). Möglicherweise hätte eine quantitative Analyse der CTC-Zahlen den Erfolg der Therapie detaillierter abbilden können. Dieses wurde aber aufgrund der geringen CTC-Zahlen und der seltenen positiven Ereignisse, die über diese Methode nachgewiesen werden konnten, für nachfolgende Studien nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden zum Nachweis der zirkulierenden Tumorzellen im präklinischen Modell *ex vivo* - und *in vivo* miteinander verglichen werden. Es zeigte sich, dass CTCs im Blut der Tiere ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, wodurch ihr Nachweis durch antikörperabhängige Methoden erfolglos blieb. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass neue Ansätze zum Nachweis der CTCs entwickelt werden müssen, die in der Lage sind alle Tumorzellpopulationen im Blut von erkrankten Personen zu detektieren. Nur so ließe sich die Bedeutung der einzelnen Sub-Populationen aufklären. Ferner könnte der Nachweis der gesamten CTC-Population wichtig sein, um die Effizienz der Therapie noch genauer bestimmen zu können. Möglicherweise können CTCs neben ihrer Funktion als „*Response*-“ oder „*Prognosemarker*“ auch als prädiktive Biomarker im klinischen Alltag fungieren, wodurch eine zielgerichtete, personalisierte Therapie der Krebspatienten denkbar wird. CTCs könnten als „flüssige Biopsie“ (*liquid biopsy*) ein detailliertes, genetisches Profil des Tumors widerspiegeln und somit das Ansprechen einer Therapie über die Analyse des Markerprofils spezifisch vorhersagen (van de Stolpe *et al.*, 2011), weshalb der gesicherte Nachweis der gesamten CTC-Population im Blut der Patienten erfolgen muss. Die klinische Relevanz einer „CTC-basierten Behandlungsstrategie“ bleibt jedoch zu klären.

5.2 Zirkulierende, zellfreie Nukleinsäuren

Über bildgebende Verfahren wie der Ultraschalldiagnostik (Sonographie), der Magnetresonanztomographie (MRT), der Computertomographie (CT) oder der Positronenemissionstomographie (PET) lässt sich ein zeitnahes Ansprechen der Krebstherapie in der adjuvanten Situation nur schlecht verfolgen, da mittels dieser Verfahren Rezidive oft erst nach Monaten oder Jahren erkannt werden (Abramson und Mayer, 2011). Dieses Problem könnte möglicherweise über molekulare Untersuchungen von zellfreien Nukleinsäuren aus Blut-, Stuhl- oder Urinproben von Krebspatienten umgangen werden (Alix-Panabieres *et al.*, 2011). Obwohl sich über die Analyse der freien Nukleinsäuren im Gegensatz zu den CTCs keine biochemischen Aktivitäten der Signalwege abbilden lassen, bieten PCR-basierte Verfahren zum Nachweis der freien DNA-Moleküle die Chance erstens den Verlauf der Tumorprogression darzustellen, zweitens prognostische Informationen zu liefern und drittens den Mutationsstatus des Tumors molekular zu charakterisieren, wodurch sich personalisierte Therapieansätze verfolgen ließen.

Der genaue Nutzen der zirkulierenden DNA-Moleküle wird aktuell noch intensiv diskutiert (Fleischhacker und Schmidt, 2006; Jung *et al.*, 2010). Studien von Altimari, Catarino, Sunami, van der Drift und Schwarzenbach *et al.* dokumentieren, dass cfDNA-Konzentrationen in Beziehung zu der Größe des Tumors, dem Stadium oder einer schlechten Prognose stehen können (Altimari *et al.*, 2008; Catarino *et al.* 2008; Sunami *et al.*, 2008; van der Drift *et al.*, 2010; Schwarzenbach *et al.*, 2008). Therapieerfolge konnten ebenfalls über die Quantifizierung der freien Nukleinsäuren in Plasmaproben der Krebspatienten beobachtet werden, wobei konstant bleibende cfDNA-Level im Verlauf der Behandlung als Marker für eine erfolglose Therapie beschrieben wurden (Kumar *et al.*, 2010). In Ergänzung dazu beobachteten Gautschi *et al.* bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom einen Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration und dem fortgeschrittenen Tumorstadium ($P < 0,003$) bzw. der Gesamtüberlebenszeit ($P < 0,001$) (Gautschi *et al.*, 2004). Obwohl in der Literatur unterschiedliche Schwellenwerte für den Nachweis der freien Nukleinsäuren diskutiert werden, bietet die quantitative Analyse die Möglichkeit, dynamische Prozesse der Progression widerzuspiegeln und kann neben Anzeichen für Therapieerfolge zudem Prognosen über die Überlebenszeit der erkrankten

Personen liefern (Jung *et al.*, 2010; Gal *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2006; Gautschi *et al.*, 2004).

Allerdings waren nicht alle Arbeitsgruppen in der Lage, eine eindeutige Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und der Tumorgröße bzw. dem Tumorstadium aufzuzeigen. Jung *et al.* haben bei der Analyse von Prostatakrebspatienten keinen Unterschied zwischen Plasmaproben von gesunden Individuen und Patienten mit lokal begrenzten Tumoren messen können. Eine signifikante Zunahme an freien Nukleinsäuren konnte im Rahmen der Arbeit erst in der metastasierten Situation beobachtet werden (Jung *et al.*, 2004). In Ergänzung dazu konnten Schmidt und Kollegen über die quantitative Amplifikation zellfreier DNA-Moleküle keine Abweichungen zwischen malignen und nicht-malignen Lungenerkrankungen erkennen (Schmidt *et al.*, 2008). Ferner belegt die Zusammenfassung von Rainer und Lam, dass Traumata, Apoplexien oder akute Koronarsyndrome ebenfalls zu erhöhten cfDNA-Werten führen können, was den onkologischen Wert der cfDNA-Messungen in Frage stellen kann (Rainer und Lam, 2006).

