

**Detektion und molekulare Charakterisierung von
zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut von
Patienten mit kolorektalem Karzinom**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

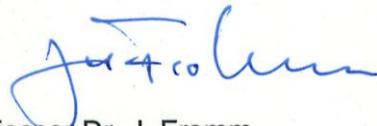
CHRISTIN GASCH

aus Bremerhaven

HAMBURG 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. K. Pantel
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. R. Lorbiecke
Tag der Disputation: 21. September 2012

Hamburg, den 03. September 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

FÜR ROLLI UND ALLE KREBSPATIENTEN

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
III.	ZUSAMMENFASSUNG	VII

1. EINLEITUNG 1

1.1.	Krebserkrankungen.....	1
1.2.	Das Kolorektalkarzinom (Darmkrebs).	1
1.2.1.	Histologie und Klassifizierung	2
1.2.2.	Therapiemöglichkeiten beim kolorektalen Karzinom	3
1.2.3.	Der EGFR-Signalweg im kolorektalen Karzinom	4
1.2.4.	Tumorgenese des Kolorektalkarzinoms.....	6
1.2.4.1.	<i>Mutationen in der kolorektalen Tumorgenese.....</i>	<i>7</i>
1.2.4.2.	<i>Überexpression und/oder Amplifikation von Tumor- assoziierten Genen</i>	<i>10</i>
1.3.	Metastasierung.....	12
1.3.1.	Metastatische Kaskade	12
1.3.2.	Minimale residuale Krebserkrankung.....	14
1.3.3.	Methoden zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen	15
1.3.3.1.	<i>CellSearch-System.....</i>	<i>16</i>
1.3.3.2.	<i>EPSIPOT-Assay.....</i>	<i>18</i>
1.4.	Einzelzellanalyse	21
1.5.	Fragestellung	22

2. MATERIAL UND METHODEN 24

2.1.	Material.....	24
2.1.1.	Geräte	24
2.1.2.	Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.3.	Größenstandards	24
2.1.4.	Oligonukleotide (Primer)	24
2.1.5.	Antikörper	25
2.1.6.	Kommerzielle Kits.....	26
2.1.7.	Analysesoftware und Datenbanken.....	26

2.1.8.	Zelllinien und Zellmedien	27
2.1.9.	Patientenmaterial	28
2.1.10.	Puffer und Lösungen	29
2.2.	Methoden	30
2.2.1.	Zellkultur	30
2.2.1.1.	Kultivierung und Lagerung von Zelllinien	30
2.2.1.2.	Selektion einer Oxaliplatin-resistenten Subpopulation von HT29-Zellen.....	31
2.2.2.	Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut.....	31
2.2.2.1.	Detektion von CTCs mit dem CellSearch-System.....	31
2.2.2.2.	Detektion von CTCs mit dem CK19-EPISPOT-Assay.....	32
2.2.2.2.1.	CTC-Anreicherung mittels RosetteSep-Antikörpercocktail.....	32
2.2.2.2.2.	Detektion von CK19-Immunospots/CTCs.....	33
2.2.2.2.3.	Konjugation des CK19.2-Sekundärantikörpers mit Alexa Fluor® 555.....	34
2.2.3.	Molekulare Einzelzellanalyse von CTCs/Zelllinienzellen.....	35
2.2.3.1.	Isolierung von Einzelzellen durch Mikromanipulation	35
2.2.3.2.	Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA (WGA).....	36
2.2.3.2.1.	WGA mit dem GenomePlex-Amplifikationskit	36
2.2.3.2.2.	WGA mit dem GenomiPhi-Amplifikationskit	38
2.2.4.	Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren.....	39
2.2.4.1.	DNA-Isolierung	39
2.2.4.1.1.	DNA-Isolierung aus Zelllinienzellen	39
2.2.4.1.2.	DNA-Isolierung aus Leukozyten	40
2.2.4.2.	RNA-Isolierung.....	40
2.2.4.3.	cDNA-Erststrangsynthese mittels reverser Transkription	41
2.2.4.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.4.4.1.	Klassische PCR.....	41
2.2.4.4.2.	Multiplex-PCR.....	42
2.2.4.5.	Quantitative real time PCR (qPCR)	43
2.2.4.5.1.	Genexpressionsanalysen mittels qPCR.....	45
2.2.4.5.2.	Identifikation von Genamplifikationen mittels qPCR.....	46
2.2.4.6.	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.4.7.	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	47
2.2.4.8.	DNA-Sequenzierung.....	48
2.2.4.9.	Komparative Genomische Hybridisierung (CGH).....	49
2.2.4.9.1.	Metaphasen-CGH (mCGH).....	50
2.2.4.9.2.	Array-CGH (aCGH)	50
2.2.5.	Methoden zur Proteinanalyse	51

2.2.5.1. Herstellung von Harnstoff-Zelllysaten.....	51
2.2.5.2. BCA-Proteinbestimmung	51
2.2.5.3. SDS-Gelelektrophorese	52
2.2.5.4. Westernblot-Analyse	53
2.2.6. Immunzytochemische Analysen (ICC).....	54
2.2.6.1. Herstellung von Zytospins	54
2.2.6.2. Immunzytochemische Färbung von Zytospin-Präparaten (s. 2.2.6.1)....	54
2.2.6.2.1. Immunfluoreszenz (ALDH1 und EpCAM)	54
2.2.6.2.2. APAAP-Immunzytochemie (CK19, E-Cadherin, CD133)	54
3. ERGEBNISSE	56
3.1. CTC-Detektion aus dem Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Hilfe des <i>CellSearch</i> -Systems.....	56
3.2. Einzelzellanalyse	58
3.2.1. Etablierung eines WGA-Protokolls zur molekularen Analyse von Einzelzellen.....	59
3.2.1.1. Nachweis von chromosomalen Aberrationen in genomischer DNA einzelner Zelllinienzellen mittels Metaphasen-CGH (mCGH)	60
3.2.1.2. Identifikation von Genamplifikationen in Einzelzell-DNA mittels qPCR	66
3.2.1.3. Mutationsanalyse einzelner Tumorzellen	71
3.2.1.4. Eignung des GenomePlex- und GenomiPhi-WGA-Kits zur Analyse von Einzelzellen.....	75
3.2.2. Einzelzellanalyse von CTCs aus dem Blut von Kolorektalkarzinom- patienten	76
3.2.2.1. Detektion von chromosomalen Aberrationen in einzelnen CTCs mittels Metaphasen- und Array-CGH	77
3.2.2.2. Identifikation von Genamplifikationen in einzelnen CTCs mittels qPCR.....	81
3.2.2.2.1. EGFR-Amplifikationsstatus von CTCs.....	81
3.2.2.2.2. AURKA-Amplifikationsstatus von CTCs	82
3.2.2.2.3. C-MYC-Amplifikationsstatus von CTCs.....	83
3.2.2.2.4. LGR5-Amplifikationsstatus von CTCs	84
3.2.2.2.5. Zusammenfassung detektierter Genamplifikationen in Patienten- CTCs	85
3.2.2.3. Mutationsanalyse von einzelnen CTCs	86
3.3. Etablierung eines Zytotoxizitätstests mit Hilfe des CK19-EPISPOT-Assays.....	92
3.3.1. Etablierung und Optimierung des CK19-EPISPOT-Assays.....	92

3.3.1.1. Bestimmung der Wiederfindungsrate von CK29-sekretierenden Tumorzellen	92
3.3.1.2. Kultivierung von Tumorzellen im Anschluss an die EPISPOT-Detektion	93
3.3.1.3. Optimierung der Lagerungsprozedur von mit RosetteSep-angereicherten Zellfraktionen	94
3.3.2. Einfluss von Zytostatika auf die Immunospots von CK19-sekretierenden Zellen	95
3.3.2.1. CK19-EPISPOT-Analyse von HT29-Zellen unter Zytostatika-einwirkung	95
3.3.2.2. Selektion von Zytostatika-resistenten HT29-Subklonen	96
3.3.2.2.1. Nachweis der Oxaliplatin-Resistenz von HT29OxR gegenüber HT29-Zellen	97
3.3.2.2.2. Expressionsanalyse Tumor-assoziiierter Proteine in HT29OxR-Zellen	100
3.3.3. Analyse von HT29OxR-Zellen mit Hilfe des EPISPOT-Assays unter Oxaliplatinexposition	104
4. DISKUSSION	107
4.1. Detektion von CTCs mit Hilfe des CellSearch-Systems	108
4.2. Einzelzellanalyse	110
4.2.1. Methodische Aspekte	111
4.2.2. Genotypische Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von Kolorektalkarzinompatienten	115
4.2.3. Genotypische Heterogenität der CTCs einzelner CTC Populationen	119
4.3. Zytotoxizitäts-Assay mit Hilfe des CK19-EPISPOTs	121
4.3.1. Selektion eines Oxaliplatin-resistenten HT29-Subklons	121
4.3.2. Verwendung des CK19-EPISPOTs als Zytotoxizität-Assay	124
4.4. Ausblick	126
5. LITERATUR	128
6. ANHANG	137

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aCGH	Array-CGH
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
AR	Genamplifikationsrate
AU	Ångström-Unit
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CD45	Leukozytenantigen (<i>cluster of differentiation 45</i>)
CGH	komparative genomische Hybridisierung (<i>comparative genomic hybridization</i>)
Chr	Chromosom
CK	Keratin
CT	Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle threshold</i>)
CTC	zirkulierende Tumorzelle (<i>circulating tumor cell</i>)
Cy3	Cyaninfarbstoff 3 (<i>Cyanine Dye 3</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DFS	krankheitsfreies Überleben (<i>disease free survival</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>dexoyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOP	<i>Degenerated oligonucleotide primed</i>
DTC	disseminierte Tumorzelle (<i>disseminated tumor cell</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor receptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)
EPISPOT	epithelialer Immunospot
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii/et aliae</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
h	Stunde
HER2	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>epidermal growth factor rezeptor 2</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse reddish peroxidase</i>)
ICC	Immunzytochemie (<i>immunocytochemistry</i>)
ID	Identifizierung
IgG	Immunglobulin G
Log2	Logarithmus zur Basis 2
LOH	Verlust der Heterozygosität (<i>loss of heterozygosity</i>)
M	Metastasierungsstatus
M	Molar
M0	metastasefrei
M1	Fernmetastasen vorhanden
mCGH	Metaphasen-CGH
min	Minuten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MUC1	Mucin 1, epitheliales Membranantigen
MUT	Mutation
n	Anzahl
N	Lymphknotenstatus (<i>Nodes</i>)
OD	optische Dichte
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
p	p-Arm des Chromosoms
p	p-Wert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFS	progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
q	q-Arm des Chromosoms
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real time PCR</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RR	Rezidivrate
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
s.	siehe
T	Tumorstatus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered salin</i>) mit Tween 20
TNM	Tumor-, Lymphknoten-, Metastasierungsstatus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumenanteil
WGA	gesamtgenomische Amplifikation (<i>whole genome amplification</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
xg	mehrfaches der Erdbeschleunigung
z.T.	zum Teil
Präfixe	
k	kilo-, 10^3
m	milli-, 10^{-3}
μ	mikro-, 10^{-6}
n	nano-, 10^{-9}

III. Zusammenfassung

Trotz der zumeist vollständigen chirurgischen Resektion des Primärtumors gehört das kolorektale Karzinom mit jährlich 30000 Todesfällen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Die hohe Mortalitätsrate ist durch das Auftreten eines Tumorrezidivs sowie durch die Ausbildung von Fernmetastasen z.B. in der Leber und Lunge bedingt. Den Ausgangspunkt für das erneute Auftreten der Krebserkrankung bilden sogenannte disseminierte Tumorzellen, welche sich vom Primärtumor lösen und über das lymphatische oder Blutssystem (zirkulierende Tumorzellen; CTCs) in distante Organe gelangen und dort für die Formation von Metastasen verantwortlich sind.

Die molekulare Analyse von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut von Krebspatienten könnte nicht nur einen Beitrag zum besseren Verständnis des Metastasierungsprozesses liefern, sondern auch zu einer Identifikation neuer Ziele zur Behandlung von Krebserkrankungen beitragen. Des Weiteren könnte die Analyse von CTCs auf Einzelzellebene Vorteile gegenüber der derzeit gängigen Primärtumoranalyse im Hinblick auf therapierelevante Marker bieten. Aufgrund der intratumoralen Heterogenität und unterschiedlicher molekularer Ereignisse zwischen Primärtumor und Metastasen ist die Frage, inwieweit Analysen kleiner Biopsien die molekulare Beschaffenheit des Primärtumors und der Erkrankung insgesamt repräsentieren können, bisher nicht eindeutig geklärt. Des Weiteren gibt die Primärtumor-Analyse lediglich Auskunft über den Zustand zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme. Die Analyse spezifischer molekularer Marker in CTCs von Krebspatienten hingegen könnte als "flüssige Biopsie" Verwendung finden, die einfach und wiederholbar durchzuführen ist, die Erkrankung zum Zeitpunkt der Blutabnahme widerspiegelt und folglich die Entwicklung einer individualisierten Krebstherapie ermöglichen könnte.

Zur Detektion von CTCs aus dem peripheren Blut von insgesamt 123 Darmkrebspatienten wurde das *CellSearch*-System, welches bereits von der FDA zur Überwachung des Krankheitsverlaufes bei metastasierten Brust- Darm- und Prostatapatienten zugelassen wurde, eingesetzt. Die Detektion von mindestens einer CTC in 7.5 mL konnte mit dem Vorhandensein von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen, der Nachweis von mindestens 3 CTCs zusätzlich mit der Ausdehnung des Primärtumors korreliert und folglich die prognostische Relevanz von *CellSearch*-

detektierten CTCs im peripheren Blut von Kolorektalkarzinompatienten bestätigt werden.

Für weiterführende molekulare Analysen der detektierten CTCs wurden unter Verwendung von Tumorzelllinien zunächst für verschiedene Folgeapplikationen (CGH, qPCR, Sequenzierung) geeignete Protokolle zur Amplifikation des Gesamtgenoms (WGA) von Einzelzellen etabliert. Mit Hilfe dieser Protokolle konnten in dieser Arbeit erstmalig Untersuchungen der genomischen DNA von *CellSearch*-detektierten CTCs auf Einzelzellebene durchgeführt werden. Die Genotypisierung der DNAs von insgesamt 151 einzelnen CTCs aus 13 Kolorektalkarzinompatienten zeigte eine deutliche Heterogenität der einzelnen CTCs eines Patienten bezüglich chromosomaler Aberrationen, Genamplifikationen (*EGFR*, *AURKA*, *C-MYC*, *LGR5*) und -mutationen (*P53*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*). Diese Koexistenz verschiedener Genotypen innerhalb einer CTC-Population steht im Einklang mit der für kolorektale Primärtumoren beschriebenen genomischen Heterogenität.

Die im ersten Teil dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden den Ausgangspunkt für weiterführende Analysen von einzelnen CTCs aus Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen, welche zukünftig als Hilfsmittel für Therapieentscheidungen dienen sowie zur Identifizierung neuer therapeutischer Ziele beitragen könnten.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines Zytotoxizität-Assays für CTCs mit Hilfe der EPISPOT-Technik. Während eine Unterscheidung von lebensfähigen und apoptotischen CTCs mit den meisten CTC-Detektionsmethoden, wie z.B. dem *CellSearch*-System nicht eindeutig möglich ist, bietet der EPISPOT-Assay den Vorteil, dass hierdurch ausschließlich intakte, sekretorisch aktive Tumorzellen detektiert werden. Diese Eigenschaft wurde für die Entwicklung eines Assays zur Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika auf lebensfähige Tumorzellen genutzt. Zu diesem Zweck wurden die kolorektale Zelllinie HT29 und ein selektierter, gegenüber dem Zytostatikum Oxaliplatin resistenter HT29-Subklon eingesetzt. Insgesamt konnte im Zelllinienmodell eine Abnahme von sekretorisch aktiven bzw. intakten Tumorzellen durch die Zugabe von Zytostatika mit Hilfe der EPISPOT-Technik nachgewiesen werden. Der entwickelte Zytotoxizitäts-Assay könnte zukünftig zu einer genaueren Abschätzung des Erfolges verschiedener Therapiemaßnahmen beitragen.

1. Einleitung

1.1. Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar (Deutsches Krebsregister 2007/2008). Allein in Deutschland sind jährlich rund 470.000 Neuerkrankungen und 215.000 Todesfälle infolge von Krebs zu verzeichnen. Unter dem Begriff Krebs sind verschiedene maligne (bösartige) Erkrankungen zusammengefasst, welche durch unkontrollierte Teilungen körpereigener Zellen bedingt sind. Im Gegensatz zu benignen (gutartigen) Tumoren, welche ein lokal begrenztes Wachstum zeigen, dringen Krebszellen in die umliegenden Gewebe ein (Invasion) und können zudem in entfernten Organen Metastasen ausbilden (Metastasierung). Die Krebsentstehung (Tumorgenese) ist mit der Anhäufung einer Reihe von Veränderungen der genomischen Zell-DNA (z.B. Genmutationen, -amplifikationen, -deletionen, chromosomale Aberrationen) verbunden, welche die betroffenen Zellen letztlich befähigen unabhängig von den natürlichen Regulationsmechanismen des Körpers zu wachsen und sich zu vermehren (Zellproliferation). Eine derartige Entartung körpereigener Zellen kann generell sämtliche Gewebe und Zelltypen des Organismus betreffen. Einen Großteil (80%) der diagnostizierten soliden Tumore bilden die sogenannten Karzinome, welche sich aus dem Epithel verschiedener Organe (z.B. Darm, Lunge, Brust) entwickeln [1].

1.2. Das Kolorektalkarzinom (Darmkrebs)

Das Kolorektalkarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung und tumorbedingte Todesursache in den westlichen Industrieländern. In Deutschland werden jährlich etwa 65.000 Neuerkrankungen diagnostiziert, und rund 26.000 Menschen sterben jährlich an den Folgen dieser Erkrankung (Deutsches Krebsregister 2007/2008).

Neben einem hohen Lebensalter gehören z.B. Alkohol- und Tabakkonsum, mangelnde Bewegung sowie eine fleischreiche, ballaststoffarme Ernährung zu den möglichen Risikofaktoren einer Darmkrebserkrankung. Ebenfalls mit einem erhöhten

Darmkrebsrisiko verbunden sind inflammatorische Erkrankungen des Intestinaltraktes, wie z.B. Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (WHO Tumorklassifikation 2000/Deutsches Krebsregister 2007/2008).

1.2.1. Histologie und Klassifizierung

Unter dem Begriff des Kolorektalkarzinoms sind maligne Erkrankungen der folgenden verschiedenen Abschnitte des Darmtraktes zusammengefasst: Caecum (Blinddarm), Kolon (Dickdarm) und Rektum (Enddarm).

Den größten Teil aller diagnostizierten Kolorektalkarzinome machen mit etwa 85-90% die sogenannten Adenokarzinome aus, welche sich aus Drüsenzellen des Darmepithels entwickeln. Das aus schleimsekretierenden intestinalen Epithelzellen hervorgehende muzinöse Adenokarzinom stellt mit einer Häufigkeit von etwa 10% den zweithäufigsten histologischen Subtyp dar. Weitere Formen maligner Erkrankungen des Darmtraktes sind Siegelringkarzinome, undifferenzierte Karzinome sowie die sehr seltenen Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse und kleinzelligen Karzinome (WHO Tumorklassifikation 2000) [2, 3] .

Für die pathologische Einteilung der unterschiedlichen Stadien (*Staging*) des Kolorektalkarzinoms wird die TNM-Klassifikation herangezogen. Dieses Klassifikationssystem der UICC (*Union for International Cancer Control*) ersetzt heutzutage die seit 1935 angewandte Einteilung nach Dukes. Der TNM-Status berücksichtigt die Ausbreitung des Tumors (T) sowie das Vorhandensein von Lymphknoten- (N) und Fernmetastasen (M). Übersichten zur TNM-Klassifikation sowie die aus dem TNM-Status abgeleiteten Tumorstadien gemäß UICC sind in Tabelle 1.1. und 1.2. dargestellt.

Tab. 1.1.: TNM-Klassifikation von kolorektalen Karzinomen (WHO Tumorklassifikation 2000).

TNM-Klassifikation	Befund
Tumorstatus	
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4	Tumor penetriert das viszerale Peritoneum (Bauchfell) oder infiltriert Nachbarorgane/-strukturen
Lymphknotenstatus	
N0	keine Lymphknotenmetastasierung
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in ≥ 4 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in Lymphknoten entlang eines benannten größeren Blutgefäßes
Metastasierungsstatus	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1.2.: UICC-Stadieneinteilung und Prognose des kolorektalen Karzinoms (WHO Tumorklassifizierung 2000).

UICC-Stadium	Tumor-status	Lymphknoten-status	Metastasierungs-status	5-Jahres-Überlebensrate
I	T1 oder T2	N0	M0	~85%
II	T3 oder T4	N0	M0	50-60%
III	jedes T	N1 oder N2	M0	~30%
IV	jedes T	N1, N2 oder N3	M1	~5%

1.2.2. Therapiemöglichkeiten beim kolorektalen Karzinom

Basierend auf der TNM-Klassifikation des diagnostizierten kolorektalen Karzinoms und dem körperlichen Befinden des Patienten werden verschiedene Therapiemaßnahmen ergriffen. Wesentliche Bestandteile der Darmkrebstherapie sind eine möglichst vollständige, chirurgische Resektion des Primärtumors und ggf. vorhandener Fernmetastasen sowie die Abtragung von angrenzendem Lymphgewebe. In Abhängigkeit von der Tumorausbreitung und Lokalisation kann im Vorfeld des Eingriffes eine neoadjuvante Therapie (Bestrahlung und/oder Chemotherapie) eingeleitet werden, um eine Verkleinerung bzw. Operabilität des Tumors zu erreichen. Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (UICC-Stadium III und IV, u.U. auch UICC-Stadium II) werden post-operativ verschiedene adjuvante Therapiemaßnahmen eingesetzt. Zumeist erfolgt eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie unter Verwendung der

Zytostatika 5-Fluorouracil und Oxaliplatin (FOLFOX-Therapieschema) oder Irinotecan (FOLFIRI-Therapieschema), welche eine Hemmung der DNA-Synthese und folglich der Zellteilung bewirken (NICE Clinical Guidelines 2011/S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ 2004/2008) [4].

Für die Therapie von metastasierten Darmkrebspatienten finden zudem immunologische Ansätze Anwendung. Die am häufigsten eingesetzten monoklonalen Antikörper sind der gegen den Blutgefäßwachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtete monoklonale Antikörper Bavacizumab, durch den die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und folglich das Tumorwachstum inhibiert werden, sowie die gegen EGFR (*epithelial growth factor receptor*, siehe 1.2.3.) gerichteten monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab (NICE Clinical Guidelines) [4].

1.2.3. Der EGFR-Signalweg im kolorektalen Karzinom

Der über den epithelialen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR oder ErbB1) vermittelte Signaltransduktionsweg (Abb. 1.1.) spielt eine Rolle in verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich des kolorektalen Karzinoms. Eine Überexpression von EGFR ist in 30-97% [5, 6], eine Amplifikation im EGFR-Gen in etwa 5-51% [7-9] aller kolorektalen Karzinome beschrieben.

Bei EGFR handelt es sich um eine transmembrane Rezeptortyrosinkinase der sogenannten ErbB-Familie, der u.a. auch das für die Behandlung und Diagnostik des Mammakarzinoms bedeutende HER2 (ErbB2) angehört [10]. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors erfolgt an der extrazellulären Domäne durch die Bindung verschiedener Liganden, wie z.B. EGF und TGF α (*transforming growth factor receptor α*) [11, 12]. EGFR bindet hierbei in Form eines Homodimers oder zusammen mit einem anderen Mitglied der ErbB2-Familie als Heterodimer. Hierdurch wird eine Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen induziert, welche schließlich den Ausgangspunkt für verschiedene Signalkaskaden bildet. Die wichtigsten Signalwege und Kernkomponenten dieser Signalübertragungen sind in Abb. 1.1. dargestellt.

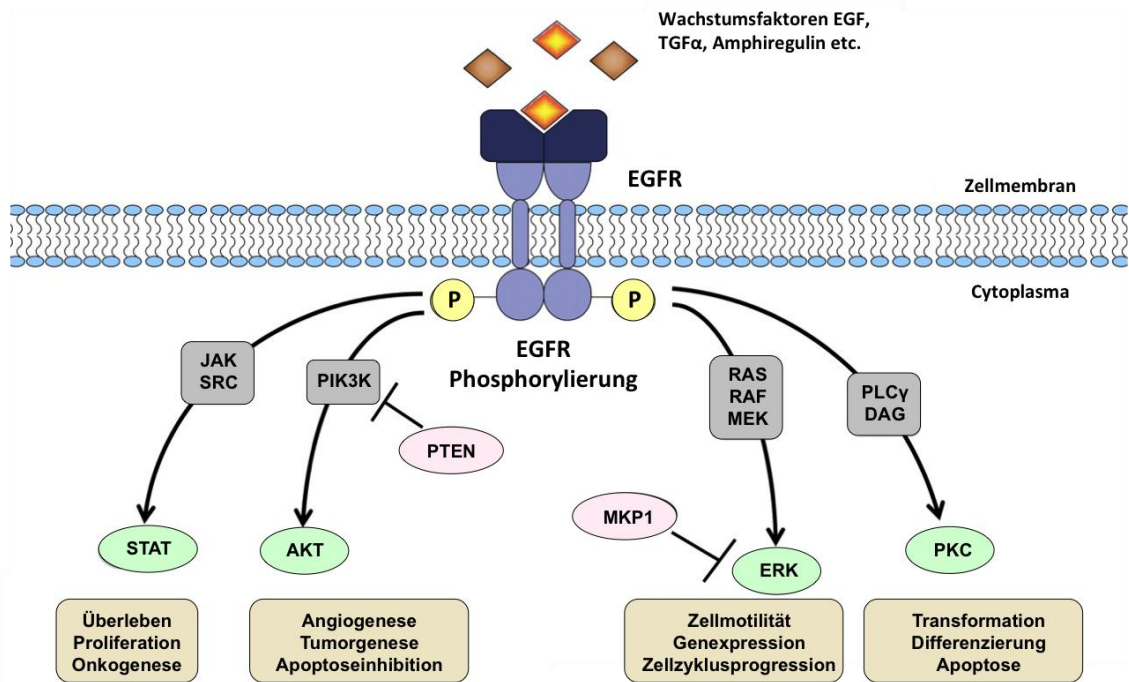


Abb. 1.1.: Vereinfachte Darstellung des EGFR-Signaltransduktionsweges. Durch die Bindung von Liganden wie EGF, TGFα und Amphiregulin an den EGF-Rezeptor werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, die in die Regulation unterschiedlicher Zellprozesse involviert sind. PTEN und MKP1 nehmen inhibitorische Funktionen im PI3K/AKT- bzw. RAS/RAF/MEK-Signalweg ein. Zur besseren Veranschaulichung wurde auf die Darstellung aller Komponenten der 4 wichtigsten Signalkaskaden und deren Interaktion untereinander verzichtet. Detaillierte Beschreibungen Signalübertragungsprozesse sind dem Text zu entnehmen. (modifiziert nach Lee & Moon 2011).

Die EGFR-induzierte Signaltransduktion erfolgt zumeist über den PI3K/AKT- oder den RAS/RAF/MEK-Weg [11, 12].

Bei der PI3K/AKT-Signalkaskade erfolgt die Übertragung des Phosphatrestes der phosphorylierten EGFR-Tyrosinkinasedomäne auf die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die hierdurch aktivierte katalytische Domäne von PI3K, PIK3CA, vermittelt dann die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), welches die Aktivierung der Serin-/Threoninkinase AKT (auch: Proteinkinase B) vermittelt. AKT ist schließlich in zelluläre Prozesse, wie z.B. Angiogenese, Zellproliferation/-migration und Apoptoseinhibition involviert.

Der RAS/RAF/MEK-Signalweg wird durch die Rekrutierung von GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und SOS (*son of sevenless*) durch das phosphorylierte EGFR initiiert. GRB2 und SOS bilden zusammen mit einem GDP/GTP-Austauschfaktor einen Adapterproteinkomplex, über den die Signalübertragung auf die GTPase RAS und die Serinkinase RAF erfolgt. Das aktivierte RAF-Protein vermittelt die Phosphorylierung und Aktivierung von MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase ½) und schließlich von

ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*). Aktives ERK1/2 gelangt in den Zellkern und ist für die Expression verschiedener, mit der Zellmotilität und Zellzyklusprogression assoziierter Transkriptionsfaktoren verantwortlich.

Weitere EGFR-induzierte Signalwege werden durch STAT-Proteine (STAT1, STAT3 und STAT5, *signal transducer and activator of transcription*) oder die Proteinkinase C (PKC) vermittelt und sind ebenso an einer Stimulation der DNA-Synthese und Zellproliferation und folglich der Onkogenese der Zelle beteiligt [11-13].

1.2.4. Tumorgenese des Kolorektalkarzinoms

Lediglich 5-10% aller diagnostizierten Kolorektalkarzinome sind durch genetische Prädispositionen bedingt. HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) bildet dabei die häufigste Form erblicher kolorektaler Karzinome und ist auf inaktivierende Mutationen in DNA-Mismatch-Reparaturgenen, wie z.B. MSH2 oder MLH1 zurückzuführen. Diese mutationsbedingte Störung des DNA-Reparatursystems hat eine Anhäufung von Mutationen und damit eine frühe Ausbildung von Tumoren zur Folge [14].

Der Großteil (90-95%) aller malignen Erkrankungen des Darms entwickelt sich sporadisch durch eine stufenweise Akkumulation verschiedener Veränderungen des Genoms nach dem sogenannten Adenom-Karzinom-Modell nach VOGELSTEIN [15] (Abb. 1.2.). Zu Beginn der Entwicklung eines Kolorektalkarzinoms kommt es in Zellen des Darmschleimhautepithels zu einer erhöhten Zellteilungsrate (Hyperplasie), welche schließlich zur Ausbildung von abnormalen Gewebestrukturen (Dysplasien) in Form von Darmpolypen (Adenomen) führt. Adenome des Darmepithels bilden wiederum die Vorstufe für die Entstehung eines *Carcinoma in situ*, eines prä-malignen Tumors, dessen Ausbreitung durch die sogenannte Basalmembran lokal begrenzt ist. Durchdringen Tumorzellen diese Basalmembran und breiten sich in umliegende Gewebe aus, wird schließlich von einem invasiven Karzinom gesprochen [16].

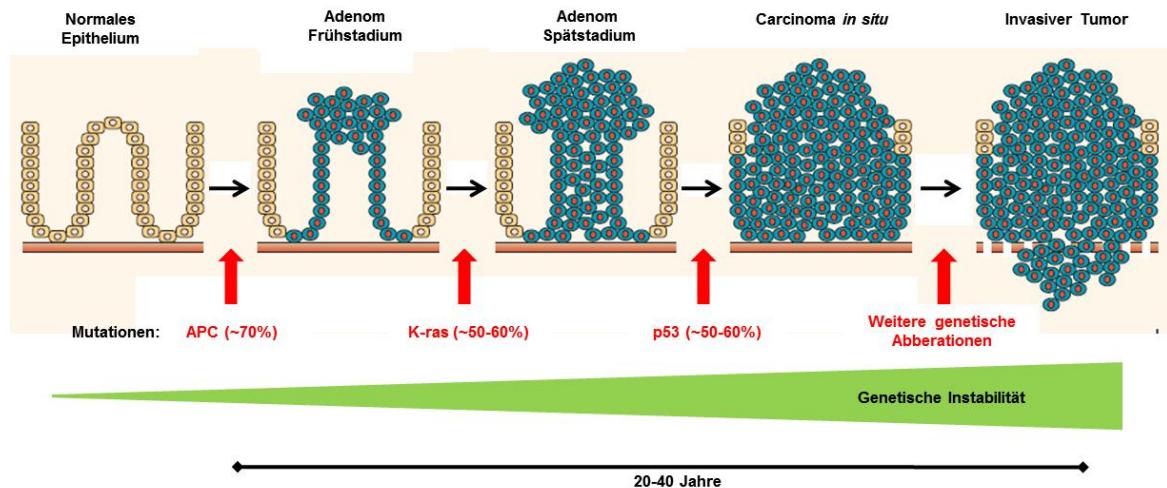


Abb. 1.2.: Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolorektalkarzinoms nach VOGELSTEIN [15]. Die Entwicklung eines invasiven Kolorektalkarzinoms aus normalem Darmepithel ist ein mehrstufiger Prozess, der mit einer steigenden genetischen Instabilität in den betroffenen Zellen assoziiert ist. Diese äußert sich in einer Anhäufung verschiedener genetischer Aberrationen, wie z.B. Mutationen der Tumorsuppressorgene *APC* und *p53* und des Onkogens *KRAS*. (modifiziert nach RAJAGOPALAN *et al.* 2003[16])

Die Entstehung eines invasiven Tumors aus normalem Darmepithel basiert auf einer steigenden genetischen Instabilität im betroffenen Gewebe und ist sowohl mit einer Anhäufung von Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen verschiedener chromosomaler Regionen (s. 1.2.4.2.) als auch von Mutationen in verschiedenen Tumorsuppressor- und Onkogenen (s. 1.2.4.1.) assoziiert [16].

Dass diese graduelle Anhäufung von Aberrationen jedoch nicht zwingend in allen Zellen der Tumormasse gleichermaßen erfolgt, wird durch verschiedene Studien impliziert, die unterschiedliche genetische Veränderungen in verschiedenen Regionen des von kolorektalen Tumoren, z.B. in der Tumormitte und der invasiven Front (intratumorale Heterogenität), nachweisen konnten [17-20].

1.2.4.1. Mutationen in der kolorektalen Tumorgenese

Bei der Entstehung und Progression des kolorektalen Karzinoms spielen vor allem inhibierende Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) und *P53* sowie aktivierende Mutationen des *KRAS*-Onkogens (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) eine Rolle [16, 21, 22] (Abb. 1.2). Eine Übersicht über die Mutationshäufigkeit verschiedener Gene beim Kolonkarzinom ist Abb. 1.3. zu entnehmen.

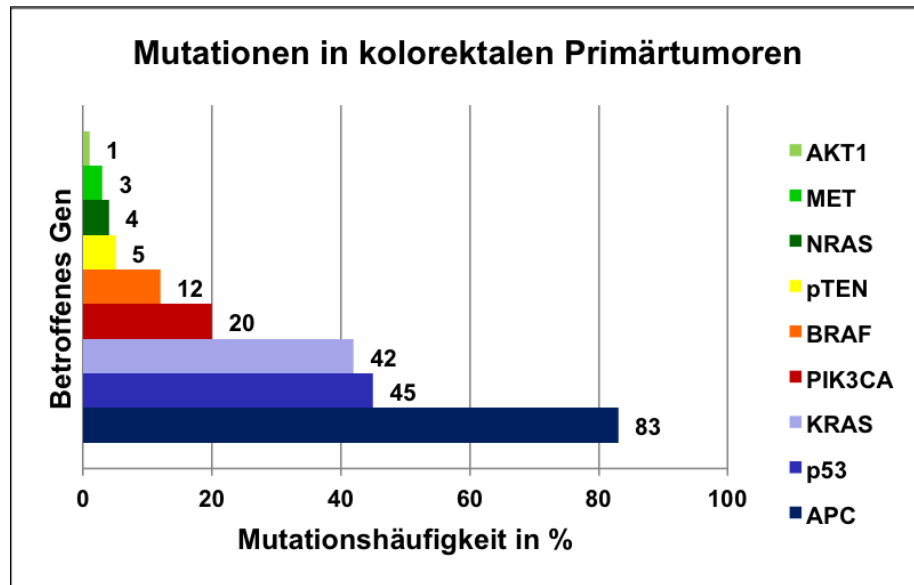


Abb. 1.3.: Mutationshäufigkeit verschiedener tumorassoziierter Gene in kolorektalen Primärtumoren. (Datenquellen: FUMAGALLI *et al.* 2010 [21], RUSSO *et al.* 2005 [26], NASSIF *et al.* 2004, ROWAN *et al.* 2000 [23])

Mit einer inhibierenden Mutation oder Deletion in etwa 56-83% aller kolorektalen Primärtumoren [23, 24] stellt *APC* das mit Abstand am häufigsten veränderte Gen dar und bildet folglich die Grundlage für die Entstehung maligner Erkrankungen. Als inhibierendes Element des Wnt-Signalweges übernimmt *APC* verschiedene regulatorische Funktion im Rahmen der Zellteilung und -mobilität. Der Funktionsverlust des *APC*-Proteins ist mit der Entstehung von neoplastischen Veränderungen des Darmepithels, den sogenannten Polypen assoziiert. Der alleinige Ausfall des *APC*-Gens ist zwar mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko verbunden (S3 Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ 2004/2008) [25], für die Entwicklung eines malignen Karzinoms ist jedoch die genetische Veränderung weiterer Gene/chromosomaler Regionen essentiell.

Von den bisher etwa 700 verschiedenen identifizierten Mutationen des *APC*-Gens sind etwa 80% in einer sogenannten *Cluster*-Region mit einer Länge von 681 bp zu verzeichnen [23].

Ein weiterer, in 40-61% aller Kolorektalkarzinome mutiertes Gen ist *P53*, das das Tumorsuppressorprotein P53 kodiert [22, 24, 26]. *P53* vermittelt u.a. einen Arrest des Zellzyklus zum Zweck der DNA-Reparatur sowie die Einleitung von Apoptosevorgängen. Die Inaktivierung von *P53* nimmt folglich eine Schlüsselrolle bei der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen ein. Trotz der häufig zu beobachtenden Mutationen

und Überexpression des P53-Proteins in Primärtumorgewebe wird die prognostische und therapeutische Bedeutung von *P53*-Mutationen kontrovers diskutiert [22, 23].

Bei dem in 27-60% aller kolorektalen Primärtumoren mutierten *KRAS*-Onkogen [21, 24, 27-29], handelt es sich um eine GTPase (Guanosin-5'-triphosphat-Bindeprotein) der RAS-Genfamilie, welche als aktivierendes Element im EGFR/RAS/RAF-Signalweg fungiert (siehe 1.2.3.). Der Austausch eines Nukleotids im Bereich des Codons 12, 13 oder 61 führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins und folglich zu einer anhaltenden Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche wiederum eine Vielzahl zellulärer Vorgänge, wie z.B. die Zellproliferation, -migration und -differenzierung stimulieren. Begründet durch diese EGFR-unabhängige Expression der Zielgene des EGFR-Signalwegs ist eine intakte Wildtyp-Form des *KRAS*-Gens essentiell für den Therapieerfolg von gegen EGFR gerichteten Antikörpern und Inhibitoren, wie z.B. Cetuximab oder Gefitinib [28-32]. Aufgrund dieser therapeutischen Relevanz gehört die Bestimmung des *KRAS*-Status im Primärtumorgewebe mittlerweile zu den Routineuntersuchungen.