Die unterschiedlichen Ergebnisse, die bereits publiziert worden sind, gehen möglicherweise auf die Tatsache zurück, dass bisher keine standardisierte, robuste Technik im Laboralltag zum Nachweis der cfDNA etabliert werden konnte. So kann die Gewinnung der Probe, die Wahl des Antikoagulans, die Durchführung der Zentrifugationsschritte, die DNA-Isolierungsmethode oder auch die Auswahl der zu amplifizierenden Zielsequenz (*target*) das Ergebnis einer Studie beeinflussen (Jung *et al.*, 2010). Die heterogene Datenlage ist unter Umständen auch auf die geringen Patientenzahlen in einigen Studien zurückzuführen, die daher lediglich eine geringe statistische Aussagekraft besitzen.

Basierend auf den unterschiedlichen Studienergebnissen sollte die Relevanz der zirkulierenden Nukleinsäuren im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Tiermodell und in Patientenproben ausführlicher analysiert werden, um die Bedeutung der freien DNA-Moleküle weiter aufzuschlüsseln. Xenograftmodelle haben den Vorteil, dass leicht zwischen „fremd“ und „eigen“ unterschieden werden kann. Daher ließ sich in der eigenen Arbeit die vom Tumor abstammende DNA (ctDNA) verhältnismäßig einfach über die Quantifizierung humaner *Alu*-Sequenzen (Schneider *et al.*, 2002) im Plasma der Xenografts nachweisen, wodurch die Detektion von tumorspezifischen Mutationen umgangen wurde. In Vorversuchen konnten humane DNA-

Konzentrationen bis zu 0,001 ng spezifisch vor dem Hintergrund detektiert werden. Nachfolgende *in vivo*-Studien belegten, dass die Sensitivität des Verfahrens ausreichend war, das Tumorwachstum ab einer Größe von 20 mm² spezifisch verfolgen zu können, wobei kein Unterschied zwischen subkutanen und orthotopen Modellen beobachtet werden konnte. Bisher unveröffentlichte Daten zeigen, dass dieses Verfahren auch longitudinale Messungen im Tiermodell zulässt, wobei 15 µl Plasma ausreichend sind, um den Verlauf der Progression molekular darzustellen (unveröffentlichte Daten, Gorges *et al.*, 2012). Dieses Resultat ist vor allem für die Etablierung von orthotopen Lungen-, Prostata- oder Leberkrebsmodellen von Bedeutung, da sich die Ausweitung des Tumors bei diesen Modellformen optisch nur schwer verfolgen lässt. In Übereinstimmung mit den eigenen Befunden waren Kamat *et al.* ebenfalls in der Lage, eine Korrelation zwischen der Tumormasse und der Konzentration an freien Nukleinsäuren über den Nachweis von humanem β -Aktin in orthotopen Eierstockkrebsmodellen aufzuzeigen (Kamat *et al.*, 2006). In Ergänzung dazu konnten Rago *et al.* das Tumorwachstum über die Amplifikation menschlicher LINE-Sequenzen (*long interspersed nuclear elements-1*) im Tiermodell sensitiv verfolgen (Rago *et al.*, 2007).

Die Nutzung von zirkulierenden, tumorspezifischen DNA-Molekülen als pharmakodynamischen Biomarker konnte im Rahmen der eigenen Arbeit eindeutig demonstriert werden. Tumortragende Versuchstiere, die mit einem MEK-Inhibitor (Bay869766) behandelt wurden, zeigten eine deutliche Tumorschrumpfung, die über die Abnahme der ctDNA-Konzentration im Plasma der Xenografts widerspiegelt werden konnte. Therapieerfolge ließen sich im Tiermodell in Übereinstimmung zu den eigenen Befunden ebenfalls von Kamat und Kollegen beobachten. Kamat *et al.* postulierten daraufhin, dass der Nachweis von tumorspezifischen DNA-Molekülen ein nützlicher Biomarker sein kann, um den Verlauf der Therapie zu beobachten (Kamat *et al.*, 2006). Neben den eigenen Befunden und den Studien von Kamat und Rago *et al.* wurden eine Reihe von Artikeln um die Arbeitsgruppe von Garcia-Olmo und Kollegen veröffentlicht, in denen gezeigt werden konnte, dass sich ctDNA-Konzentrationen in syngenem Rattenmodellen auch über spezifische *KRAS*-Mutationen (*kirsten rat sarcoma viral oncogene*) aufzeichnen ließen. Auch in diesen Studien war es möglich, das Wachstum des Tumors molekularbiologisch zu verfolgen (Garcia-Olmo *et al.*, 2006; Samos *et al.*, 2006; Garcia-Olmo *et al.*, 2008).

Erst kürzlich wurde ein weiterer Nachweis von tumorspezifischen DNA-Molekülen in einem humanisierten Mausmodell veröffentlicht. Thierry *et al.* konnten zeigen, dass sich ctDNA von „nicht-tumor-DNA“ über mutationsspezifische Oligonukleotide gegen *KRAS* oder *PSAT1* (*phosphohydroxythreonine aminotransferase-1*) unterscheiden lassen.