Die in etwa 5-14% aller kolorektalen Karzinome mutiert vorliegende Serinkinase *BRAF* [21, 27, 28], stellt ein dem *KRAS*-Gen nachgeschaltetes Element des EGFR/RAS/RAF-Signalwegs dar (siehe 1.2.3.). Das durch eine Mutation im Codon 600 konstitutiv aktivierte *BRAF*-Gen stimuliert, wie auch das *KRAS*-Gen, eine EGFR-unabhängige Expression der EGFR-Zielgene, was folglich in einer ungehemmten Zellteilung und -proliferation resultiert. Wie auch zuvor für *KRAS* beschrieben, setzt die erfolgreiche Behandlung von Kolorektalkarzinompatienten mit Anti-EGFR-Therapieansätzen eine funktionsfähige, nicht-mutierte Form des *BRAF*-Gens voraus. Im Gegensatz zu *KRAS* werden *BRAF*-Mutationsanalysen des Primärtumors jedoch derzeit noch nicht routinemäßig durchgeführt (S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ 2004/2008).

Das in 15-20% aller kolorektalen Primärtumoren mutierte *PIK3CA*-Gen [21, 27, 31, 33] kodiert für die katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Als Teil der EGFR/PI3K/AKT-Signalkaskade induziert *PIK3CA* in aktivierter Form die Expression verschiedener für Überleben, Wachstum und Proliferation der Zelle relevanter Gene. Eine mutationsbedingte dauerhafte Aktivierung von *PIK3CA* führt wie die von *KRAS* und *BRAF* zu einer EGFR-unabhängigen Initiation von Zellteilungsprozessen und damit zu einer Resistenz gegenüber anti-EGFR-basierten Therapiemaßnahmen [27, 31, 33]. Wie

auch im Falle des *BRAF*-Gens wird der *PIK3CA*-Mutationsstatus in der klinischen Diagnostik bisher nicht berücksichtigt.

1.2.4.2. Überexpression und/oder Amplifikation von Tumor-assoziierten Genen

Mit der steigenden genetischen Instabilität im Verlauf der Tumorgenese kommt es neben der Akkumulation von Mutationen zu weiteren Veränderungen des Genoms, wie z.B. Translokationen, Deletionen und Amplifikationen spezifischer Gene und/oder Chromosomenregionen. Eine Amplifikation im Bereich eines Onkogens kann zu einer erhöhten oder auch konstitutiven Genexpression und folglich zur Entwicklung und Progression von Krebserkrankungen beitragen.

Eine durch Mutationen, Amplifikation oder transkriptionelle Fehlregulationen des *EGFR*-Gens hervorgerufene konstitutive Aktivierung der EGFR-Signalkaskade (Abb. 1.1.) spielt sowohl bei der Entstehung als auch der Progression vieler maligner Erkrankungen (u.a. beim Kolorektalkarzinom) eine Rolle. Als Zielprotein der u.a. für metastasierte Darmkrebspatienten einsetzbaren monoklonalen anti-EGFR-Antikörper Panitumumab und Cetuximab ist das *EGFR*-Gen zudem von therapeutischer Relevanz. Derzeit werden sowohl die EGFR-Expression als auch die Amplifikation des EGFR-Gens als mögliche Indikatoren für den Therapieerfolg beim kolorektalen Karzinom diskutiert [31, 34, 35].

Ebenfalls von therapeutischer Bedeutung ist die Serinkinase Aurora-Kinase A (*AURKA*), welche als Zielprotein verschiedener, in klinischen Studien für leukämische und solide Tumorerkrankungen (inkl. CRC) eingesetzter Serinkinaseinhibitoren wie z.B. VX-680/MK-0457, MLN8054 oder PHA-73935 fungiert [36]. Funktionell ist *AURKA* als Regulator des Aufbaus und der Stabilität des Spindelapparates maßgeblich an der Chromosomensegregation im Verlauf des Mitose- und Zytokinesevorgangs Chromosomensatzes beteiligt. Die in etwa 60% aller kolorektalen Primärtumoren zu beobachtende Überexpression geht häufig mit einer Amplifikation des *AURKA*-Gens einher und hat eine zunehmende, für Tumorerkrankungen charakteristische Instabilität der Chromosomenstruktur zur Folge [37-39].

Der Transkriptionsfaktor C-MYC kann durch verschiedene Signalwege (z.B. Wnt, EGFR,) aktiviert werden und ist an der Regulation eines breiten Spektrums von Genen beteiligt. Folglich ist das C-MYC-Protein in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert. So fungiert das C-MYC-Protein u.a. sowohl als Aktivator von Zellwachstum und -proliferation als

auch als Apoptoserepressor. Eine C-MYC-Überexpression kann durch eine Translokation, die Amplifikation des Gens oder die Aktivierung C-MYC regulatorischer Elemente bedingt sein. Die konstitutive Expression von C-MYC spielt eine Rolle bei der Entstehung und Progression verschiedener maligner Erkrankungen und ist in etwa 70% der kolorektalen Primärtumoren nachweisbar [40, 41].

Beim *LGR5*- (*leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) oder auch *GPR49*-Gen handelt es sich um ein Zielgen des sogenannten Wnt-Signalweges, welcher für verschiedene Prozesse während der Embryogenese von Bedeutung ist. Während die Wnt-Signalkaskade in gesunden adulten Zellen weitestgehend inaktiviert bleibt, ist in Primärtumoren verschiedener Krebsentitäten (einschließlich des Kolorektalkarzinoms) häufig eine konstitutive Aktivität des Signalwegs und folglich eine Überexpression seiner Zielgene, wie z.B. *LGR5*, *Cyclin-D1* und *c-MYC*, zu beobachten [42-45]. Während *Cyclin D1* und *c-MYC* in die Regulation des Zellzyklus und der -proliferation involviert sind, ist die zelluläre Funktion des Transmembranrezeptors *LGR5* noch weitestgehend unbekannt. Basierend auf seiner lokal begrenzten Expression in den Kolumnarzellen am Grunde der Krypten kolorektalen Normalgewebes wird *LGR5* eine stammzellspezifische Wirkungsweise zugeschrieben [46, 47] und findet als putativer intestinaler Stammzellmarker Verwendung. Die Amplifikation und dauerhafte Aktivierung von *LGR5* könnte daher für die Resistenz betroffener Tumorzellen gegenüber Zytostatika von Bedeutung sein.

1.3. Metastasierung

Der Großteil aller krebsbedingten Todesfälle (90%) ist nicht durch den häufig vollständig resektierbaren Primärtumor selbst, sondern durch die fortschreitende Metastasierung von entfernten Geweben und Organen bedingt [48, 49]. Die Ausbildung derartiger Fernmetastasen basiert auf dem Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors und deren Streuung in distante Lymphknoten und/oder Organe. Der detaillierte Ablauf des komplexen Metastasierungsprozesses ist jedoch noch weitestgehend unbekannt.

1.3.1. Metastatische Kaskade

Der Metastasierungsprozess (Abb. 1.4.) wird durch die Mobilisierung einzelner Zellen aus dem geordneten epithelialen Zellverband des Primärtumors eingeleitet. Um diese erhöhte Motilität zu erreichen, gibt die betreffende Zelle einige ihrer epithelialen Eigenschaften zugunsten eines mesenchymalen Phänotypes auf [48, 50]. Dieser als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnete Vorgang, welcher normalerweise in der Embryonalentwicklung und bei der Wundheilung eine Rolle spielt, geht mit signifikanten Änderungen der Genexpression und Zellmorphologie einher. So erfolgen z.B. die Herunterregulation von Zelladhäsionsmolekülen (E-Cadherin) und epithelialen Strukturproteinen (Keratinen) sowie die Freisetzung von proteolytischen Enzymen (Matrixmetalloproteasen) [48, 50-54]. Diese erlangten Eigenschaften befähigen die Zelle, durch das den Tumor umgebende stromale Gewebe zu migrieren und in Gefäße des lymphatischen und/oder des Blutsystems zu gelangen (Intravasation) [55-57].

Ein weiterer essentieller Schritt der Metastasierung ist das Überleben der lymphogen oder hämatogen disseminierten Tumorzellen in der Zirkulation. So müssen sie sowohl den starken Scherkräften sowie den Komponenten des Immunsystems in der Blutzirkulation standhalten. Des Weiteren müssen zirkulierende Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, unabhängig von den verloren gegangenen Zell-Zell-Kontakten und den unterstützenden Faktoren ihrer Mikroumgebung dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu entgehen [49].

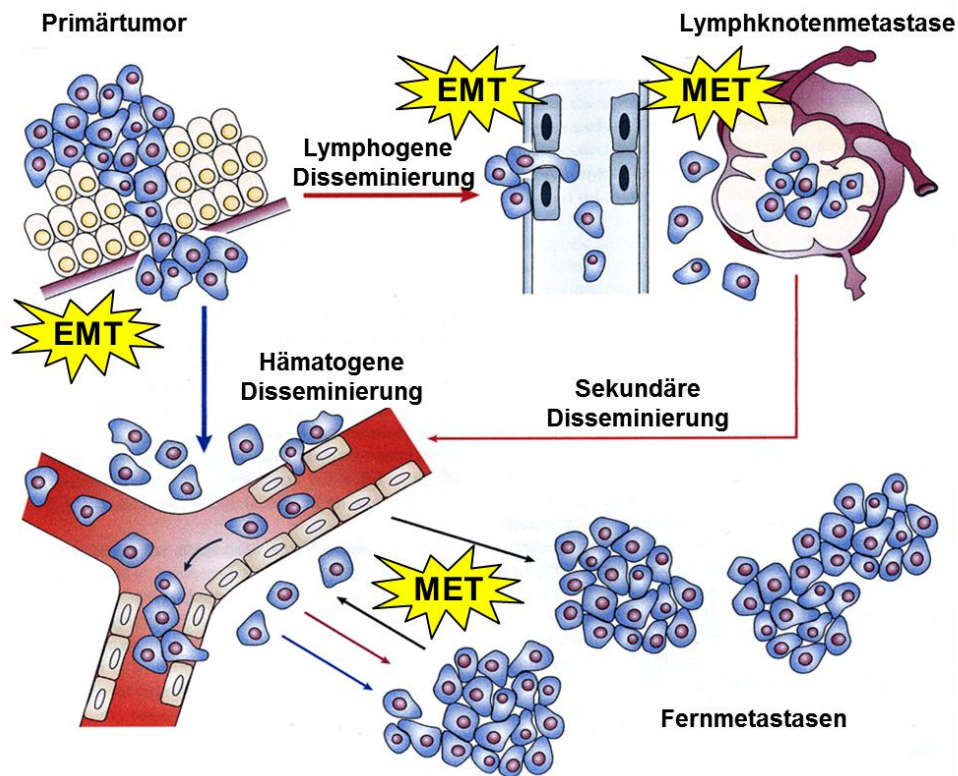


Abb. 1.4.: Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade. Tumorzellen lösen sich aus dem Verband des Primärtumors und gelangen in Gefäße des Blut- oder Lymphsystems (hämatogene oder lymphogene Disseminierung). Lymphogen disseminierte Zellen dringen in umliegende Lymphknoten ein und können hier solide (Mikro-)Metastasen bilden. Aus den Lymphknoten können wiederum Tumorzellen in die Blutzirkulation gelangen. Tumorzellen treten aus der Zirkulation in andere Gewebe aus und können hier zu Metastasen proliferieren. [EMT = epithelial-mesenchymale Transition; MET: mesenchymal-epitheliale Transition]; (modifiziert nach Pantel & Brakenhoff, 2004 [57])

Lymphogen disseminierte Zellen können zunächst Metastasen in den Lymphknoten formieren, bevor zu einem späteren Zeitpunkt wiederum Zellen dieser Metastasen über den hämatogenen Weg in ferne Organe gelangen können. Intakte, im Blutsystem zirkulierende Tumorzellen werden in den sehr engen Kapillaren des betroffenen Organes physikalisch gebremst und können durch spezifische Adhäsionsproteine (z.B. Selektine, Integrine) an das Lumen des Blutgefäßes (Endothel) anheften.

Nach dem Durchdringen des Endothels (Extravasation) migrieren die Tumorzellen in das Zielgewebe und können direkt oder erst nach einer längeren Latenzzeit (Dormanz) eine neue Tumormasse ausbilden (Kolonisierung). Um einen neuen stabilen Zellverband formieren zu können, nimmt die Tumorzelle wieder Ihren epithelialen Phänotyp an, d.h. es findet eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) statt. Auch dieser letzte Schritt der Metastasierung stellt eine Herausforderung für die Tumorzellen dar, da sie in

Abwesenheit der Wachstums- und Überlebensfaktoren ihres Ursprungsgewebes in einer neuen Mikroumgebung proliferieren müssen [57].

Basierend auf den beschriebenen Voraussetzungen und Experimenten im Mausmodell ist davon auszugehen, dass nur vereinzelte Zellen des Primärtumors befähigt sind, diesen komplexen Metastasierungsprozess erfolgreich zu durchlaufen und solide Fernmetastasen zu generieren [58-60]. Ob die Streuung von Tumorzellen mit metastatischem Potential bereits in einem frühen oder erst in einem späteren Stadium der Tumorprogression stattfindet, wird derzeit noch kontrovers diskutiert [57, 61-64].

Die metastatische Streuung des kolorektalen Karzinom erfolgt sowohl lymphogen in regionale Lymphknoten (50-70% aller diagnostizierten kolorektalen Metastasen) als auch hämatogen über die Vena portae (Pfortader) in die Leber (35-50%) und/oder die Vena cava inferior in die Lunge (21%). Seltener sind auch folgende Gewebe/Organe von der kolorektalen Metastasierung betroffen: Peritoneum (15%), Ovarien (13,1%), Gehirn (8,3%), Knochen (8,7%) und die Niere (6,6%) [65].

1.3.2. Minimale residuale Krebserkrankung

Unter der minimalen residualen Krebserkrankung (*minimal residual disease*) versteht man einzelne Tumorzellen oder kleine Zellaggregate, die nach der vollständigen Resektion des Primärtumors im Körper verbleiben und weder mit Hilfe der Routinediagnostik noch mit modernen hochauflösenden Bildgebungsverfahren nachweisbar sind [66]. Diese sogenannten disseminierten Tumorzellen (DTCs; *disseminated tumor cells*) haben sich bereits präoperativ aus der Primärtumormasse gelöst und sind ins Knochenmark (DTCs), Lymphsystem (DTCs) oder die Blutzirkulation (CTCs, *circulating tumor cells*) gelangt, ohne jedoch detektierbare Metastasen ausgebildet zu haben. Es wird angenommen, dass DTCs die Grundlage für das erneute Auftreten der Krebserkrankung in Form eines Lokalrezidives oder von Fernmetastasen bilden [56, 57, 66].

Diese Hypothese wird durch zahlreiche Studien unterstützt, die eine deutliche Korrelation zwischen dem Nachweis von DTCs und CTCs und einer schlechten Prognose (geringeres progressionsfreies und Gesamtüberleben) von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen zeigen (Tab. 1.3.) [67-73].

Während zu Beginn der Erforschung von minimalen residualen Krebserkrankungen zunächst die Untersuchung von DTC und Mikrometastasen in den Lymphknoten und /oder dem Knochenmark von Krebspatienten im Vordergrund stand, ist heute die Detektion und Analyse von CTCs von zunehmender Bedeutung. Im Gegensatz zu einer Knochenmarkaspiration zum Nachweis von DTCs handelt es sich bei einer einfachen Blutabnahme zur CTC-Analyse um einen nicht-invasiven und folglich wiederholt durchführbaren Eingriff. Hierdurch wird eine Überwachung des CTC- Vorkommens über den gesamten Verlauf der Krebserkrankung möglich. Eine unabhängige prognostische Relevanz von CTCs konnte bisher in metastasierten Brust-, Prostata- und Darmkrebspatienten demonstriert werden [67-69]. In den letzten Jahren wurden außerdem zahlreiche Studien zur Validierung dieser Beobachtungen in anderen Tumorentitäten und früheren Krankheitsstadien durchgeführt [70, 71, 74, 75].

Tab. 1.3.: Verschiedene Studien zur klinischen Relevanz von CTCs in Kolonkarzinompatienten. [CK19/20: Keratin 19/20; CEA: Carcinoembryonales Antigen; PFS: Progressionsfreies Überleben; OS: Gesamtüberleben; RR: Rezidivrate; DFS: Krankheitsfreies Überleben]

Studie	Tumor-stadium	Methode	Marker	CTC Detektions-rate	Klinische Relevanz
COHEN <i>et al.</i> , 2008 [67]	I-IV	CellSearch	EpCAM	26%	PFS ($p = 0.0002$) OS ($p < 0.001$)
UEN <i>et al.</i> , 2007 [76]	II	Array	hTERT, CK19, CK20,CEA	27%	RR ($p < 0.001$) OS ($p < 0.001$)
SADAHIRO <i>et al.</i> , 2007 [77]	I-III	qPCR	CEA	22%	PFS ($p = 0.007$) OS ($p = 0.04$)
IINUMA <i>et al.</i> , 2006 [78]	Duke A-C	qPCR	CK20, CEA	10%	-
SADAHIRO <i>et al.</i> , 2005 [79]	Duke A-D	qPCR	CK20, CEA	39%	DFS ($p < 0.001$) OS ($p < 0.001$)
KIENLE <i>et al.</i> , 2003 [80]	I-III	qPCR	CEA	56%	RR ($p = 0.01$)
SADAHIRO <i>et al.</i> 2001 [81]	I-IV	qPCR	CK20	42%	-

1.3.3. Methoden zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen

Da eine einzelne CTC schätzungsweise mit bis zu 10 Billionen Blutzellen umgeben sein kann [82], sind für eine erfolgreiche Detektion dieser seltenen Zellen sehr effiziente Anreicherungs- und sensitive Nachweismethoden erforderlich. Um eine Anreicherung von CTCs aus Patientenblut zu erreichen, werden verschiedene charakteristische

Zelleigenschaften ausgenutzt. Zum einen kann die Zellseparation physikalisch anhand der Zellgröße und/oder -dichte z.B. durch Filtration oder Dichtegradientenzentrifugation erreicht werden. Zum anderen werden basierend auf dem epithelialen Ursprung der Tumorzellen häufig immunologische Methoden zur Anreicherung von CTCs aus der mesenchymalen Umgebung des Blutes eingesetzt [83, 84]. Diese Selektion kann sowohl in positiver Form durch den Einsatz von Antikörpern gegen epitheliale Oberflächenproteine, wie z.B. EpCAM, als auch in negativer Form durch eine Depletion der Blutzellen mit hämatopoetischen Markern wie z.B. CD45 (*Cluster of Differentiation 45*) erfolgen [83, 84].

Für den Nachweis von CTCs in der angereicherten Zellfraktion werden im Allgemeinen drei verschiedene Ansätze verfolgt. Weit verbreitet sind immunzytochemische Nachweismethoden von CTCs mit Antikörpern gegen epithelspezifische Epitope, wie z.B. Keratine, welche Bestandteil der Intermediärfilamente des epithelialen Zytoskeletts sind. Des Weiteren finden Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierte Methoden zur Detektion von verschiedenen Epithel- und/oder Tumor-spezifischen mRNAs [z.B. Carcinoembryonales Antigen (CEA), Keratin 19 (CK-19), prostate specific antigene (PSA)] im Blut Anwendung [84]. Und schließlich können Tumorzellen auch durch ihre Sekretion von Epithel- und/oder Tumor-spezifischer Proteinen (CK-19, PSA) unter Verwendung von Immunospot-Assays (EPISPOT) (s. 1.3.3.2.) nachgewiesen werden [85-87].

Der Einsatz von sehr unterschiedlichen Techniken zur Anreicherung und Detektion von CTCs führt zu einer signifikanten Varianz der Ergebnisse unterschiedlicher Studien (siehe Tab. 1.3.) und verdeutlicht die Notwendigkeit einer standardisierten Methode zum CTC-Nachweis.

1.3.3.1. CellSearch-System

Die derzeit einzige standardisierte Methode zur CTC-Bestimmung ist das sogenannte *CellSearch*-System (Veridex LLC, Warren, USA). Da die CTC-Bestimmung mit dem *CellSearch*-System weitestgehend automatisiert erfolgt, zeichnet sich diese Detektionsmethode durch eine hohe Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit der Detektionsrate aus [88]. Die Anwendung dieses Gerätes in Verbindung mit dem *CellSearch Circulating Tumor Cell Kit* wurde zudem von der FDA (*Food and Drug*

Administration) bereits zur Überwachung des Krankheitsverlaufes von metastasierten Brust-, Prostata und Kolorektalkarzinompatienten zugelassen.

Beim *CellSearch*-System (Veridex LLC, Warren, USA) erfolgt eine automatisierte Anreicherung und Detektion von CTCs aus dem Blut von Patienten mit epithelialer Krebserkrankung. Für die immunomagnetische Anreicherung von CTCs aus der hämatogenen Umgebung wird hierbei ein an Eisenpartikel gekoppelter, gegen den epithelialen Oberflächenmarker EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) gerichteter Antikörper eingesetzt (Abb. 1.5.). Zur Detektion von CTCs in der angereicherten Zellfraktion wird neben einer Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eine Färbung mit anti-Keratin-Antikörpern (CK8, CK18 und CK19) durchgeführt. Da eine vollständige Eliminierung der in großem Überschuss vorhandenen Blutzellen im Anreicherungsschritt nicht möglich ist, dient der zusätzliche Ausschluss von Leukozyten durch den hämatogenen Marker CD45 als Negativkontrolle.

Die prognostische Relevanz der CTC-Bestimmung mit dem *CellSearch*-System konnte bereits in großangelegten Studien für Patienten mit metastasiertem Brust-, Prostata- und Darmkrebs gezeigt werden [67-68, 89]. Hierbei konnte für das metastasierte Mamma- und Prostatakarzinom eine signifikant schlechtere Prognose für Patienten mit

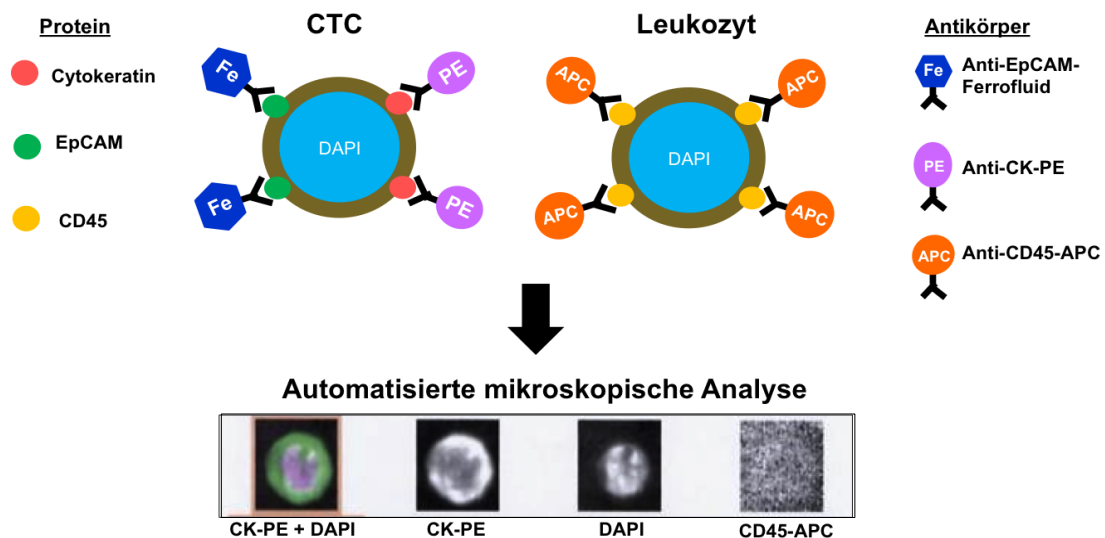


Abb. 1.5.: CTC-Anreicherungs- und Detektionsprinzip des *CellSearch*-Systems. Die Anreicherung von CTCs erfolgt immunomagnetisch durch die Bindung von Antikörpern, die mit Ferrofluidpartikeln verknüpft sind, an das epitheliale Oberflächenprotein EpCAM. Die Detektion der CTCs erfolgt mit Hilfe einer Kernfärbung mit DAPI und eines Phycoerythrin (PE)-markierten anti-Keratin-Antikörpers (CK-PE). Ein Allophycocyanin (APC)-markierter anti-CD45-Antikörper bindet an die Oberfläche von Leukozyten und dient folglich als Negativkontrolle. Keratin- und DAPI-positive, CD45-negative Zellen werden schließlich als CTCs identifiziert.

mindestens 5 CTCs in 7.5mL Blut beobachtet werden als für Patienten mit <5 CTCs [68-69]. In einer von COHEN *et al.* [67] durchgeführten Untersuchung des peripheren Blutes von Patienten mit metastasiertem Kolorektalkarzinom konnte ein verkürztes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bereits für Patienten mit mindestens 3 CTCs in 7.5 mL Blut demonstriert werden. Diese signifikante Korrelation wurde durch weitere Arbeiten bestätigt [90-91]. In aktuellen Studien konnten außerdem ähnliche Ergebnisse für weitere Tumorentitäten, wie z.B. Lungen- und Blasenkarzinome [70, 92] sowie für nicht-metastasierte Patienten [90, 93-94], erzielt werden. Darüber hinaus konnte das *CellSearch*-System auch erfolgreich zur Beurteilung des Therapieerfolges in Mammakarzinompatientinnen eingesetzt werden [95].

1.3.3.2. EPISPOT-Assay

Im Gegensatz zu anderen CTC-Detektionsmethoden werden mit dem sogenannten EPISPOT (EPithelialer ImmunoSPOT) ausschließlich intakte, lebensfähige Tumorzellen im Blut nachgewiesen [85, 96]. Bei immunzytochemischen Nachweisverfahren sind zwar apoptotische Zellen z.T. anhand ihrer Zellmorphologie identifizierbar, eine Aussage über die zelluläre Aktivität und Lebensfähigkeit der Zellen kann jedoch nicht getroffen werden. Mit dem EPISPOT hingegen werden einzelne Zellen anhand von Proteinen identifiziert, die von den Zellen aktiv sekretiert oder freigesetzt werden und folglich die Funktionsfähigkeit der intrazellulären Vorgänge voraussetzen [97].

Der EPISPOT stellt eine Adaption des *Enzyme-linked Immunospot Assays* (ELISPOT) dar, welcher vornehmlich zur Analyse der Immunantwort in humanen Zellen Anwendung findet [85]. Hierbei wird die Anzahl an Zellen bestimmt, welche als Reaktion auf bestimmte Stimuli das im jeweiligen Assay untersuchte Antigen sekretieren. Der Nachweis von CTCs mit Hilfe des EPISPOTs erfolgt derzeit über die Detektion von Keratin-19 (CK19) und/oder MUC1 (*tumor antigen mucin1*), welches durch die Tumorzellen sekretiert wird [85, 97]. Im Prostatakarzinom kann auch die Sekretion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) zur CTC-Detektion herangezogen werden [86].

Zur Analyse von Blutproben mit Hilfe des EPISPOT-Assays wird zunächst eine Anreicherung von CTCs mit Hilfe des *RosetteSep*[®] Antikörpercocktails für humane zirkulierende Tumorzellen (*Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail*, Stem Cell Technologies, Grenoble, F) durchgeführt. Der Cocktail enthält verschiedene,

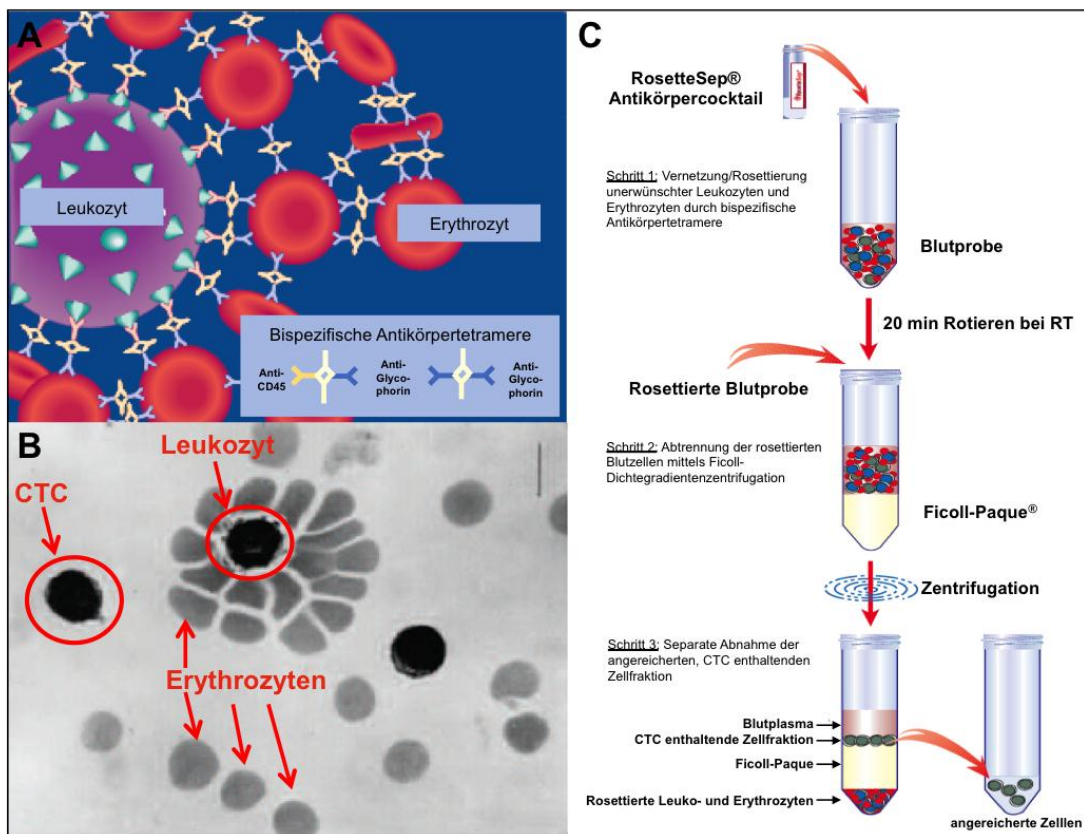


Abb. 1.6.: Anreicherung von CTCs aus Blutproben mit Hilfe des *RosetteSep*-Antikörpercocktails. Die bispezifischen Antikörpertetramere (A) des *RosetteSep*-Kits bewirken eine Vernetzung von unerwünschten Leukozyten und Erythrozyten zu rosettenförmigen Zellaggregaten (B), welche mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von der die CTCs enthaltenden Zellfraktion abgetrennt werden (C).

gegen hämatopoetische Zellen gerichtete Antikörper (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b), die jeweils mit einem gegen Glycophorin A, ein Protein der Erythrozytenmembran, gerichteten Antikörper zu bispezifischen Antikörperkomplexen verknüpft sind (Abb. 1.6.A). Durch die gleichzeitige Bindung von Leuko- und Erythrozyten bewirken diese Antikörperkomplexe eine Vernetzung der unerwünschten Blutzellen zu sogenannten Rosetten (Abb. 1.6.B), welche schließlich basierend auf ihrer hohen Dichte von der CTC-enthaltenen Fraktion abgetrennt werden können (Abb. 1.6.C). Der Nachweis von sekretierten, tumorspezifischen Proteinen in der angereicherten Zellfraktion (Abb. 1.7.) basiert auf der ELISA-Sandwich-Technik, weist jedoch im Gegensatz dazu eine weitaus höhere Sensitivität auf [97]. Durch die Antikörperbindung der Zielproteine unmittelbar nach der Sekretion aus der Zelle kann mit Hilfe des ELI-/EPISPOTs eine Zielzelle in bis zu 10^4 Zellen in Form eines Immunospots detektiert werden [98].

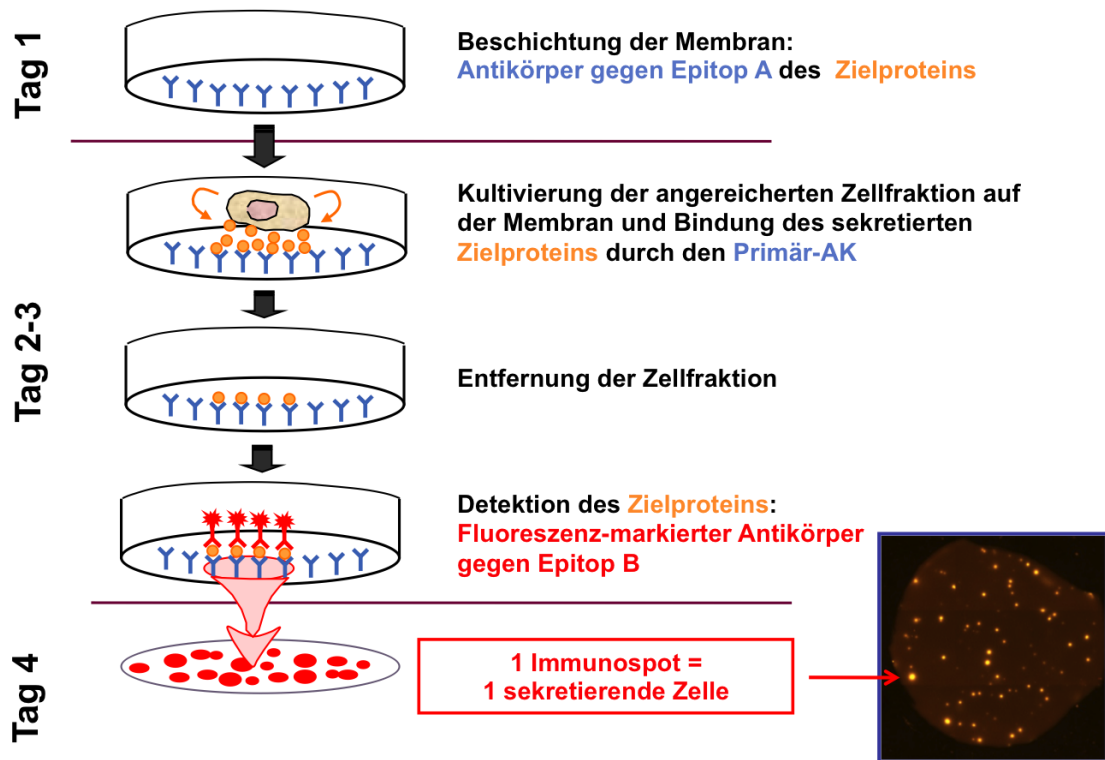


Abb. 1.7.: Prinzip der EPI-/ELISPOT-Technik zur Detektion von Zellen mit spezifischer Proteinsekretion. Zur Detektion von CTCs werden Epithel- oder Tumor-spezifische Antikörper z.B. gegen Keratin 19 oder PSA eingesetzt. Modifiziert nach ALIX-PANABIÈRES *et al.* 2009 [97]

Mit Hilfe des EPISPOT-Assays konnten in ersten Studien MUC1- bzw. PSA-sekretierende Zellen im Knochenmark bzw. Blut eines Großteils von metastasierten Mamma- bzw. Prostatakarzinompatienten nachgewiesen werden (Mammakarzinom: 100% der Patienten [85, 96]; Prostatakarzinom: 83,3% der Patienten [85, 86]). Des Weiteren wurden PSA-sekretierende Tumorzellen auch in nicht-metastasierten Prostatakarzinompatienten (20% der Patienten), jedoch in geringerer Anzahl (Mittelwert: 9 Zellen in M0 versus 29 Zellen in M1 Patienten) gefunden. Im Blut von gesunden Probanden und Patienten mit benignen Hyperplasien der Prostata waren hingegen keine derartigen Zellen detektierbar [86]. Der CK19-EPISPOT-Assay wurde in aktuellen Studien in Kombination mit dem MUC1-Assay erfolgreich zur DTC-Detektion im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen eingesetzt. Hierbei konnten CK19- und MUC1-sekretierende DTCs in 70% bzw. 65% der metastasierten und in 44% bzw. 48% der nicht-metastasierten Patienten detektiert werden. Die Korrelation mit klinischen Parametern zeigte, dass das Vorhandensein von CK19-sekretierenden DTCs mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [97]. In weiterführenden Untersuchungen konnte zudem die

prognostische Relevanz von CK19-sekretierenden CTCs im peripheren Blut von Mammakarzinompatienten mit overten Metastasen demonstriert werden [85].

Mit dem EPISPOT ist neben der Detektion von lebensfähigen Tumorzellen im Blut und Knochenmark von Krebspatienten auch eine nähere Charakterisierung des Proteinsekretionsprofils dieser Zellen möglich.

1.4. Einzelzellanalyse

Die molekulare Untersuchung von Zellen auf Einzelzellebene liefert nicht nur Einblicke in die molekulare Zusammensetzung von Zellgemischen, sondern ist vor allem zum Nachweis von seltenen genetischen Veränderungen in individuellen Zellen einer Zellpopulation von Nutzen. So könnte z.B. die Detektion einer *KRAS*-Mutation in CTCs eines Darmkrebspatienten (s. EGFR-Signalweg), die im heterogenen Primärtumor nur in vereinzelter Regionen vertreten sind und folglich bei der Routinediagnostik an Tumorbiopsien unentdeckt bleiben, von großer Bedeutung für den Einsatz von anti-EGFR-Immuntherapien zur Behandlung des Patienten sein.

Die molekulare Analyse von Zellen auf Einzelzellebene stellt aufgrund der sehr geringen DNA-/RNA-Mengen (etwa 7 pg DNA pro Zelle) eine große methodische Herausforderung dar. Neben ersten Studien zur RNA-Analyse aus Einzelzellen [99-102] wurden bereits einige Studien zur Untersuchung von genomischer DNA aus Einzelzellen durchgeführt. So konnten bereits einzelne Tumorzelllinienzellen [103-107] und auch mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherte DTCs/CTCs aus dem Blut und Knochenmark verschiedener Krebspatienten [64, 108, 109] erfolgreich für Metaphasen- und Array-CGH-Analysen eingesetzt werden. Darüber hinaus konnten Einzelzell-DNAs zur Untersuchung des Verlustes der Heterozygotie (*loss of heterozygosity* – LOH) und zur Bestimmung des HER2- oder EGFR-Amplifikationsstatus durch quantitative (*real time*) PCR verwendet werden [108, 110]. Diese ersten Studien bilden die Grundlage für eine Weiterentwicklung von Techniken zur Einzelzellanalyse und somit einer weiterführenden Analyse einzelner CTCs.