Neben dem Stellenwert als pharmakodynamischer Biomarker kann der spezifische Nachweis von zirkulierenden Tumor-DNA-Molekülen in klinischen Proben ähnlich wie CTCs als „flüssige Biopsie“ entscheidende Hinweise für die Wahl der Therapiestrategie liefern. So können Mutationsanalysen von Onkogenen wie z.B. *KRAS* oder *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) Informationen über das Ansprechen einer Therapie vorhersagen. Antikörper gegen EGFR haben 2008 beim metastasierten Kolorektalkarzinom die Zulassung erhalten, wobei über Mutationsanalysen gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit anti-EGFR-Antikörpern nur bei den Patienten zweckmäßig erscheint, deren Tumor keine Mutation des *KRAS*-Gens aufweist (Dahabreh *et al.*, 2011). *KRAS*-Mutationen konnten bereits über molekulare Analysen der freien Nukleinsäuren im Plasma von Krebspatienten beobachtet werden, was die Bedeutung der ctDNA-Moleküle unter Beweis stellt (Diehl *et al.*, 2008). Die genetische Charakterisierung der zirkulierenden, tumorspezifischen DNA-Moleküle bietet somit einen neuen Ansatz, über den sich individuelle Therapiestrategien schnell und einfach erforschen lassen. Der nicht-invasive Eingriff über die Blutbahn, den Urin oder die Stuhlabgabe, der zur Gewinnung der zirkulierenden DNA angewendet wird, beinhaltet zudem den Vorteil, dass das Markerprofil der Krebserkrankung auch bei Patienten mit „nicht-biopsierbaren Tumoren“ charakterisiert werden kann. Allerdings sind bisher nur wenige Methoden entwickelt worden, welche die vom Tumor abstammenden Moleküle spezifisch vor dem allgemeinen Hintergrund nachweisen können. Die PCR-basierte „BEAMing-Technologie“ könnte dieses Problem umgehen, da sich über dieses Verfahren bereits kleinste Mengen an krebsrelevanten DNA-Molekülen in Patientenproben detektieren lassen (Li *et al.*, 2006; Diehl *et al.*, 2006).

Bei der Analyse der klinischen Proben konnte über die Amplifikation der *Alu*-Sequenzen lediglich die gesamte zellfreie DNA im Plasma der Patienten bestimmt werden. Dennoch konnten in Übereinstimmung zu Catarino *et al.* signifikant erhöhte

cfDNA-Konzentrationen im Plasma von 58 Kopf-Hals-Karzinompatienten im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen werden (Abbildung 4.23; Catarino *et al.* 2008). Allerdings war keine Korrelation zur Größe oder dem Stadium des Tumors erkennbar, was die Beobachtungen von Jung und Schmidt *et al.* stützt (Jung *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2008). Die weitere Analyse von jeweils 20 Brust-, Lungen- oder Prostatakrebspatienten zeigte ebenfalls keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration und klinischen Parametern. Lediglich bei den Proben der Kolonkrebskohorte konnte eine Tendenz in Relation zum Tumorstadium aufgezeigt werden. So wiesen Patienten späterer Stadien höhere cfDNA-Werte auf als Patienten im frühen Stadium. Zusätzlich war bei dieser Kohorte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Metastasierungsstatus und der cfDNA-Konzentration zu erkennen, da Patienten, die positiv für Metastasen waren, auch die höchsten cfDNA-Werte aufwiesen. Diese Befunde gehen einher mit den Resultaten von Jung und Kollegen, die ebenfalls erhöhte cfDNA-Signale in der metastasierten Situation beobachten konnten (Jung *et al.*, 2004). Größere und langfristige Studien müssten nun zeigen, ob erstens die gemessenen cfDNA-Werte in Korrelation zur Überlebenszeit der erkrankten Menschen stehen und zweitens sich klinische Therapieerfolge in Übereinstimmung zu den Tiermodellen über die Quantifizierung der *Alu*-Sequenzen abbilden lassen. Die Kohorte der Kopf-Hals-Karzinompatienten steht für die Beantwortung dieser Fragestellung weiterhin unter Beobachtung.

Zusammenfassend konnte im zweiten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit die Tumorprogression in Xenografts über die Quantifizierung zirkulierender tumorspezifischer DNA-Moleküle im Plasma verfolgt werden. Ferner zeigten die *in vivo*-Studien, dass kein Unterschied zwischen subkutanen und orthotopen Brustkrebsmodellen bestand. In einem Behandlungsversuch konnte weiterhin durch die molekulare Quantifizierung der zirkulierenden Tumor-DNA die Tumorschrumpfung verfolgt werden. Die Analyse der ctDNA über die Vervielfältigung der humanen *Alu*-Sequenzen bietet demnach die Möglichkeit, neue Therapieverfahren präklinisch zu validieren.

In klinischen Proben wurden signifikant erhöhte cfDNA-Konzentrationen im Plasma von Krebspatienten nachgewiesen. Allerdings konnte über die Amplifikation der *Alu*-

Sequenzen lediglich in der Kohorte der Kolonkrebspatienten ein Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der Metastasierung aufgezeigt werden.

Ergänzende Studien müssen zeigen, ob die cfDNA-Werte über die Vervielfältigung der *Alu*-Sequenzen Erfolge oder Misserfolge einer Therapie widerspiegeln können. Weiterhin bleibt die prognostische Relevanz der gemessenen cfDNA-Werte in den klinischen Proben zu klären, wobei die Kohorte der Kopf-Hals-Karzinompatienten für dieses Vorhaben noch unter Beobachtung steht.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Version

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs), zellfreie Nukleinsäuren (cfDNA) oder tumorspezifische DNA-Moleküle (ctDNA) können entscheidende Informationen für die Diagnostik, die Therapieüberwachung und die Prognoseeinschätzung von Krebspatienten liefern. Die tumorspezifischen Biomarker (CTCs und ctDNA) können zudem als „flüssige Biopsie“ eine Alternative zur herkömmlichen Charakterisierung von Tumorzellen aus Gewebeproben sein und ermöglichen demzufolge auch molekularbiologische Untersuchungen von „nicht-biopsierbaren“ Patienten, wodurch individuelle Therapiestrategien gewählt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Verfahren für den CTC-Nachweis im Blut von präklinischen Xenograftmodellen miteinander verglichen. Es kann gezeigt werden, dass mobile und metastasierte Tumorzellen Prozesse durchlaufen, die den Verlust von epithelialen Markern wie z.B. EpCAM oder MUC-1 beinhalten, weshalb ein CTC-Nachweis über epitheliale Oberflächenmoleküle im Vergleich zu antigenunabhängigen Methoden *in vivo* erfolglos bleibt. Darüber hinaus kann in Übereinstimmung zur klinischen Situation die Induzierung von mesenchymalen Markern wie *EGFR* oder *Twist* auf CTCs gezeigt werden. Da im klinischen Alltag zahlreiche Verfahren zum Nachweis der CTCs auf dem Prinzip der „epithelialen Selektion“ basieren, müssen demzufolge neue Strategien entwickelt werden, die zusätzlich auch mesenchymale CTC-Populationen im Blut der Patienten detektieren können. Die Wirkung von Arzneistoffen kann über qualitative CTC-Messungen im Tiermodell nicht verfolgt werden. Allerdings kann der Erfolg einer Therapie über die molekulare Analyse der tumorspezifischen DNA-Moleküle im Plasma der Xenografts gemessen werden. Über die Bestimmung der humanen, zellfreien Nukleinsäuren lassen sich DNA-Moleküle im Plasma der Tiere nachweisen, die die Progression des Tumors molekular abbilden, wobei kein Unterschied zwischen subkutanen und orthotopen Modellen zu erkennen ist. Signifikant erhöhte Konzentrationen an zellfreien Nukleinsäuren können zudem auch im Plasma von Krebspatienten im Vergleich zu Proben von gesunden Individuen nachgewiesen werden. Plasmaproben der Kolonkrebsskohorte zeigen überdies eine Korrelation zwischen der cfDNA-Menge und dem Metastasesstatus, was die Bedeutung der cfDNA-Quantifizierung in Humanproben demonstriert.

6.2 Englische Version

Circulating tumor cells (CTCs), circulating cell-free DNA (cfDNA), or tumor-specific cell-free DNA-molecules (ctDNA) have been suggested as cancer biomarkers. These biomarkers might give useful information as diagnostic, prognostic, and monitoring markers in cancer patients. In addition, tumorspecific CTCs or ctDNA-molecules may be used as “liquid biopsy” for molecular targeted agents, enabling the identification of patients who will most likely respond to a given treatment.

In this work the performance of different protocols for CTC detection were established (*ex vivo*) and used for blood sample analysis of murine breast cancer xenograft models (*in vivo*). It was possible to show that tumor cells which detached from the primary tumor undergo molecular processes *in vivo*. These modifications include the down regulation of epithelial markers, like EpCAM or MUC-1. The use of EpCAM-based enrichment techniques lead to the loss of CTC populations having undergone EMT. However, the presence of CTCs could be demonstrated by antibody-independent detection methods. Moreover, in accordance to the clinical situation, it could be shown that CTCs up regulate mesenchymal markers, like *EGFR* or *Twist* while circulating through the bloodstream. As numerous techniques for CTC detection in clinical practice are based on epithelial markers, new strategies have to be developed which have to detect mesenchymal-like CTC populations, as well. Further, qualitative measurement of CTCs does not reflect efficacy of the therapy in animal models of breast cancer. However, success of therapy can be monitored targeting tumorspecific cell-free DNA-molecules in plasma samples gained from the used xenografts. This approach was successfully used for subcutaneous or orthotopic models.

In addition, significantly increased concentrations of cell-free nucleic acids could be detected in plasma of cancer patients compared to healthy individuals. Plasma samples of colorectal cancer patients also indicated a correlation between the quantity and the appearance of metastasis, demonstrating the potential relevance of cfDNA in human samples for the use in the clinical setting.

7 Literaturverzeichnis

1. Abramson VG, Mayer IA. Clinical Utility of Serum Tumor Markers and Circulating Tumor Cell Assays in the Treatment of Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2011 Sep 15. [Epub ahead of print].
2. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R46. Epub 2009 Jul 9.
3. Aktas B, Tewes M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Molecular profiling of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients provides information on therapy response, epithelial mesenchymal transition and tumor stem cell metabolism. *San Antonio Breast Cancer Symposium 2010*.
4. Alix-Panabières C, Vendrell JP, Slijper M, Pellé O, Barbotte E, Mercier G, Jacot W, Fabbro M, Pantel K. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):R39. Epub 2009 Jun 23.
5. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2011 Jan 26. [Epub ahead of print].
6. Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, Morselli-Labate AM, Martorana G, Grigioni WF, Fiorentino M. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008 May;129(5):756-62.
7. Ameri K, Luong R, Zhang H, Powell AA, Montgomery KD, Espinosa I, Bouley DM, Harris AL, Jeffrey SS. Circulating tumour cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype. *Br J Cancer*. 2010 Feb 2;102(3):561-9. Epub 2010 Jan 5.
8. Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, Fritsche HA, Cristofanilli M. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *Int J Cancer*. 2011 Apr 5. doi: 10.1002/ijc.26111. [Epub ahead of print].

9. Antolovic D, Galindo L, Carstens A, Rahbari N, Büchler MW, Weitz J, Koch M. Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies. *BMC Biotechnol.* 2010 Apr 28;10:35.
10. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting R, Turnbull J, Herold CI, Marcom PK, George D und Garcia-Blanco M. Circulating Tumor Cells from Patients with Advanced Prostate and Breast Cancer Display Both Epithelial and Mesenchymal Markers. *Mol Cancer Res* Published OnlineFirst June 10, 2011.
11. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J* 1869; 14:146-7.
12. Asiedu M K, James N. Ingle, Marshall D. Behrens, Derek C. Radisky, Keith L. Knutson. TGF β /TNF α -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Breast Cancer Stem Cells with a Claudin-Low Phenotype. *Cancer Res* Published OnlineFirst, 2011. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4554.
13. Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, van der Kooi A, Tibbe AG, Doyle GV, Terstappen LW, Bauernhofer T. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005 Nov;68(1):25-30.
14. Barok M, Tanner M, Köninki K, Isola J. Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer. *Cancer Lett.* 2011 Jul 28;306(2):171-9. Epub 2011 Apr 1.
15. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* 2002 May;3(5):370-9. Review.
16. Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA As a Possible Factor In Oncogenesis. *Science.* 1965 Apr 16;148:374-6.
17. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, Gilles C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15(2):261-73. Epub 2010 May 7. Review.
18. Bonnomet A, Syne L, Brysse A, Feyereisen E, Thompson EW, Noël A, Foidart JM, Birembaut P, Polette M, Gilles C. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast

- cancer. *Oncogene*. 2011 Nov 28. doi: 10.1038/onc.2011.540. [Epub ahead of print].
19. Brandt B, Schmitt H, Feldner J. C, Lelle RJ, Semjonow, und Beckmann A. Blood-borne cancer cells--quo vadis? *Int J Biol Markers* 2000; 15:111-3.
 20. Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, Ozawa S, Tsan R, Fan D, Abbruzzese J, Traxler P, Buchdunger E, Radinsky R, Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 2000 Jun 1;60(11):2926-35.
 21. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Nov 1;12(21):6403-9.
 22. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, Medeiros R. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2008 Aug;27(8):415-21.
 23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). State-specific trends in lung cancer incidence and smoking--United States, 1999-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011 Sep 16;60(36):1243-7.
 24. Chandra G. Rao, David Chianese, Gerald V. Doyle, M. Craig Miller, Thomas Russell, Renouard A. Sanders, Leon W.M.M. Terstappen. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *International Journal of Oncology*. July 2005. Volume 27, Number 1. Pages: 49-57.
 25. Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug;1137:218-21.
 26. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW and Meropol NJ. Prognostic significance of circulating tumour cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Onc* 2009; 20:1223-9.
 27. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW and Hayes DF. Circulating tumour

- cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer. *New Engl J Med* 2004; 351:781-91.
28. Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, und Mansel RE. Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol* 2002; 17, 863-70.
29. Dahabreh IJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2011 Jan 4;154(1):37-49.
30. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ and Raghavan D. Circulating tumour cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Canc Res* 2008; 14:6302-9.
31. Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Bähr G, Gires O. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer.* 2009 Nov 19;9:402.
32. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16368-73. Epub 2005 Oct 28.
33. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods.* 2006 Jul;3(7):551-9.
34. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, Kinzler KW, Vogelstein B. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology.* 2008 Aug;135(2):489-98. Epub 2008 May 15.
35. Effenberger KE, Schroeder C, Eulenburg C, Reeh M, Tachezy M, Riethdorf S, Vashist YK, Izbicki JR, Pantel K, Bockhorn M. Disseminated tumor cells in pancreatic cancer - an independent prognosticator of disease progression and survival. *Int J Cancer.* 2011 Sep 19. doi: 10.1002/ijc.26439. [Epub ahead of print].
36. Eliane JP, Repollet M, Luker KE, Brown M, Rae JM, Dontu G, Schott AF, Wicha M, Doyle GV, Hayes DF, Luker GD. Monitoring serial changes in circulating human breast cancer cells in murine xenograft models. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5529-32.

37. Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewczyńska E, Pieńkowski T, Siedlecki JA. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol* 2004, 51(3):747–755.
38. Fan T, Zhao Q, Chen JJ, Chen WT und Pearl MN. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* (2008), doi:10.1016/j.ygyno.2008.09.021.
39. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987; 238:193-197.
40. Fidler IJ. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. *Eur J Cancer* 1973; 9:223-227.
41. Fidler IJ. Metastasis. Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labelled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45:773-782.
42. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3, 453–458.
43. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1141-5.
44. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1775(1):181-232. Epub 2006 Oct 7. Review.
45. Flores L, Kindelberger D, Ligon A, Cappelletti M, Fiorentino M, Loda M, Cibas E, Janne P and Krop I. Comparison of the Cellsearch Profile Kit (CPK) with the Standard Cellsearch Epithelial Kit (CEK) Demonstrates the CPK Produces Higher Circulating Tumor Cell (CTC) Yields and Is Better Suited for Use in Obtaining CTC's for Molecular Characterization. *Cancer Research: December 15, 2009; Volume 69, Issue 24, Supplement 3* doi: 10.1158/0008-5472.SABCS-09-3003.
46. Francis E. Sharkey and Jørgen Fogh. Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Reviews* 3,341-360 (1984). 1984, Martinus Nijhoff Publishers, Boston. Printed in the Netherlands.

47. Gahan PB, Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:1-6.
48. Gal S, Fidler C, Lo YM, Taylor M, Han C, Moore J, Harris AL, Wainscoat JS. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br J Cancer.* 2004 Mar 22;90(6):1211-5.
49. Galatea Kallergi, Maria A Papadaki, Eleni Politaki, Dimitris Mavroudis, Vassilis Georgoulas und Sophia Agelaki. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 2011, 13:R59.
50. García-Olmo DC, Gutiérrez-González L, Samos J, Picazo MG, Atiénzar M, García-Olmo D. Surgery and hematogenous dissemination: comparison between the detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma before and after tumor resection in rats. *Ann Surg Oncol.* 2006 Aug;13(8):1136-44. Epub 2006 Jul 24.
51. García-Olmo DC, Samos J, Picazo MG, Asensio AI, Toboso I, García-Olmo D. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats. *Cancer Lett.* 2008 Dec 8;272(1):133-40. Epub 2008 Aug 15.
52. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2004 Oct 15;22(20):4157-64.
53. Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull.* 2010;94:49-64. Epub 2010 Apr 23.
54. Goddard KA, Weinmann S, Richert-Boe K, Chen C, Bulkley J, Wax C. HER2 Evaluation and Its Impact on Breast Cancer Treatment Decisions. *Public Health Genomics.* 2012;15(1):1-10. Epub 2011 May 3.
55. Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y, Shimoda Y, Yagata H, Yoshida A, Ota H, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Ueno NT. Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2011 Jun 15. [Epub ahead of print].
56. He H, Yang X, Davidson AJ, Wu D, Marshall FF, Chung LW, Zhau HE, Wang R. Progressive epithelial to mesenchymal transitions in ARCaP E prostate