1.5. Fragestellung

Basierend auf ihrer prognostischen Relevanz wird zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung von Krebserkrankungen zugeschrieben. Die CTC-Bestimmung im Laufe einer Therapie kann zudem als Indikator für die Effizienz und Prognose der gewählten therapeutischen Maßnahme dienen. Für die Anreicherung und Detektion von CTCs sind zahlreiche unterschiedliche Techniken etabliert worden, das durch die FDA-zugelassene *CellSearch*-System stellt jedoch derzeit den "Goldstandard" im Bereich der CTC-Analyse dar.

Eine nähere molekulare Charakterisierung von CTCs könnte nicht nur zu einem besseren Verständnis des Metastasierungsprozesses beitragen, sondern auch von großer klinischer Bedeutung sein. Derzeit werden Entscheidungen über die Anwendung bestimmter Therapien (z.B. anti-EGFR Immuntherapie) anhand von molekularen und histochemischen Analysen therapierelevanter Marker (z.B. *KRAS*) ausschließlich an Biopsien des Primärtumors getroffen. Neben der intratumoralen Heterogenität des Primärtumors wurden in mehreren Studien auch unterschiedliche molekulare Ereignisse im Primärtumor und der daraus hervorgegangenen Metastase gefunden [17-20]. Inwieweit Analysen kleiner Biopsien die molekulare Beschaffenheit des Primärtumors repräsentieren können, ist fraglich. Des Weiteren gibt die Primärtumor-Analyse lediglich Auskunft über den Zustand zum Zeitpunkt der Diagnose. Insbesondere für Krebserkrankungen mit einer längeren Latenzzeit zwischen dem Zeitpunkt der Diagnose und der Entwicklung von Metastasen (z.B. Darmkrebs) ist die Eignung der alleinigen Primärtumor-Analyse als Grundlage für Therapieentscheidungen in Frage zu stellen.

Die Analyse spezifischer molekularer Marker in CTCs von Krebspatienten hingegen könnte als "flüssige Biopsie" Verwendung finden, die einfach und wiederholt durchführbar ist, die Erkrankung zum Zeitpunkt der Blutabnahme widerspiegelt und folglich eine individualisierte Krebstherapie ermöglicht.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand deshalb die molekulare Analyse von einzelnen mittels *CellSearch* detektierter CTCs aus dem Blut von Kolorektalkarzinompatienten. Zu diesem Zweck sollten zunächst mit Hilfe von Zelllinienexperimenten verschiedene Methoden (CGH, qPCR und Sequenzierungen) zur Einzelzellanalyse etabliert werden.

Die Analyse von Patienten-CTCs unter Verwendung dieser Techniken sollte anschließend einen Einblick in die molekulare Beschaffenheit von CTCs vermitteln.

Die primäre Aufgabenstellung bestand darin zu untersuchen, ob CTCs charakteristische gemeinsame genetische Veränderungen in Form von chromosomalen Aberrationen, Genamplifikationen und/oder Genmutationen zeigen und inwieweit verschiedene CTCs eines Patienten übereinstimmende oder abweichende molekulare Eigenschaften aufweisen. Hierbei sollten verschiedene Tumor-assoziierte und therapeutisch relevante Gene auf Amplifikationen (*EGFR*, *AURKA*, *C-MYC*, *LGR5*) und/oder Mutationen (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *P53*) untersucht werden. Derartige Analysen von CTCs auf Einzelzellebene könnten zukünftig als Hilfsmittel für Therapieentscheidungen dienen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Zytotoxizitäts-Assay unter Einsatz der EPISPOT-Technik (s. 3.3.2.). Es sollte also eine Methode zur Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika (z.B. 5-Fluorouracil, Oxaliplatin) auf intakte, lebensfähige CTCs entwickelt werden, die es ermöglicht, den Erfolg verschiedener Therapieansätze in Krebspatienten einzuschätzen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Eine detaillierte Auflistung aller eingesetzten Laborgeräte ist dem Anhang I zu entnehmen.

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang II aufgeführt.

2.1.3. Größenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen (s. 2.2.4.6.) wurde sowohl der 100 bp *DNA Molecular Weight Marker XIV* (Roche Diagnostics, Mannheim, D) als auch der *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Roth, D) verwendet. Das Molekulargewicht von Proteinen wurde mit Hilfe des *Full Range Rainbow™ Molecular Weight Marker RPN800* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) im SDS-Gel (s. 2.2.5.3.) ermittelt.

2.1.4. Oligonukleotide (Primer)

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Primer wurden in lyophilisierter, entsalzter Form von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen. Eine Übersicht ist im Anhang III dargestellt.

2.1.5. Antikörper

Tab 2.1.: Übersicht verwendeter monoklonale Antikörper. [WB: Westernblot; ICC: Immunzytochemie; ES:EPISPOT].

Antikörper	Klon	Ursprungs- organismus	Firma	Verdünnung
Primärantikörper				
CK19	Ks19.1	Maus	Progen, Heidelberg, D	WB 1:1000, ICC: 1:100 ES: 600ng/well
CK8	KS8.7	Maus	Progen, Heidelberg, D	WB: 1:50000
CK18	KS18.04	Maus	Progen, Heidelberg, D	WB: 1:50000
EpCAM (NCL-ESA)	VU1D9	Maus	NOVOCASTRA, Berlin, D	WB: 1:200, ICC: 1:100
E-Cadherin	EP700Y	Kaninchen	EPITOMICS, Burlingame, CA, USA	WB: 1:2x10 ⁶
E-Cadherin	36	Maus	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	ICC: 1:200
Vimentin	RV202	Maus	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	WB: 1:2 x 10 ⁶
CD133*	-	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	WB: 1:200
ALDH1	44	Maus	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	WB: 1:250, ICC:1:40
LGR5 (GPR49)	EPR3065Y	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	WB: 1:500
Hsc70	B6	Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	WB: 1:10 ⁶
Sekundärantikörper				
CK19.2-Alexa 555 Klon Ks 19.2	19.2	Maus	Progen, Heidelberg, D	ES: 300 ng/well
anti-Maus- Immunoglobine-HRP*	-	Kaninchen	Dako, Glostrup, DK	WB: 1:1000
anti-Kaninchen- Immunoglobine-HRP*	-	Maus	Dako, Glostrup, DK	WB 1:2000
Alexa Fluor* 488 anti- mouse IgG*	-	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, D	ICC: 1:200
Anti-Kaninchen- Immunoglobine-AP	-	Ziege	Dako, Glostrup, DK	ICC: 1:40
Anti-Maus Immunoglobine	-	Kaninchen	Dako, Glostrup, DK	ICC: 1:20
APAAP-Komplex	-	Maus	Dako, Glostrup, DK	ICC: 1:100

*: polyklonaler Antikörper

2.1.6. Kommerzielle Kits

Tab. 2.2.: Übersicht verwendeter käuflicher Systeme (Kits)

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
<i>Big Dye Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>	Sequenzierung	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>First strand cDNA Synthesis Kit</i>	Reverse Transkription	Fermentas, St. Leon-Roth, D
<i>CellSearch Epithelial Cell Kit</i>	CTC-Detektion	Veridex LLC, Warren, USA
<i>peqGOLD Gel Extraction Kit</i>	Gelextraktion	PEQLAB, Erlangen, D
<i>GenomPlex Whole Genome Amplification Kit</i>	Amplifikation von Einzelzell-DNA (WGA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit</i>	Amplifikation von Einzelzell-DNA (WGA)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
<i>GenElute™ PCR Clean-Up Kit</i>	Aufreinigung von WGA-Produkten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>NucleoSEQ® Columns</i>	Aufreinigung von WGA-Produkten	Macherey-Nagel, Düren, D
<i>RosetteSep™ Human Circulating Epithelial Tumor Cells Enrichment Cocktail</i>	CTC-Anreicherung	StemCell Technologies, Vancouver, CDN
<i>Alexa Fluor 555 Monoclonal Antibody Labeling Kit</i>	Antikörper-Fluoreszenzmarkierung	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix</i>	Realtime PCR	Fermentas, St. Leon-Roth, D
<i>QIAamp DNA Micro Kit</i>	DNA Isolierung	Qiagen, Hilden, D
<i>RNeasy DNA Mini Kit</i>	RNA Isolierung	Qiagen, Hilden, D
<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	Proteinbestimmung	Thermo Scientific, Wilmington, USA

2.1.7. Analysesoftware und Datenbanken

Tab. 2.3.: Übersicht verwendeter Analysesoftware und Datenbanken

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
<i>Realplex Software V2.02</i>	Steuerung und Auswertung der Realtime-PCR	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Sequence Analysis Tool</i>	Visualisierung/Auswertung von DNA-Sequenzierungen	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>FinchTV</i>	Visualisierung/Auswertung von DNA-Sequenzierungen	www.geospiza.com/finchtv/
<i>Sequence Manipulation Suite</i>	Analyse von DNA Sequenzen	www.bioinformatics.org/sms2/
<i>NCBI</i>	Datenbank (DNA, RNA, Proteine, Literatur etc.)	www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>UCSC</i>	Datenbank (DNA, RNA, Proteine etc.)	http://genome.ucsc.edu/

2.1.8. Zelllinien und Zellmedien

Eine Auflistung der verwendeten Zelllinien ist in Tab. 2.4. dargestellt. Zur Kultivierung der Zelllinien wurden folgende Medien verwendet:

RPMI-Medium

- 90 % RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein, D)
- 10 % FCS, hitzeinaktiviert (PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU)
- 0,5 % Penicillin-Streptomycin Mix (Endkonz. 50 U/mL, Gibco, Eggenstein, D)
- 2mM L-Glutamin (Gibco, Eggenstein, D)

DMEM-Medium

- 90 % DMEM Medium (4,5 g/L D-Glucose, 110 mg/L Pyruvat; Gibco, Eggenstein, D)
- 10 % FCS, hitzeinaktiviert (PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU)
- 0,5 % Penicillin-Streptomycin Mix (Endkonz. 50 U/mL, Gibco, Eggenstein, D)
- 2mM L-Glutamin (Gibco, Eggenstein, D)

Tab. 2.4.: Übersicht verwendeter Zelllinien

Bezeichnung	Typ	Ursprung	Medium
BT20 ¹⁾	duktales Mammakarzinom	Primärtumor	RPMI
BT474 ¹⁾	duktales Mammakarzinom	Primärtumor	DMEM
Caco2 ²⁾	Adenokarzinom des Kolon	Primärtumor	RPMI
HepG2 ³⁾	Hepatozelluläres Karzinom	Primärtumor	RPMI
HT29 ²⁾	Adenokarzinom des Kolon	Primärtumor	RPMI
MCF7 ⁴⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion	DMEM
MDA-MB-231 ¹⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion	DMEM
MDA-MB-468 ⁴⁾	Adenokarzinom der Brust	Pleuraeffusion	DMEM
SKBR3 ⁴⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion	DMEM

1) bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

2) bezogen von PD Dr. Hüseyin Sirma (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, D)

3) bezogen von Prof. Dr. Udo Schumacher (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, UKE, Hamburg, D)

4) bezogen von der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas`Hospital, London, UK

2.1.9. Patientenmaterial

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden von der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Kollektiv A: 47 Patienten), dem Institut für Innere Medizin der Medizinischen Universität Graz (Kollektiv B: 35 Patienten), dem Klinikum Chemnitz (Kollektiv C: 35 Patienten) sowie einer weiteren anonymen Institution (Kollektiv D: 6 Patienten) zur Verfügung gestellt.

Die Abnahme von etwa 7.5 mL venösem Blut erfolgte präoperativ in *CellSave Preservative Tubes* (Veridex, Raritan, NJ, USA).

Bei sämtlichen analysierten Patienten wurde ein primäres Kolorektalkarzinom verschiedener Entwicklungsstufen (TNM-Stadium) diagnostiziert und der Primärtumor und/oder die entsprechende Metastase operativ entfernt. Während für die Patienten der Kollektive C und D lediglich die Diagnose bekannt war, ist eine Übersicht der klinischen Parameter der Kollektive A und B in Tab. 2.5. gegeben.

Tab. 2.5.: Übersicht der klinischen Parameter der Patientenkollektive A und B. TNM-Klassifikation [T1-T4: Tumorgröße, N0-N3: Anzahl befallener Lymphknoten, M0/M1: Vorhandensein von Fernmetastasen, m: männlich, w: weiblich].

	Kollektiv A	Kollektiv B
Geschlecht		
m	28	23
w	17	9
unbekannt	2	4
Alter		
Bereich	34 - 85	45 - 81
Mittelwert	65	69
unbekannt	-	4
Tumorgröße		
T4	10	7
T3	26	18
T2	5	1
T1	6	-
unbekannt	-	10
Lymphknotenstatus		
N0 (negativ)	24	5
N+ (positiv)	23	20
unbekannt	-	10
Metastasierungsstatus		
M0 (negativ)	31	2
M1 (positiv)	16	33
Gesamtzahl analysierter Patienten	47	35

Eine Einwilligungserklärung aller Patienten für die Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken sowie eine entsprechende Genehmigung der jeweils zuständigen Ethikkommission liegt vor.

2.1.10. Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders vermerkt, wurde zur Herstellung von Lösungen mittels einer Wasseraufbereitungsanlage (0,2 µm Filtergröße, MembraPURE GmbH, Bodenheim, D) gereinigtes Wasser verwendet.

Im Folgenden sind häufig eingesetzte Lösungen aufgeführt:

10 x PBS pH 7.4 (1L):	90 g NaCl; 14.4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 2.67 g KH ₂ PO ₄ pH mit NaOH einstellen
10 x TPBS pH 7.4 (1L):	1 x PBS, 5 g Tween 20
6 x DNA-Ladepuffer (25 mL):	37.5 mg Xylen Cyanol FF; 0.75 mL 1 M Tris/HCl pH 7.6; 15 mL Glycerin; 25 mg Orange G
50 x TAE (1L):	242 g Tris; 57.1 mL 100% Essigsäure 100 mL 0.5 M EDTA pH 8.0

Die Zusammensetzungen weiterer verwendeter Lösungen sind den entsprechenden Methoden (s. 2.2.) zu entnehmen.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5% (RPMI-Medium, s. 2.1.8.) oder 10% (DMEM-Medium s. 2.1.8.). Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, DK) passagiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen einmal mit PBS (37 °C, GIBCO) gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA (0.05%/0.02%) vom Boden der Kulturflasche gelöst und mittels Zentrifugation (3 min, 1200 x g) pelletiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Zellmedium resuspendiert und in einer der Zellteilungsrate angemessenen Verdünnung wieder ausgesät.

Zur Langzeitlagerung von Zelllinien wurden die Zellen wie zuvor beschrieben trypsinisiert und pelletiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 1–5 mL Einfriermedium (90% Zellmedium, 10% DMSO) resuspendiert und jeweils 1 mL in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte über Nacht bei -80 °C unter Verwendung einer Einfrierbox (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA), die für eine zellschonende, graduelle Abkühlung von -1 °C/min sorgt. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen schließlich zur Konservierung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Für eine erneute Kultivierung derart gelagerter Zellen wurden diese bei 37 °C aufgetaut, zügig in 10 mL Zellmedium transferiert und durch Zentrifugation (3 min, 1200 x g) pelletiert. Die Zellen wurden in entsprechendem Medium aufgenommen, in eine Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank *Heracell 150* (*Heraeus Kendro*, Langselbold, D) inkubiert.

Sämtliche für Analysen verwendete Zellen wurden unter Verwendung des *Venor® GeM Kits* (*minerva-biolabs*, Berlin, D) gemäß Herstellerprotokoll auf Mykoplasmen getestet. Die für einige Versuche benötigte Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (*Marienfeld Superior*, Lauda-Königshofen, D) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.2. Selektion einer Oxaliplatin-resistenten Subpopulation von HT29 Zellen

Zur Etablierung eines Oxaliplatin-resistenten HT29-Subklons, wurde das RPMI-Zellmedium von HT29 Zellen mit graduell ansteigenden Konzentrationen des Zytostatika versetzt, bis schließlich die in der klinischen Praxis verwendete Dosis des Zytostatikas von 2 µg/mL (im Blut eines chemotherapierten Patienten) erreicht wurde. Die Zellen wurden nach dem Auftauen zunächst in T25-Kulturflaschen in RPMI-Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 80% angezogen. Die weitere Kultivierung erfolgte schrittweise in RPMI-Medium mit einer Oxaliplatin-Konzentration von 0,1 µg/mL (Schritt 1), 0,5 µg/mL (Schritt 2), 1 µg/mL (Schritt 3) und schließlich 2 µg/mL (Schritt 4). Hierbei wurden für jede Konzentration Kryos zu Konservierung und erneuten Kultivierung der Zellen hergestellt (s. 2.2.1.1.). Aus derart selektierten Zellen, die auch unter Einwirkung von 2 µg/mL Oxaliplatin weiterhin kultivierbar blieben, wurden zur weiteren Analyse RNA und Proteine (s. 2.2.4.2. und 2.2.5.1.) isoliert.

2.2.2. Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut

2.2.2.1. Detektion von CTCs mit dem CellSearch-System (s. 1.3.3.1.)

Die Anreicherung und Detektion von CTCs aus dem Blut von Tumorpatienten wurde mit Hilfe des *Circulating Epithelial Cell Kit* des automatisierten *CellSearch® Autoprep Systems* (beides Veridex, Raritan, NJ, USA) durchgeführt.

Zu analysierende Blutproben wurden unter Verwendung von speziellen, eine zellstabilisierende Substanz enthaltenden Röhrchen (*CellSave Preservative Tubes*, Veridex, Raritan, NJ, USA) entnommen und bei Raumtemperatur bis zu 96h gelagert. Zur Analyse wurden jeweils 7.5 mL Blut in Probenröhrchen überführt und mit 6.5 mL Verdünnungspuffer versetzt. Im Anschluss an eine 10 minütige Zentrifugation (800 rpm, Beschleunigung und Bremse: Stufe 1) wurden CTCs mit Hilfe von anti-EpCAM Antikörper konjugiertem *Ferrofluid* im *CellSearch*-Gerät immunomagnetisch angereichert. Zur Detektion von CTCs erfolgte im *CellSearch*-System eine automatisierte Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol), die Färbung der Keratine 8, 18 und 19 (Phycoerythrin-markierter Antikörper), sowie die der Unterscheidung von CTCs und Blutzellen dienende Visualisierung des hämatopoetischen Oberflächenmarkers CD45 (Allophycocyanin-markiert Antikörper). Zum Abschluss des *CellSearch*-Laufs lag die Probe

in einem Volumen von 300 µL in der sogenannten *CellSearch*-Kartusche vor. Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes mit Hilfe des sogenannten *MagNest[®] cell presentation device* (Veridex, Raritan, NJ, USA), wurde die regelmäßige Anordnung der angereicherten, an anti-EpCam-*Ferrofluid* gebundenen Zellen auf der Kartuschenoberfläche bewirkt, welche schließlich durch eine automatisierte Mikroskopeinheit (*CellTracks[®] Analyzer II*, Veridex, Raritan, NJ, USA) nach Keratin-positiven Ereignissen durchsucht wurde. Durch die manuelle Auswertung dieser Ereignisse wurden Zellen mit dem CTC-typischem Färbungsmuster (Keratin-/DAPI-positive und CD45 negative) als solche identifiziert.

Bis zur möglichen Weiterverwendung zur Einzelzellanalyse (s. 2.2.3.) wurden die Kartuschen bei 4 °C gelagert.

2.2.2.2. Detektion von CTCs mit dem CK19-EPISPOT-Assay (s. 2.3.3.2.)

2.2.2.2.1. CTC-Anreicherung mittels RosetteSep-Antikörpercocktail

Das zu analysierende Blut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen und zunächst in ein dem Blutvolumen angepassten Falcon-Reaktionsgefäß (Tab. 2.6.) überführt. Nach Zugabe von 20 µL Antikörpermix pro mL Blutvolumen wurde die Probe für mindestens 20 min auf langsamster Stufe auf einem Rotator (Rotator Drive Star, Stuart Scientific, Staffordshire, UK) inkubiert. Die Probe wurde 1:1 mit PBS/2% FCS verdünnt und vorsichtig auf ein definiertes Volumen *Ficoll-PaqueTM plus* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) transferiert (Tab. 2.6.). Mit Hilfe einer anschließenden Zentrifugation (20 min, 2500 rpm, Bremse: Stufe 1) wurde die Ausbildung eines Dichtegradienten und hierdurch die Abtrennung der rosettierten Erythro- und Leukozyten bewirkt. Die CTCs enthaltende Interphase wurde großzügig abgenommen, in ein neues 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und die Zellfraktion jeweils einmal mit PBS/2% FCS und einmal mit entsprechendem Zellmedium (s. 2.1.8.) gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 2500 rpm). Nach Resuspension des Zellpellets in 100 µL Medium pro mL Ausgangsblutvolumen konnte der Transfer auf die EPISPOT Platte erfolgen (s. 2.2.2.2.2.).

Tab. 2.6.: Volumen des Ficoll-PaquesTM plus in Abhängigkeit vom Blutvolumen der Probe.

Blutvolumen	Ficoll-Paque	Falcon-Reaktionsgefäß
2 mL	3 mL	15 mL
4mL	4 mL	15 mL
5 mL	15 mL	50 mL
8 mL	15 mL	50 mL
10 mL	15 mL	50 mL
15 mL	15 mL	50 mL

2.2.2.2.2. Detektion von CK19-Immunospots/CTCs

Zur Detektion von CTCs in den mit *RosetteSep* vorbehandelten Blutproben (s. 2.2.2.2.1.) wurde ein gegen Keratin 19 (CK19) gerichteter EPISPOT-Assay durchgeführt. Hierzu wurden 96-Well-Platten (*MultiScreen-IP*, 0.45 µm, steril, Millipore, Billerica, MA, USA) verwendet, die zum Zweck einer erhöhten Proteinbindungskapazität am Boden der einzelnen Vertiefungen mit einer hydrophoben Immobilon-P Membran (PVDF-Membran; Polyvinylidenfluorid) versehen sind.

Die Membranen in den Wells wurden nach einer Aktivierung mit je 100 µL gekühltem 70% EtOH (2 min Inkubation bei RT), dreimal mit je 100 µL PBS gewaschen und schließlich mit jeweils 600ng/100µL CK19.1 Antikörper (s. 2.1.5.) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am Folgetag wurden die Membranen mit PBS gewaschen, für mindestens 2 h mit 5% BSA (in PBS) bei 37 °C blockiert, erneut mit PBS gespült und schließlich mit den *RosetteSep* angereicherten, zu analysierenden Zellfraktionen beladen (je 100 µL pro Well). Als Kontrolle wurden zusätzlich bei jedem Assay direkt aus der Kultur stammende Tumorzelllinienzellen (Positivkontrolle) sowie zellfreies Zellmedium (Negativkontrolle) auf die Platte geladen. Es folgte eine 48-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°. Durch intakte Tumorzellen sekretiertes CK19 wurde nach dem Entfernen der Zellen und Waschen der Wells (6 x PBS/0.1% Tween, 3 x PBS) schließlich mit Hilfe eines Alexa 555 markierten (s. 2.2.2.3) CK19.2 Antikörpers (s. 1.5.) visualisiert. Hierzu wurden je 150 ng/100 µL des Zweitantikörpers (verdünnt in 5% BSA/PBS) in jedes Well gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 6 Waschschritten (3 x PBS/0.1% Tween, 3 x PBS), wurde der unter der Platte befindliche Durchlaufschutz entfernt, die Membranunterseite sorgfältig mit Leitungswasser gespült und bei 37 °C getrocknet.

Abschließend wurden die getrockneten Membranen mit dem sogenannten *ELI-puncher* auf eine adhäsive Folie übertragen (beides enthalten im *MELIPUNCH Multiscreen ELISPOT Filter Removal Kit*, Millipore, Billerica, MA, USA) und bei RT im Dunkeln gelagert. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des *CellaVista* System (Roche Diagnostics (Mannheim, D) oder wurde am Institut für die Erforschung von Biotherapien am Universitätsklinikum Montpellier (Montpellier, F) mit Hilfe eines mit einem KS ELISPOT-Axio Imager M1 ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop (beides Zeiss, Jena, D) durchgeführt.

2.2.2.2.3. Konjugation des CK19.2-Sekundärantikörpers mit Alexa Fluor® 555

Die Fluoreszenzmarkierung des CK19.2 Antikörpers (s. 2.1.5) wurde mit dem *Alexa Fluor® 555 Monoclonal Antibody Labeling Kit* (Invitrogen, Karlsruhe, D) durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst eine 1mg/mL Verdünnung des aufgereinigten, BSA-freien Antikörpers in einem Endvolumen von 100 µL hergestellt. Nach Zugabe von 11 µL 1 M Natriumbicarbonat-Puffer (Kit: Komponente C) wurde das Gemisch mit dem Fluorochrom (Kit: Komponente A) vereinigt und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

Für die anschließende Aufreinigung des markierten Antikörpers wurde das im Kit enthaltene Säulchen (Komponente D) mit 2 mL Aufreinigungsgranulat (Kit: Komponente C) gefüllt und bis zum vollständigen Absetzen des Granulats etwa 45 min bei RT stehen gelassen. Im Anschluss an eine kurze Zentrifugation des Säulchen (5 min, 1200 x g) folgte die Beladung des Granulats mit dem Antikörper-Markierungs-Reaktionsgemisch sowie ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1200 x g) zur Gewinnung des aufgereinigten Fluoreszenz-markierten Antikörpers. Die Antikörperkonzentration sowie die Effizienz der Markierung (Berechnung nach Angaben des *Labeling Kit*-Herstellers) wurden mit Hilfe des *NanoDrop ND-1000 Spektrometers* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Die Lagerung des markierten Antikörpers erfolgte bei -20 °C.

2.2.3. Molekulare Einzelzellanalyse von CTCs/Zelllinienzellen

2.2.3.1. Isolierung von Einzelzellen durch Mikromanipulation

Für die Mikromanipulation von Einzelzellen musste die im *CellSearch*-System angereicherte Zellfraktion zunächst aus der *CellSearch*-Kartusche auf Objektträger (*SuperFrost Plus adhesion slides*, Karl Hecht, Sondheim, D) transferiert werden. Um hierbei den Verlust und die Beschädigung von Zellen möglichst gering zu halten, wurden die an den Tumorzellen bindenden Ferrofluid-Partikel unter Verwendung von 0.5-200 μ L *MultiFlex* Pipettenspitzen (PEQLAB, Erlangen, D) vorsichtig von der Kartuschenoberfläche gelöst, resuspendiert und auf einen Objektträger übertragen. Da dieser Transfer jedoch stets mit einem gewissen Zellverlust einhergeht waren ausschließlich Proben mit mehr als 5 CTCs für die Mikromanipulation geeignet.

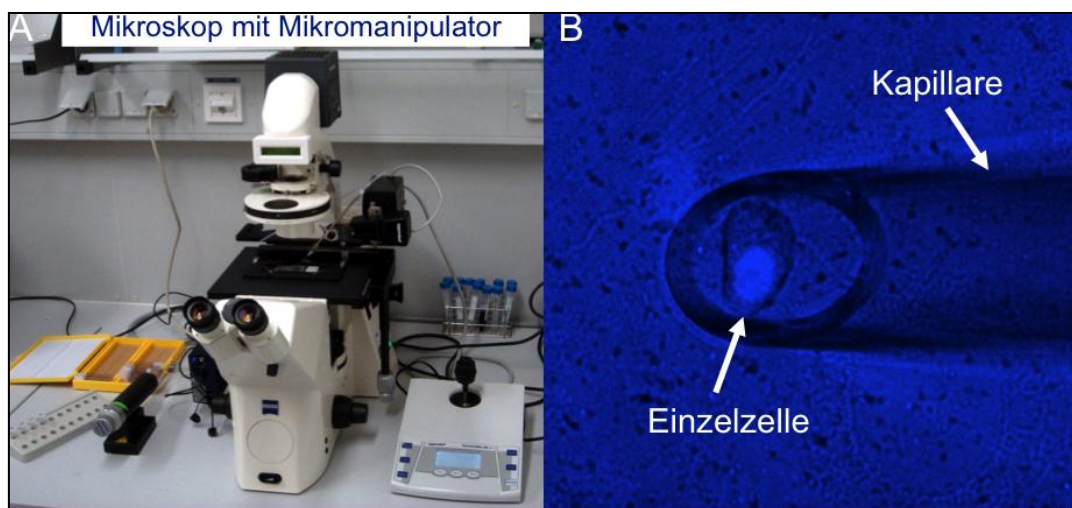


Abb. 2.1.: Isolation von Einzelzellen mittels Mikromanipulation. (A) Fluoreszenzmikroskop mit Mikro-manipulationseinheit. (B) Kapillare mit zu transferierender Einzelzelle im DAPI-Kanal.

Nach einer, dem Absetzen der Zellen dienenden, Inkubationszeit von mindestens 30 min bei RT wurden die Tumorzellen anhand ihrer charakteristischen Anfärbung (Keratin und DAPI positiv, CD45 negativ) am inversen Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 200* (Zeiss, Jena, D) identifiziert und einzelne Zellen direkt aus der Zellsuspension isoliert. Für die Aufnahme einzelner Zellen wurden speziell angefertigte Kapillaren (40 μ M, Kapillartyp III mit Anschliff) verwendet, die in den Mikromanipulator *CellTram*[®] *Vario* eingesetzt und mit der dazugehörigen Steuereinheit *TransferMan*[®] *NK2* (alles Eppendorf, Hamburg, D; Abb. 2.1.) navigiert wurden. Einzelne Zellen wurden schließlich in 2.5 μ L nukleasefreiem

H₂O (Qiagen, Hilden, D) im Deckel eines 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäßes abgelegt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Einzelzellen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2. Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA (*whole genome amplification; WGA*)

Um eine umfassende molekulare Analyse des Genoms einzelner Zellen zu ermöglichen, musste die sehr geringe DNA-Menge der Zelle von etwa 7 pg durch eine Amplifikationsreaktion vervielfältigt werden. Zu diesem Zweck wurde entweder das *GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oder das *GenomiPhi DNA Amplification Kit* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) eingesetzt.

2.2.3.2.1. WGA mit dem GenomePlex-Amplifikationskit

Bei der auf eine Linker-PCR basierende *GenomePlex*-WGA werden drei verschiedene Prozesse durchlaufen: die Zellyse und Fragmentierung der genomischen DNA, die Herstellung einer DNA-Fragment-Bibliothek durch die Anheftung universaler Primerbindungsstellen und schließlich die Amplifikation der fragmentierten DNA (Abb. 2.2.).

Die gesamte Aufarbeitung wurde auf Eis durchgeführt. Zu analysierende Einzelzellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit nukleasefreiem H₂O (Qiagen, Hilden, D) auf ein Endvolumen von 9 µL aufgefüllt. Die Zellyse und Genomfragmentierung erfolgte durch die Zugabe von 1 µL Reaktionsgemisch (32 µL 10 x Zellysis- und Fragmentierungspuffer + 2 µL Proteinase K; beides Kit-Komponenten) und einer anschließenden Inkubation bei 50 °C für 1 h. Nach einer 4-minütigen Enzyminaktivierung bei 99 °C wurde das Zelllysatsatz kurz abzentrifugiert, mit 2 µL 1 x *Single Cell Library Preparation* Puffer und 1 µL *Library Stabilization* Lösung (beides Kit-Komponenten) vermischt und für 2 min bei 95 °C inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert, mit 1 µL *Library Preparation Enzym* versetzt und wie folgt im Thermocycler inkubiert: 20 min bei 16 °C, 20 min bei 24 °C, 20 min bei 37 °C und 5 min bei 75 °C. Zu der, in diesem Schritt erzeugten und mit universellen Primerbindungsstellen versehenen DNA-Fragment-

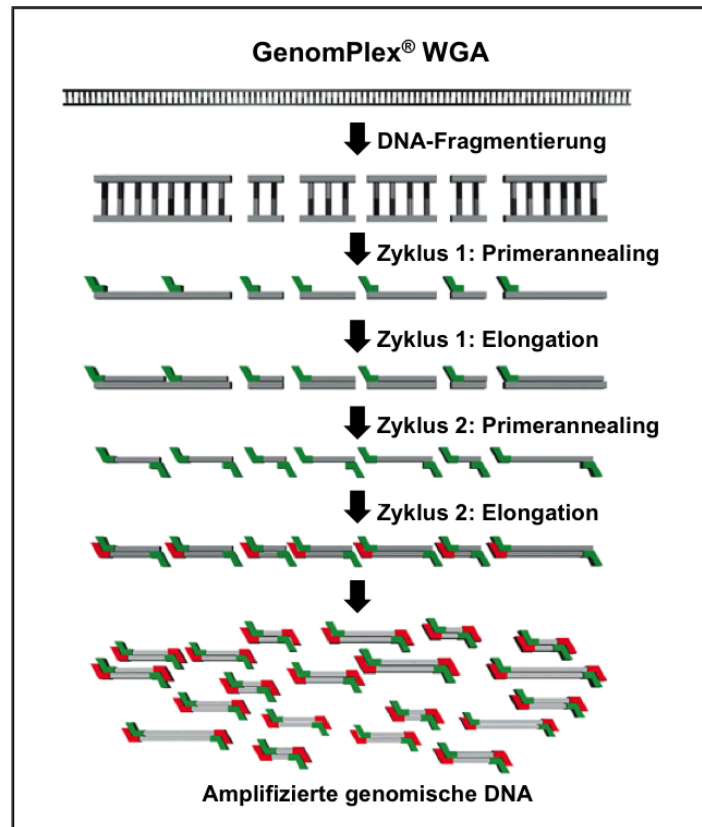


Abb. 2.2: Prinzip der Einzelzell-DNA-Amplifikation mittels *GenomePlex® WGA Kit*. Die genomische DNA wird fragmentiert, mit universellen Primerbindungsstellen verknüpft und schließlich unter Verwendung von Universalprimern vervielfältigt.

Bibliothek wurden 48.5 µL nukleasefreies H₂O, 7.5 µL 10 x *Amplification Master Mix* (inkl. dNTPs, Primer) und 5 µL WGA DNA Polymerase (alles Kit-Komponenten) hinzugegeben. Die abschließende Amplifikationsreaktion wurde im PCR-Cycler wie folgt durchgeführt: 3 min bei 95 °C, 25 Zyklen: 30 s bei 94 °C, 5 min bei 65 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden WGA-Produkte bei -20°C gelagert.

Während GenomePlex-WGA Produkte für die Analyse mittels Metaphasen-CGH (s. 2.2.4.9.1.) direkt eingesetzt wurden, erfolgte für sämtliche weiteren molekularen Untersuchungen eine Aufreinigung mit dem *GenElute PCR Clean-up Kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gemäß Herstellerprotokoll. Die DNA-Konzentration der amplifizierten Einzelzell-DNAs wurde mit Hilfe des *NanoDrop ND-1000* Spektrophotometers (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) vermessen.

2.2.3.2.2. WGA mit dem GenomiPhi-Amplifikationskit

Die Vervielfältigung von Einzelzell-DNA mit dem *GenomiPhi*-Kit beruht auf einer isothermalen Amplifikation durch die *phi26*-DNA-Polymerase, welche sich durch eine strangverdrängende Eigenschaft auszeichnet. Unter Verwendung von zufällig bindenden Oligohexameren findet folglich eine parallele Amplifikation verschiedener Regionen der unfragmentierten DNA-Stränge eiche statt (Abb. 2.3.).

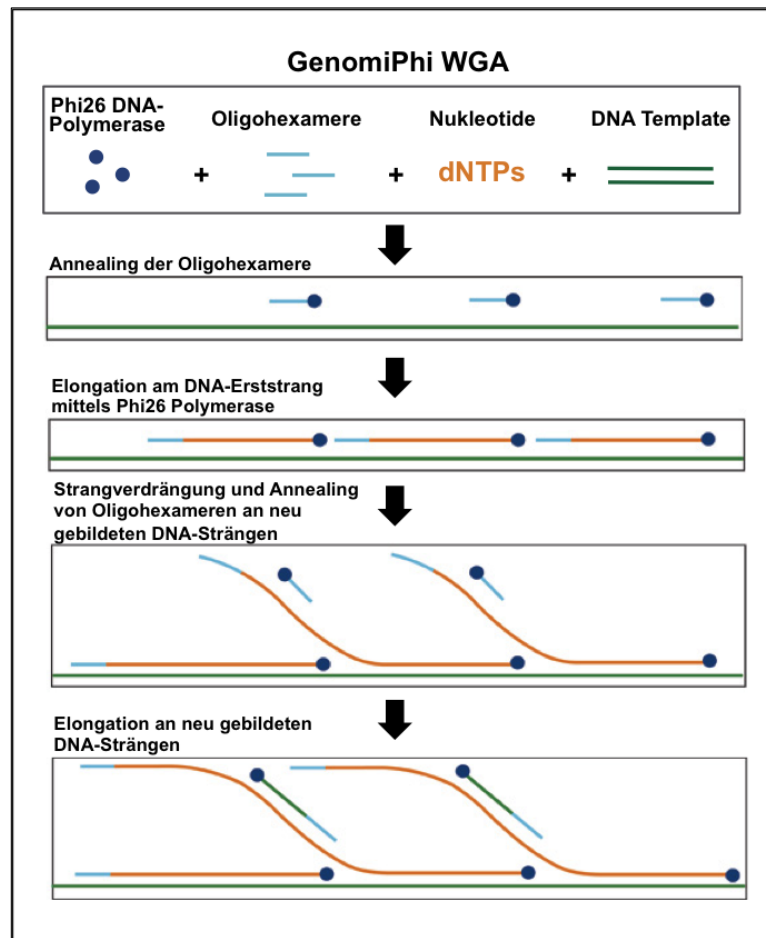


Abb. 2.3.: Prinzip der Einzelzell-DNA-Amplifikation mittels *GenomiPhi*-WGA Kit. Die genomische DNA wird unter Verwendung von zufällig bindenden Oligohexameren durch die strangverdrängende *Phi26* DNA-Polymerase vervielfältigt.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach dem Auftauen der zu analysierenden Einzelzellen auf Eis, wurden jeweils 10 µL *GenomiPhi*-Probenpuffer (Kit-Komponente) sowie 1 µL einer 107mAU/mL Protease-Lösung (Qiagen, Hilden, D) hinzugegeben. Zur proteolytischen Lyse der Zellen erfolgte zunächst eine Inkubation für

15 min bei 50 °C. Nach einer 15 minütigen Inaktivierung der Protease bei 70°C wurde die genomische DNA für 2 min bei 95 °C denaturiert und schließlich auf Eis abgekühlt.

Für die eigentliche Amplifikationsreaktion wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und 10 µL *GenomiPhi*-Reaktionsmix (9 µL *GenomiPhi*-Reaktionspuffer + 1 µL *GenomiPhi*-Enzym Mix) hinzupipettiert. Während der anschließenden Inkubation für 2.5 h bei 30 °C erfolgte die Vervielfältigung der DNA durch die phi26 DNA-Polymerase, welche durch ein finales Erhitzen auf 65 °C (10 min) inaktiviert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden amplifizierte Einzelzell-DNAs bei -20°C gelagert.

Für nachfolgende Analysen wurden *GenomiPhi*-WGA-Produkte mit *NucleoSeq*-Säulen (Macherey-Nagel, Düren, D) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Abweichend vom Protokoll wurde die Hydratisierung der Gelmatrix für mindestens 3 h durchgeführt und vor der Beladung der Säulen ein zusätzlicher Waschschrift mit 300 µL H₂O (Zentrifugation: 2 min bei 750 x g) eingefügt. Die aufgereinigten WGA-Produkte wurden durch Zugabe von 20 µL H₂O auf ein Endvolumen von 40 µL gebracht und die DNA-Konzentration mit dem *NanoDrop ND-1000* Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) quantifiziert.

2.2.4. Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung sämtlicher DNA/RNA-Lösungen wurde mit Hilfe des *NanoDrop ND-1000* Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Auf- und Weiterverarbeitung von RNA wurde ausschließlich RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden, D) eingesetzt. DNA wurde im Allgemeinen bei -20 °C, RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.4.1. DNA-Isolierung

2.2.4.1.1. DNA-Isolierung aus Zelllinienzellen

Für die Isolierung genomischer DNA aus Zelllinienzellen wurde das *QIAmp DNA Micro Kit* (Qiagen, Hilden, D) gemäß Herstellerangaben (*Tissue Protocol*) verwendet.

Nach zweimaligem Waschen der etwa 80% konfluenten Zellen mit PBS wurden diese mit Hilfe eines Zellschabers in 300 µL ATL Puffer (Kit-Komponente) von der Kulturflasche

gelöst und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte die Lyse der Zellen durch Proteinase K (Qiagen, s. Herstellerprotokoll) sowie die DNA-Isolierung gemäß Herstellerprotokoll. Die abschließende Elution der DNA wurde nach 5 minütiger Inkubation mit 2 x 30 µL H₂O durchgeführt.

2.2.4.1.2. DNA-Isolierung aus Leukozyten

Für die Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten wurde ebenfalls das *QIAmp DNA Micro Kit* (Qiagen, Hilden, D) entsprechend der Herstellerangaben (*Blood Spin Protocol*) eingesetzt.

Zur Anreicherung von Leukozyten aus dem Blut gesunder Probanden, wurde im Vorfeld eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurde die Blutprobe in einem Falcon-Reaktionsgefäß mit Lysispuffer (0.3 M Sucrose, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X 100) auf ein Endvolumen von 50 mL gebracht, 30 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C zentrifugiert (20 min, 3500 rpm). Nach einer Wiederholung dieses Vorgangs wurden die angereicherten Leukozyten in 200 µL PBS resuspendiert und durch Zugabe von 20 µL Proteinase K (Qiagen, Hilden) bei 56 °C über Nacht proteolytisch gespalten. Die weitere Aufarbeitung mit Hilfe des *QIAmp DNA Micro Kit* (Qiagen, Hilden, D) ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

2.2.4.2. RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinienzellen wurde das *RNeasy RNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, D) gemäß Herstellerangaben verwendet.

Nach zweimaligem Waschen der etwa 80% konfluenten Zellen mit PBS wurden diese mit Hilfe eines Zellschabers in 700 µL mit β-Mercaptoethanol versetztem RLT Puffer (Kit-Komponente) von der Kulturflasche gelöst und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension zum Aufschluss der Zellen auf eine *QIAshredder*-Säule (Qiagen) transferiert und 2 min bei 16400 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 Vol. 70% Ethanol zum Zelllysate erfolgte die weitere Aufarbeitung gemäß Herstellerprotokoll. Für die abschließende Elution der RNA wurden 2 x 25 µL nukleasefreies H₂O (Qiagen, Hilden, D) verwendet.

2.2.4.3. cDNA-Erststrangsynthese mittels reverser Transkription

Für die Überführung von Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das *First Strand cDNA Synthesis SuperScriptTM* Kit von Invitrogen (Karlsruhe, D) oder Fermentas (St. Leon-Roth, D) nach Herstellerangaben verwendet.

Pro Ansatz wurden je 1 µg RNA mit Hilfe von zufällig bindenden Primerhexameren (*random hexamer primers*) transkribiert.

2.2.4.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.4.4.1. Klassische PCR

Die *in vitro*-Vervielfältigung ausgewählter DNA-Bereiche wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Primer (s. Anhang III) durchgeführt. Für sämtliche PCR-Reaktionen wurde nukleasefreies H₂O (Qiagen, Hilden, D) sowie die *AmpliTaq Gold* DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit dem entsprechenden Puffersystem verwendet. Eingesetzte Desoxyribonukleotide (dNTPs) wurden von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) bezogen.

Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes ist in Tab. 2.7., das verwendete Standard-PCR-Programm in Tab. 2.8. aufgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.4.6.) analysiert.

Tab. 2.7.: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.

Komponente	Konzentration	Einsatzvolumen
PCR-Puffer	10 x	2 µL
MgCl ₂	25 mM	1.6 µL
dNTP	10 mM	1.3 µL
DMSO	100 %	0.6 µL
Primer <i>forward</i>	10 µM	0.6 µL
Primer <i>reverse</i>	10 µM	0.6 µL
DNA/WGA Produkt	5 ng/µL	4 µL
DNA-Polymerase	5 U/µL	0.2 µL
H ₂ O	-	9.1 µL
Endvolumen		20 µL

Tab. 2.8.: Standard-PCR-Programm.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale	95	7:00	
Denaturierung	95	0:30	} x 35 Zyklen
Annealing	54-60 (primerspezifisch)	0:30	
Elongation	72	0:45	
Finale Elongation	72	7:00	
Kühlung	8	∞	

2.2.4.4.2. Multiplex-PCR

Zur Qualitätsabschätzung von WGA-Produkten (s. 2.2.3.2.) wurden zwei verschiedene Multiplex-PCR unter Verwendung von aus jeweils 4 Primerpaaren bestehenden Primergemischen durchgeführt. Die Primer des 1CHR-Primermix (s. Anhang III) binden in verschiedenen Regionen des GAPDH-Gens, für das bisher keine genetische Veränderung im Zuge von Tumorerkrankungen beschrieben wurde und welches daher häufig als Referenz- oder *Housekeeping*-Gen Verwendung findet. Die Primerbindungsstellen des 4CHR-Gemisches (s. Anhang III) dagegen sind über 4 verschiedene, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten Genregionen (EGFR-Gen: Chr 7, AURKA-Gen: Chr 20, LGR5-Gen: Chr12, HER2-Gen: Chr17) im Genom verteilt.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das PCR-Programm sind Tab. 2.9. und 2.10. zu entnehmen. Der Erfolg der Multiplex-PCR wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.4.6.) überprüft.

Tab. 2.9.: Zusammensetzung eines Multiplex-PCR-Ansatzes.

Komponente	Konzentration	Einsatzvolumen
PCR-Puffer	10 x	1.2 µL
MgCl ₂	25 mM	1 µL
dNTP	10 mM	1 µL
DMSO	100 %	0.5 µL
Primergemisch	10 µM	1 µL
DNA/WGA Produkt	5 ng/µL	4 µL
DNA-Polymerase	5 U/µL	0.2 µL
H ₂ O	-	3.1 µL
Endvolumen		12 µL

Tab. 2.10.: Multiplex-PCR-Programm.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	10:00
Denaturierung	95	1:00
Annealing	56	1:00
Elongation	72	1:30
Finale Elongation	72	5:00
Kühlung	8	∞

} x 35 Zyklen

2.2.4.5. Quantitative real time PCR (qPCR)

Im Gegensatz zur klassischen PCR kann mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR (qPCR) die Beobachtung der Amplifikatbildung im Laufe der PCR-Reaktion sowie die Quantifizierung des eingesetzten DNA-Templates erfolgen [111, 112]. Dies wird durch den Zusatz des Cyanfarbstoffes *SYBR green* ermöglicht, dessen Fluoreszenz durch die Bindung an doppelsträngige DNA messbar zunimmt (Abb. 2.4.). Die Intensität der Fluoreszenz, die jeweils am Ende eines jeden PCR-Zyklus durch den *real time* PCR-Cycler gemessen wird, verhält sich hierbei proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produkts.

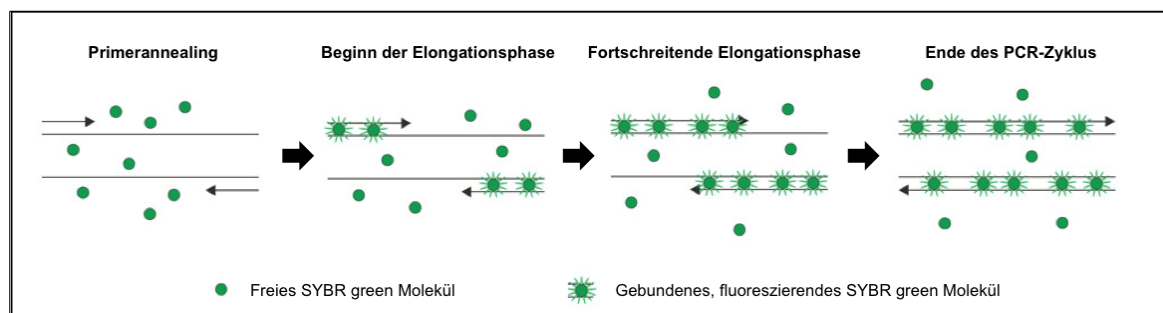


Abb. 2.4.: Anlagerung von *SYBR green* an doppelsträngige DNA während der DNA-Elongation.

Die Grundlage zur Quantifizierung der Ausgangs-DNA bilden die durch den PCR-Cycler gemessenen CT-Werte. Der CT-Wert gibt den PCR-Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmalig deutlich den messbaren Fluoreszenzhintergrund übersteigt und sich die PCR-Reaktion in ihrer exponentiellen, d.h. optimal verlaufenden Amplifikationsphase befindet (Abb. 2.5.A). Je mehr DNA-Startmaterial im Ausgangs-Ansatz vorhanden ist, desto früher wird ausreichend Amplifikat gebildet um diesen Schwellenwert zu

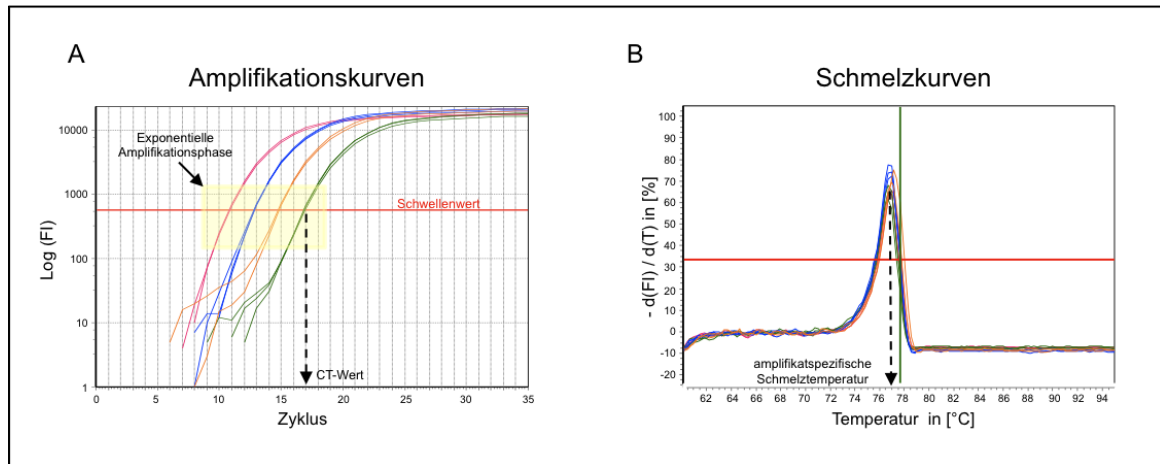


Abb. 2.5.: Amplifikations- und Schmelzkurven einer *real time* PCR. Die Amplifikationskurven (A) ergeben sich aus der logarithmierten Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität (FI) gegen die Zykluszahl. Aus dem, in der exponentiellen Amplifikationsphase (gelbe Box) liegenden, Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert ergibt sich der CT-Wert. Die Schmelzkurvenanalyse (B) dient der Überprüfung des gebildeten PCR-Produktes.

erreichen und desto kleiner ist der CT-Wert. Da der *SYBR green*-Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch in jedes doppelsträngige DNA-Molekül interkaliert, wird im Anschluss an die PCR-Reaktion zur Überprüfung des entstandenen PCR-Produkts eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Länge und Nukleotidzusammensetzung verschiedener PCR-Produkte weist jedes Amplifikat eine spezifische Schmelztemperatur auf. Eine graduelle Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 95°C führt bei Erreichen dieser Schmelztemperatur folglich zur DNA-Denaturierung, der Freisetzung des *SYBR greens* und einem damit verbundenen plötzlichen Abfall der Fluoreszenzintensität, welche durch den PCR-Cycler detektiert wird (Abb. 2.5.B).

Für sämtliche qPCR-Experimente wurde der *Maxima™ SYBR Green/ROX* qPCR Master Mix von Fermentas (St. Leon-Roth, D) wie in Tab. 2.11. dargestellt eingesetzt. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die Reaktion wurde im *Mastercycler S Realplex* (Eppendorf, Hamburg, D) durchgeführt. Das Standard-qPCR-Programm ist in Abb. 2.6. dargestellt.

Tab. 2.11.: Zusammensetzung eines Standard-qPCR-Ansatzes

Komponente	Konzentration	Einsatzvolumen
SYBR green Mix (Polymerase, dNTPs, Puffer)	2 x	7.5 µL
Pimer forward	10 µM	0.4 µL
Primer reverse	10 µM	0.4 µL
cDNA/DNA/WGA-Produkt	5ng/µL	2 µL
H ₂ O	-	4.7 µL
Endvolumen		15 µL

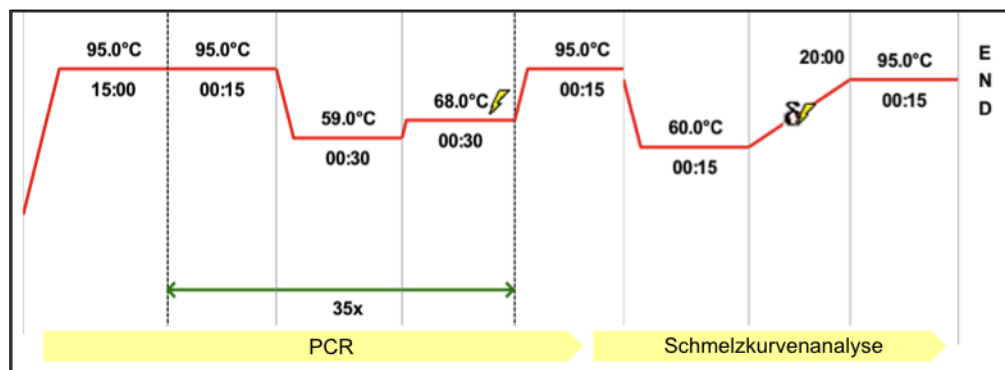


Abb. 2.6.: Standard-qPCR-Programm mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

2.2.4.5.1. Genexpressionsanalysen mittels qPCR

Bei der Genexpressionsanalyse mittels qPCR erfolgt die Quantifizierung der zu untersuchenden, zielgenpezifischen cDNA (s. 2.2.4.3.) relativ zu einem, in allen Geweben gleichermaßen exprimierten Referenzgen (*housekeeping gene*).

Da ein effizienter Ablauf der Reaktion sowohl mit den Zielgen- als auch dem Referenzgenprimern eine Grundvoraussetzung für die relative Quantifizierung ist, wurden im Vorfeld die Reaktionseffizienzen für sämtliche Primerpaare mit Hilfe einer Standardreihe ermittelt. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen in cDNA konvertierter *Universal Human Reference RNA* (Stratagene, Edinburgh, UK) im *real time* PCR-Cycler vermessen und die logarithmierten Ausgangskonzentrationen (y-Achse) gegen die ermittelten CT-Werte (x-Achse) graphisch aufgetragen. Mit Hilfe der Steigung der resultierenden Standardgeraden wurde die prozentuale Reaktionseffizienz (E) wie folgt berechnet:

$$E = (10^{-\text{Steigung}} - 1) \cdot 100$$

Zur Analyse von Probenmaterial wurden ausschließlich Assays/Primerpaare mit einer Effizienz von mindestens 95% verwendet.

Zur Bestimmung von Expressionsunterschieden zwischen der untersuchten Probe und dem Standardmaterial (*Universal Human Reference RNA*, Stratagene) wurde die sogenannte $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode für die Auswertung herangezogen. Hierzu wurden zunächst die CT-Werte des Zielgens mit der des Referenzgens normalisiert:

$$\Delta\text{CT}_{\text{Probe}} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\text{CT}_{\text{Standardmaterial}} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$$

Unter Verwendung der ΔCT -Werte konnte schließlich über die Berechnung von $\Delta\Delta\text{CT}$, der relative Expressionsunterschied (*fold increase*) des Zielgens in der Probe gegenüber dem Standardmaterial ermittelt werden:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Probe}} - \Delta\text{CT}_{\text{Standardmaterial}}$$

$$\text{Fold increase} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

2.2.4.5.2. Identifikation von Genamplifikationen mittels qPCR

Für die Berechnung der Amplifikationsrate spezifischer Genbereiche wurde zunächst die Ausgangs-DNA-Menge des zu untersuchenden Zielgens und eines Referenzgens, welches im diploiden Chromosomensatz in einer gleichbleibenden Zahl vorliegt bestimmt. Hierzu wurden mit den Zielgen- und den Referenzprimern die CT-Werte für verschiedene Mengen Leukozyten-DNA gesunder Probanden ermittelt. Hieraus wurde jeweils eine Standardgerade für das Ziel- und das Referenzgen erstellt. Anhand der Geradengleichung wurde die Ausgangsmenge des Zielgens und des Referenzgens im Reaktionsansatz berechnet. Die Amplifikationsrate des Zielgens im untersuchten Probenmaterial ergab sich schließlich wie folgt:

$$\text{Amplifikationsrate}_{\text{Zielgen}} = \text{DNA-Menge}_{\text{Zielgen}} / \text{DNA-Menge}_{\text{Referenzgen}}$$

Proben für die mit dieser Berechnungsgrundlage lediglich eine Ausgangsmenge der Ziel- oder Referenzregion von unter 250 pg ermittelt werden konnte, wurden aufgrund der sehr geringen DNA-Menge von der Auswertung ausgeschlossen. Basierend auf die qPCR-Analyse von nicht-amplifizierten Zelllinienzellen (s. 3.2.1.2.) wurden untersuchte Proben mit einer Amplifikationsrate von mindestens 1.5 als amplifiziert bezüglich des untersuchten Genlokus klassifiziert.

2.2.4.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von DNA-Molekülen für analytische und präparative Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung von Agarose-TAE-Gelen (1,5% Agarose in 1 x TAE Puffer s. 2.1.10.). Zum Zweck der späteren Visualisierung von DNA-Molekülen unter UV-Licht wurde den Gelen in DNA interkalierendes Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 200 ng/mL zugesetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1/6 Vol. 6 x Ladepuffer (s. 2.1.10.) vermischt, auf das Gel transferiert und in horizontalen Gelkammern (*ComPhor L Min/Midi*, Bioplastics, Landgraaf, NL) in 1 x TAE-Puffer bei 60-120 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die abschließende Auswertung und Dokumentation der Elektrophoreseresultate wurde mit Hilfe eines an eine digitale Videoanlage (Geldokumentationsanlage *Gene Genius 2*, Syngene, Cambridge, UK) gekoppelten Transilluminators durchgeführt.

2.2.4.7. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Isolation von DNA-Amplifikaten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des *peqGOLD Gel Extraction Kit* (PEQLAB, Erlangen, D) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Für die DNA-Elution von der Silikamembran der Säule wurden nach einer 5-minütigen Inkubation jeweils 30 µL H₂O verwendet.

2.2.4.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde basierend auf dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruchmethode [113] unter Verwendung des *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Für jede Sequenzierung wurden je 50ng pro 1000 bp Länge des zu analysierenden DNA-Fragments eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tab. 2.12. zu entnehmen.

Tab. 2.12.: Zusammensetzung eines Sequenzierungs-PCR-Ansatzes.

Komponente	Konzentration	Einsatzvolumen
DNA-Template	x	(50 ng/1000 bp) x µL
5 x Sequenzierungspuffer	5 x	3 µL
Primer	10 µM	1 µL
<i>BigDye</i> -Mix (Polymerase, dNTPs, ddNTPs, Puffer)	2.5 x	2 µL
H ₂ O	-	ad 20 µL

Die Sequenzierungsreaktion wurde wie in Tab. 2.13. dargestellt im Thermocycler durchgeführt.

Tab. 2.12.: PCR-Programm für die Sequenzierungsreaktion.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	96	4	
Denaturierung	96	0:30	} x 25 Zyklen
Annealing	54	0:30	
Elongation	60	4:00	
Kühlung	8	∞	

Die anschließende Aufreinigung des Reaktionsprodukts erfolgte durch eine Ethanol-Fällung. Hierzu wurde jeder Ansatz mit je 1/10 Vol. (2µL) 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. (50 µL) 100% Ethanol versetzt und die DNA 1 h bei -20 °C oder alternativ bei 4°C über Nacht gefällt. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation (20 min, 16000 rpm, 4°C) pelletiert, das Pellet mit je 50 µL 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 16000 rpm, 4 °C), 15 min bei 37 °C getrocknet und schließlich in 20 µL *Hi-Di* Formamid (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) aufgenommen. Die kapillarelektrophoretische

Auftrennung der *BigDye*-markierten DNA-Fragmente wurde mit dem *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* durchgeführt. Die Sequenzauswertung erfolgte mit der *Sequence Analysis Software V3.07* (Applied Biosystems) und *FinchTV V1.4* (s. 2.1.7.).

2.2.4.9. Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH, *Comparative Genomic Hybridization*) ist eine molekular-zytogenetische Methode zur Identifikation von Zugewinnen und Verlusten bestimmter DNA-Regionen im Gesamtgenom [114]. Hierzu werden die zu analysierende DNA (z.B. Tumor-DNA, CTC-WGA-Produkt) und die aus einem gesunden Probanden stammende Referenz-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in gleichen Anteilen miteinander vermischt. Durch die Zugabe eines Überschusses unmarkierter humaner COT-1 DNA, welche an repetitive Sequenzen bindet wird die Detektion von unregelmäßigen Wiederholungen repetitiver DNA-Regionen unterdrückt. Die anschließende Hybridisierung des Gemischs kann sowohl auf gesunden Metaphasechromosomen (Metaphase-CGH) als auch auf immobilisierten DNA-Fragmenten (Array-CGH) erfolgen (Abb. 2.7.). Die Verwendung quantitativer digitaler Bildgebungsverfahren ermöglicht schließlich den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Proben- und Referenz-DNA. In der Test-DNA im Überschuss vorhandene DNA-Regionen werden hierbei durch eine gegenüber der Referenz-Fluoreszenz erhöhte Proben-Fluoreszenz, unterrepräsentierte Regionen durch eine gegenüber der Test-Fluoreszenz erhöhte Referenz-Fluoreszenz detektiert.

Während die Metaphasen-CGH aufgrund ihres geringen Auflösungsvermögen von etwa 2Mb für DNA-Zugewinne und 10 Mb für DNA-Verluste lediglich einen Überblick über vorhandene genomische Imbalancen gibt, ist mit Hilfe hochauflösender Array-CGH-Methoden die Detektion aberranter DNA-Regionen mit einer Größe von $\geq 2\text{kb}$ möglich.

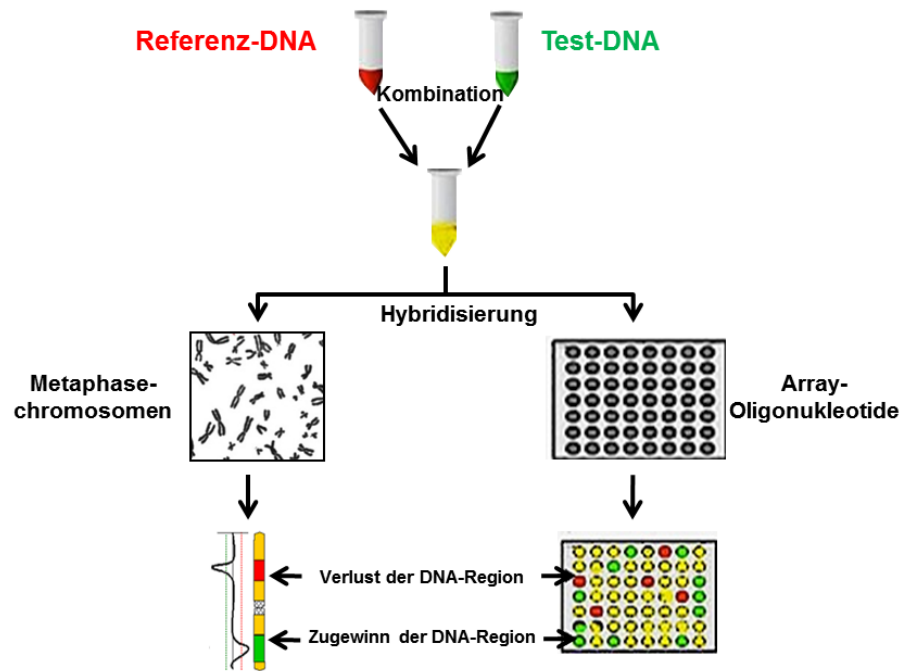


Abb. 2.7.: Prinzip der CGH (*Comparative Genomic Hybridization*). Die Referenz- und Test-DNA werden mit grünem bzw. rotem Fluoreszenzfarbstoff markiert, vermischt und auf Metaphasen (klassische CGH, links) oder Arrays (Oligonukleotide, BAC-Klone, cDNA, rechts) hybridisiert. Amplifizierte DNA-Regionen werden als grüne, deletierte als rote Bereiche visualisiert.

2.2.4.9.1. Metaphasechromosomen-CGH (mCGH)

Die Analyse von genomischer DNA oder WGA-Produkten mittels Metaphasechromosomen-CGH wurde am Institut für Humangenetik des Helmholtz-Zentrums in München wie durch LANGER *et al.* [107] beschrieben durchgeführt. Als Referenzmaterial wurde männliche, humane Referenz-DNA der Firma Promega (Madison, WI, USA) verwendet.

Für die CGH Analyse wurden je 19 µL genomische DNA (s. 2.2.4.1) oder mit dem *GenomePlex*-WGA Kit amplifizierte Einzelzell-DNA (s. 2.2.3.2.) eingesetzt.

2.2.4.9.2. Array-CGH (aCGH)

Die Durchführung von aCGHs erfolgte am Institut für Humangenetik der medizinischen Universität in Graz. Während *GenomePlex*-WGA-Produkte direkt für die Markierungsreaktion mit dem *BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System* (Invitrogen, Karlsruhe, D) eingesetzt wurden, wurden die hochmolekularen *GenomiPhi*-WGA-Produkte zunächst durch eine 2stündige Restriktion mit den Enzymen *Alu I* und *Rsa I* (Kit-Komponenten) nach Herstellerangaben vorbehandelt. Die Hybridisierung von

jeweils 500 µg Test- und Referenz-DNA erfolgte auf die Microarray Plattform des *Human genome CGH 60K microarray kit* der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) nach Herstellerprotokoll (Version 6.0). Als Referenzmaterial wurde männliche, humane Referenz-DNA der Firma Promega (Madison, WI, USA) verwendet. Die abschließende Analyse des Arrays wurde nach GEIGL *et al.* [116] mit der *Feature Extraction software 10.5.1.1.* (Agilent Technologies) durchgeführt.

2.2.5. Methoden zur Proteinanalyse

2.2.5.1. Herstellung von Harnstoff-Zelllysaten

Zum Aufschluss von etwa 80% konfluenten Zelllinienzellen mittels Harnstoff (*Urea*) wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS, mit 1 mL PBS versetzt und mittels eines Zellschabers von der Kulturflasche abgelöst. Nach dem Transfer der Zellsuspension in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation: 3 min, 1200 rpm), in 350 µL kaltem Urea-Lysispuffer (9.8 M Harnstoff, 30 mM Tris, 15 mM EDTA, 1% SDS) resuspendiert und dreimal 10 s bei einer Amplitude von 100% mit dem Ultraschallprozessor (Fa. Dr. Hirschler, Bonn, D) sonifiziert. Der Ansatz wurde anschließend 1 h bei RT geschüttelt und unlösliche Zellbestandteile durch 5-minütige Zentrifugation bei 10000 x g abgetrennt. Das den Überstand bildende Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß aliquotiert und der Proteingehalt mit Hilfe der BCA-Methode (s. 2.2.5.2.) bestimmt. Die Lagerung von *Urea*-Zelllysaten erfolgte bei -80 °C.

2.2.5.2. BCA-Proteinbestimmung

Für die BCA-Proteinbestimmung in *Urea*-Zelllysaten (s. 2.2.5.1.) wurde das *BCATM Protein Assay Kit* der Firma Thermo Scientific (Wilmington, DE, USA) eingesetzt. Zunächst wurde eine Standardgerade unter Verwendung verschiedener BSA-Konzentrationen (5-25 µg) erstellt. Definierte Volumina einer BSA-Stammlösung (10 mg/mL in H₂O) wurden mit H₂O auf ein Volumen von 25 µL gebracht und mit jeweils 500 µL des BCA-Farbreagens (1:50 Gemisch der Kit-Komponenten Lösung I und Lösung II) versetzt. Nach einer Inkubation für 2 min bei 65 °C und 1 min bei -20°C wurde der Ansatz bei einer Wellenlänge von 562 nm im Photometer (Eppendorf, Hamburg, D) gegen den Leerwert (25 µL H₂O + 500 µL BCA-Reagenz) vermessen. Die Erstellung der Standardgerade erfolgte durch die

graphische Auftragung der Proteinkonzentration (x-Achse) gegen die gemessene Extinktion (y-Achse).

Um die Proteinkonzentration von Zelllysaten zu bestimmen wurde die Extinktion einer 1:10 Verdünnung der Probe im Duplikat wie beschrieben im Photometer bestimmt. Basierend auf den ermittelten Extinktionswert wurde unter Verwendung der Standardgeradengleichung die Proteinkonzentration des Lysats ermittelt.

2.2.5.3. SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI [117].

Zunächst wurde das aus einem Trenngel (6-15% Acrylamid, 380 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1 SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED) und einem darüber geschichteten Sammelgel (5% Acrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED) bestehende Polyacrylamid-Gel in einem *Hoefer Dual Gel Caster* Gießstand (Amersham Biosciences, Freiburg, D) hergestellt. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels variierte hierbei je nach Größe des nachzuweisenden Proteins zwischen 6-15%.

Zum Transfer der Proteinproben auf das polymerisierte Gel wurden im Vorfeld je 10-30 µg des aufzutrennenden Zelllysats mit 2 x Laemmli-Ladepuffer (2% SDS, 20% Glycerol, 120 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.01% Bromphenolblau) sowie 1 µL β-Mercaptoethanol versetzt und das Gemisch (EV = 15 µL) 5 min bei 90 °C denaturiert. Dieser Vorgang bewirkt die gleichmäßige Anlagerung von negativ geladenen SDS-Molekülen an sämtliche im Zelllysats befindlichen Proteine, wodurch eine ladungsunabhängige Auftrennung der Protein nach ihrer Größe ermöglicht wird. Die vorbehandelten Proteingemische wurden schließlich vollständig auf das SDS-Gel überführt und bei 25 mA in einer *Hoefer Mini-Gelkammer Model SE250* (Amersham Biosciences) in Laemmli-Laufpuffer (192 mM Glycin, 0.1% SDS, 25 mM Tris/HCl) gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte durch eine anschließende Westernblot-Analyse (s. 2.2.5.4.).

2.2.5.4. Westernblot-Analyse

Zur Detektion spezifischer Proteine in einem gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteingemisch wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt.

Es erfolgte der Elektrotransfer der Proteine aus dem SDS-Gel (s. 2.2.5.4) auf eine *Hybond ECL Nitrocellulose Membran* (Amersham Biosciences, Freiburg, D) durch das Semi-Dry-Blot-Verfahrens mit der *Trans-Blot SD semi-dry* Blotapparatur (BioRad, München, D). Zum Aufbau des Blots auf der Anode der Apparatur wurden zwei in Transfer-Puffer getränkte *Whatman*[®]-Zuschnitte (VWR, Darmstadt, D), die vorbehandelte Membran, das SDS-Gel und wieder zwei feuchte *Whatman*[®]-Filterpapiere passgenau übereinander platziert. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte durch Elektroblob bei 0.8 mA/cm² für 2 h.

Nach dem Blotabbau wurde die Membran zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen zunächst für mindesten 1 h in Blockingreagenz (4% Milchpuffer in 1 x TPBS; s. 2.1.10.) geschwenkt. Anschließend erfolgte die Zugabe des in 4 mL Blockingreagenz verdünnten Primärantikörpers gegen das zu analysierende Protein und eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Es folgten 6 Waschschrte mit 1 x TPBS sowie die gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörperreaktion für 1-2 h bei RT. Nach sorgfältigem Waschen (6 x 5 min mit TPBS) der Membran wurden die mit Meerettichperoxidase markierten Sekundärantikörper durch eine Peroxidase-Substrat-Reaktion visualisiert. Hierzu wurde die Membran 5 min in frisch, aus ECL-Lösung 1 (0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 25 mM Luminol, 9 mM p-Cumarin) und ECL-Lösung 2 (0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.018% H₂O₂) hergestellter ECL-Lösung (*Enhanced Chemiluminescence*) inkubiert und die entstehenden Chemilumineszenzsignale durch eine 10sekündige bis 15minütige Exposition auf einen Röntgenfilm (Fuji, Tokyo, J) exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte im Filmentwickler *Hyperprocessor* der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, D).

2.2.6. Immunzytochemische Analysen (ICC)

2.2.6.1. Herstellung von Zytospins

Zur späteren Verwendung von Zelllinienzellen für immunzytochemische Analysen (s. 2.2.6.2.) wurden sogenannte Zytospins der entsprechenden Tumorzellen hergestellt. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor (s. 2.1.1.) beschrieben trypsinisiert, pelletiert. Nach einer Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauerzählkammer wurden etwa 90000-150000 Zellen mit Hilfe einer Zytospinzentrifuge (Rotofix 32, Hettich, Tutlingen, D; 3 min bei 160 x g) auf jeweils einen Objektträger gebracht. Die Zytospinpräparate wurde über Nacht bei RT getrocknet und schließlich bei -80°C gelagert.

2.2.6.2. Immunzytochemische Färbung von Zytospin-Präparaten (s. 2.2.6.1)

2.2.6.2.1. Immunfluoreszenz (ALDH1 und EpCAM)

Für die Fluoreszenzfärbung von Zytospin-Präparaten wurden die Zellen zunächst fixiert. Dies erfolgte für den Nachweis des Antigens EpCAM für 10 min der EPIMET-Fixierungslösung B (Micromet AG, München, D) für den ALDH1-Nachweis für 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS. Anschließend erfolgte ein 5minütiger Permeabilisierungsschritt mit 1% Triton-X in PBS. Der Zytospin wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem murinen anti-ALDH1- bzw. EpCAM-Primärantikörper (s. 2.1.5.) in Antikörperversdünnungspuffer (Dako, Glostrup, DK) inkubiert. Es folgten drei 5minütige Waschriffe, die Zugabe des anti-Maus-Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 488; s. 2.1.5.) sowie eine 1stündige Inkubation im Dunkeln. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) wurden die gefärbten Zellen zur Visualisierung der Zellkerne mit dem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthaltenen Einschlussmedium *Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

2.2.6.2.2. APAAP-Immunzytochemie (CK19, E-Cadherin, CD133)

Für die Färbung von Zelllinienzellen mit dem aus dem Kaninchen stammenden anti-CD133-Antikörper wurde ein direkt mit alkalischer Phosphatase markierter Sekundärantikörper eingesetzt. Für den Nachweis der murinen anti-E-Cadherin- und CK18-Antikörper wurde zunächst ein als Brückenantikörper fungierender unmarkierter anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Dieser bindet neben dem Primärantikörper, den

anschließend hinzugefügten murinen APAAP-Immunkomplex, welcher aus intestinaler Phosphatase und einem monoklonalen anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper besteht und der Signalverstärkung dient. Eine Übersicht der einzelnen Schritte der unterschiedlichen Färbeprotokolle für CD133, E-Cadherin und CK18 ist in Tab. 2.14 gegeben.

Tab. 2.14.: Protokolle zum immunzytochemischen Nachweis von CD133, E-Cadherin und CK18.

Aufarbeitungsschritt	CD133	E-Cadherin	CK18
Fixierung	10 min Fixierungslösung B	10 min Fixierungslösung B	10 min Fixierungslösung B
Permeabilisierung	-	-	5 min in 1% Triton-X/PBS
Waschen in PBS	3 x 3 min	1 x 3 min	1 x 3min
Primärantikörper	45 min Anti-CD133 aus dem Kaninchen	45 min Anti-E-Cadherin aus der Maus	45 min Anti-CK18 aus der Maus
Waschen in PBS	3 x 3 min	3 x 3 min	3 x 3 min
Sekundärantikörper	Anti-Kaninchen IgG mit AP markiert	Anti-Maus IgG unmarkiert	Anti-Maus IgG unmarkiert
Waschen in PBS	3 x 3 min	3 x 3 min	3 x