- cancer cells during xenograft tumor formation and metastasis. *Prostate*. 2010 Apr 1;70(5):518-28.
57. Helzer KT, Barnes HE, Day L, Harvey J, Billings PR, Forsyth A. Circulating tumor cells are transcriptionally similar to the primary tumor in a murine prostate model. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7860-6. Epub 2009 Sep 29.
58. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, Vénissac N, Mouroux J, Vielh P, Hofman P. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*. 2011 Oct 1;129(7):1651-60. doi: 10.1002/ijc.25819. Epub 2011 Mar 11.
59. Holzapfel B. und Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) ©2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. DOI:10.1002/biuz.200610332.
60. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabières C, Pantel K. Molecular mechanisms of metastasis. *Journal of Surgical Oncology* 2011; 103:508-517.
61. Hui-Wen Lo, Sheng-Chieh Hsu, Weiya Xia, Xinyu Cao, Jin-Yuan Shih, Yongkun Wei, James L. Abbruzzese, Gabriel N. Hortobagyi und Mien-Chie Hung. Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression. [*Cancer Res* 2007;67(19):9066–76].
62. Ivaska J. Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small Gtpases*. 2011 Jan;2(1):51-53.
63. Jackson DB, Sood AK. Personalized cancer medicine-advances and socio-economic challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Oct 11. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.151. [Epub ahead of print].
64. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1659-65.
65. Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, Nitta H, Sato T, Miyachi M, Suzumura K, Yamashita J. Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means

- of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery* 2004; 135(4): 419-26.
66. Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Loening SA, Schnorr D. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2004 Mar 18;205(2):173-80.
67. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker - a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11;411(21-22):1611-24. Epub 2010 Aug 2. Review.
68. Kagan M, Howard D, Bendele T, Mayes J, Silvia J, Repollet M, Doyle J, Allard J, Tu N, Bui T, Russell T, Rao C, Hermann M, Rutner H, Terstappen LWMM. A Sample Preparation and Analysis System for Identification of Circulating Tumor Cells. *J Clinical Ligand Assay* 25: 104-110, 2002 (a.).
69. Kagan M, Diamandis EP, Fritsche HA: Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical applications. Washington, D.C.: AACC Press; 2002, 405-409 (b.).
70. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011 Jun 10;13(3):R59.
71. Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, Baldwin MF, Han LY, Lin YG, Merritt WM, Landen CN Jr, Lu C, Gershenson DM, Simpson JL, Sood AK. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006 Oct;5(10):1369-74. Epub 2006 Oct 26.
72. Killion J, Radinsky R and Isaiah Fidler J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 279–284, 1999. © 1999 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
73. Klein CA. The biology and analysis of single disseminated tumour cells. *Trends Cell Biol* 10, 2000; 489-93.
74. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med.* 15;317(16):985-90; 1987.

75. Korabecna M, Opatrna S, Wirth J, Rulcova K, Eiselt J, Sefrna F, Horinek A. Cell-free plasma DNA during peritoneal dialysis and hemodialysis and in patients with chronic kidney disease. *nn N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:296-301.
76. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudec M, Dittrich C. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011 Jun;50(5):700-10. Epub 2011 Jan 24.
77. Krantz SB, Shields MA, Phil M, Dangi-Garimella S, Munshi HG und Bentrem DJ. Contribution of Epithelial-to-Mesenchymal and Cancer Stem Cells to Pancreatic Cancer Progression. *Journal of Surgical Research*, 1–8 (2011) doi:10.1016/j.jss.2011.09.020.
78. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer.* 2010 Nov;70(2):211-7. Epub 2010 Feb 23.
79. Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Tsuji S, Ishii K, Ikeuchi N, Tsuchida A, Kasuya K, Kawai T, Sakai Y, Moriyasu F. Detction of circulating tumour cells in patients with pancreatic cancer; a preliminary result. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15:189–195.
80. Lagoudianakis EE, Katakis A, Manouras A, Memos N, Papadima A, Derventzi A, Zografos G, Papadopoulos S, Katergiannakis V, Konstadoulakis MM. Detection of epithelial cells by RT-PCR targeting CEA, CK20, and TEM-8 in colorectal carcinoma patients using OncoQuick density gradient centrifugation system. *J Surg Res.* 2009 Aug;155(2):183-90.
81. Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG, Top B, Perebolte L, van' t Veer LJ, Rodenhuis S. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999, 56(3):219–231.
82. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria J C und Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *British*

- Journal of Cancer advance online publication 4 October 2011; doi: 10.1038/bjc.2011.405.
83. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, und Thompson EW. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *JCB: MINI-REVIEW*. Published March 27, 2006.
 84. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar;37(3):646-50.
 85. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods.* 2006 Feb;3(2):95-7.
 86. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem.* 2011 Sep;57(9):1242-55. Epub 2011 Jul 22. Review.
 87. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan;64(1):218-24.
 88. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via upregulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9066-76.
 89. Lobodasch K, Fröhlich F, Rengsberger M, Schubert R, Dengler R, Pachmann U, Pachmann K. Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse. *Breast.* 2007 Apr;16(2):211-8. Epub 2007 Feb 8.
 90. Lu J, Fan T, Zhao Q, Zeng W, Zaslavsky E, Chen JJ, Frohman MA, Golightly MG, Madajewicz S, Chen WT. Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2010 Feb 1;126(3):669-83.
 91. Ma J, Lin JY, Alloo A, Wilson BJ, Schatton T, Zhan Q, Murphy GF, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Stephen Hodi F, Frank NY, Frank MH. Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov 26;402(4):711-7. Epub 2010 Oct 25.

92. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* 2009 Feb;11(2):162-71. Epub 2009 Jan 11.
93. Mandel P und Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948;142:241-243.
94. Matsuo M, Sakurai H, Saiki I. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antimetastatic activity using a hepatocellular carcinoma model. *Mol Cancer Ther.* 2003 Jun;2(6):557-61.
95. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 2010 Jun;24(6):1838-51. Epub 2010 Jan 22.
96. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM. Significance of circulating tumour cells detected by the cell search system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *J Oncology* 2010; 2010:617421.
97. Minchin RF, Carpenter D, Orr RJ. Polyinosinic acid and polycationic liposomes attenuate the hepatic clearance of circulating plasmid DNA. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Mar;296(3):1006-12.
98. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
99. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
100. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Utkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA and Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology, *Nature* 2007; 450:1235-9.
101. Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):4125-33.
102. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schünemann S und Höffken K. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Research* 2005, 7:R975-R979 (DOI 10.1186/bcr1328)

103. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Höffken K. Monitoring the response of circulating epithelial tumour cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Onc* 2008;26:1208-14.
104. Pantel K, and Otte M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells", *Semin Cancer Biol* 11, 2001; 327-37.
105. Pantel K und Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.001 *Trends in Molecular Medicine* 16 2010; 398-406
106. Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR und Riethmuller G. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies, *Chirurg* 68, 1997; 1241-50.
107. Paris PL, Kobayashi Y, Zhao Q, Zeng W, Sridharan S, Fan T, Adler HL, Yera ER, Zarrabi MH, Zucker S, Simko J, Chen WT, Rosenberg J. Functional phenotyping and genotyping of circulating tumor cells from patients with castration resistant prostate cancer. *Cancer Lett.* 2009 May 18;277(2):164-73. Epub 2009 Jan 21.
108. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, Khan ZA, Araia R, Glover C, Henry MM und Allen-Mersh TG. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg* 2002; 235(2): 226-31.
109. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, Pirzkall A, Fine BM, Amler LC, Chen DS, Lackner MR. Molecular biomarker analyses using circulating tumour cells. *PloS one* 2010; 5:1-11.
110. Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N, Samuels Y, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW, Diaz LA Jr. Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9364-70.
111. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from

- breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(2):449-55. Epub 2011 Feb 5.
112. Rainer TH, Lam NY. Circulating nucleic acids and critical illness. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:271-7. Review.
113. Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr, Terstappen LW. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol.* 2005 Jul;27(1):49-57.
114. Ren N, Ye QH, Qin LX, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 28;12(24):3911-4.
115. Robert-Koch-Institut (RKI). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6 überarb. Auflage. Berlin: Robert Koch Institut; 2008.
116. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood.* 1993 Nov 1;82(9):2605-10.
117. Royer C, Lu X. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? *Cell Death Differ.* 2011 Sep;18(9):1470-7. doi: 10.1038/cdd.2011.60. Epub 2011 May 27. Review.
118. Ryu HS, Park DJ, Kim HH, Kim WH, Lee HS. Combination of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes has independent prognostic value in gastric cancer. *Hum Pathol.* 2011 Oct 20. [Epub ahead of print].
119. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239,487-491.
120. Samos J, García-Olmo DC, Picazo MG, Rubio-Vitaller A, García-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma/serum and tumor progression: are apoptotic bodies involved? An experimental study in a rat cancer model. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:165-73.

121. Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and nonmalignant lung disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:207-13.
122. Schmitt M und Foekens JA. Circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients assessed by a novel RT-PCR test kit and comparison with status of bone marrow-disseminated tumor cells.
123. Schmoll HJ und Arnold D. Kolorektales Karzinom. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K, eds. *kompndium Internistische Onkologie.* 4 Aufl. Heidelberg: Springer 2006; 3787-3937.
124. Schneider T, Osl F., Friess T., Stockinger H & Scheuer W. V. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR - an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clinical & Experimental Metastasis* 19: 571–582, 2002.
125. Schueler J: Entwicklung und Charakterisierung humaner Tumormodelle durch orthotope Implantation. Dissertation, FU Berlin, 1999.
126. Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, Pantel K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):1032-8.
127. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jun;11(6):426-37. Epub 2011 May 12. Review.
128. Shigeyuki O, Yasumasa K, Reika K, Yojiro M, Eiro K und Ryu-Ichiro H. BRAK/CXCL14 expression suppresses tumor growth in vivo in human oral carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (2006) 406–412.
129. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J , van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JWM, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule Antibodies and the Detection of Circulating Normal-Like Breast Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 61 - 66.
130. Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2011 Mar;10(3):299-306.
131. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating

- DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 1;21(21):3902-8. Epub 2003 Sep 24.
132. Sprent J: Migration and Lifespan of Circulating B-Lymphocytes of Nude (nu/nu) Mice. In: Proc. First Intern. Workshop Nude Mice G. Fischer Verlag, New York, Stuttgart, 1974, S. 11–12.
133. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002, 20(16): 3404-12.
134. Statistisches Bundesamt. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2005 [online]. 18.10.2006, accessed 09.09.2007: <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.html>.
135. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P. Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;945:258-64.
136. Strube A, Hoffmann J, Stepina E, Hauff P, Klar U, Käkönen SM. Sagopilone inhibits breast cancer bone metastasis and bone destruction due to simultaneous inhibition of both tumor growth and bone resorption. *Clin Cancer Res* 2009;15:3751-3759. Published online May 26, 2009. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-3123.
137. Sun YF, Yang XR, Zouh J, Qiu SJ, Fan J und Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137:1151-1173.
138. Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Giuliano AE, Hoon DS. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug;1137:171-4.
139. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Sep;1075:191-6.
140. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients

- with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jun;115(3):581-90.
141. Thurm H, Ebel S, Kentenich C, Hensen A, Riethdorf S, Coith C, Wallwiener D, Braun S, Oberhoff C, Jänicke F, Pantel K. Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2598-604.
142. Tomasi T, Bollmann A, Theil G, Weber E, Mengele K, Reuning U, Budna J, Dworacki G, Dyszkiewicz W, Schmitt M, Lücke K. In vivo isolation of rare circulating tumor cells. GILUPI GmbH, Am Mühlenberg 11, 14476 Potsdam, (Poster) Germany 2010.
143. Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumour cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10377-86.
144. Valastyan S und Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. DOI 10.1016/j.cell.2011.09.024.
145. van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, Elst HJ, Van Laere SJ, Prové A, Maes H, Huget P, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 2010 Jan 19;102(2):276-84. Epub 2009 Dec 1.
146. van der Drift MA, Hol BE, Klaassen CH, Prinsen CF, van Aarssen YA, Donders R, van der Stappen JW, Dekhuijzen PN, van der Heijden HF, Thunnissen FB. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010 May;68(2):283-7. Epub 2009 Jul 25.
147. van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):1913-21. Epub 2010 Sep 13. Review.
148. van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res.* 2011 Sep 15; 71(18):5955-60. Epub 2011 Sep 6.

149. van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res.* 2011 Jul-Oct;728(1-2):23-34. Epub 2011 May 12.
150. Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, Beckers T, Rijksen G. Overexpression of EGFR and c-erb2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 1998; 425:145-50.
151. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchot C, Paterlini-Bréchot P. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol.* 2000 Jan; 156(1):57-63.
152. Vona G, Estepa L, Bérout C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, Mineur A, Franco D, Lacour B, Pol S, Bréchot C, Paterlini-Bréchot P. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology.* 2004 Mar;39(3):792-7.
153. Wagner C und Müller O. *Molekulare Onkologie.* 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage. 2010 Georg Thieme Verlag KG. ISBN 978-3-13-103513-4.
154. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA; Committee of the National Cancer Research Institute. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102, 1555-1577.
155. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, Stathopoulos EN, Chlouverakis G, Lianidou E, Kakolyris S, Georgoulas V and Mavroudis D. Cytokeratin-19 mRNA positive Circulating Tumour Cells after adjuvant therapy in patients with early breast cancer. *J Clin Onc* 2009; 27:2177-84.
156. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008 Jun;14(6):818-29. Review.
157. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumour metastasis. *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):927-39.

158. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol.* 2011 Feb 7;192(3):373-82. Review.
159. Zieglschmid V., C. Hollmann, and O. Böcher. Detection of Disseminated Tumor cells in Peripheral Blood. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 42(02):155–196 (2005). DOI: 10.1080/10408360590913696.
160. Zwiefel K, Janni W. Current standards in the treatment of breast cancer. *Med Monatsschr Pharm.* 2011 Aug;34(8):280-88; quiz 289-90.

Abkürzungen, Fremdwörter und Symbole

♂ / ♀	männlich / weiblich
≥	größer gleich
Δ	delta
<i>ad libitum</i>	„nach Belieben“
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
bp	Basenpaare
<i>Breast</i>	Brust
ca.	circa
COL5A2	<i>collagen alpha-2(V) chain</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cfDNA	<i>cell-free DNA</i> (zellfreie DNA)
ctDNA	<i>circulating tumor DNA</i> (zirkulierende Tumor DNA)
CK	Zytokeratin
CTC	<i>circulating tumor cell</i> (Zirkulierende Tumorzelle)
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	<i>deoxyribonuklease</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EPISPOT	<i>Epithelial-Immuno-SPOT</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
<i>et al.</i>	„und andere“ (<i>et alii</i>)
<i>ex vivo</i>	„außerhalb des Lebendigen“
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin-embedded tissue</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>for</i>	<i>forward</i> (vorwärts)
FOXP1	<i>forkhead box protein-N1</i>
F11R	<i>junctional adhesion molecule-A</i>
g	Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	<i>glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase</i>
GSF	Sephadex Gelfiltration
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IL1RN	<i>interleukin-1 receptor antagonist</i>
<i>in vitro</i>	„im Glas“
<i>in vivo</i>	„im Lebendigen“
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolge</i>
KRT	Zytokeratin
l	Liter
mM	Millimolar
ml	Milliliter
MUC-1	Muzin-1
MSN	Moesin
nm	Nanomolar
OCLN	Occludin
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit 0,1 % Tween-20
PCR	<i>polymerase-chain reaction</i>
PDGFRB	<i>beta type platelet derived growth factor receptor</i>
p.o.	„über den Mund“ (<i>per os</i>)
PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase-A</i>
PTK2	<i>protein tyrosine kinase-2</i>

Abkürzungen, Fremdwörter und Symbole

RBC	<i>red blood cell</i>
RBCL	<i>RBC lysis solution</i>
<i>rev</i>	<i>reverse</i> (rückwärts)
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.c.	subkutan (unter die Haut)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP1	<i>osteopontin</i>
SSC	Sodium-Zitrat-Puffer
T	Temperatur (°C)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS mit Tween-20
TCF3	<i>transcription factor-3</i>
<i>template</i>	Vorlage / Matrize
TFPI2	<i>tissue factor pathway inhibitor-2</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TNF- α	<i>transforming-growth-factor-α</i>
USA	<i>United States of America</i>
VPS13A	<i>vacuolar protein sorting associated protein-13A</i>
vs.	<i>versus</i> (gegen)
WB	Westernblot
Xenograft	„Transplantation körperfremden Gewebes“
z.B.	zum Beispiel
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar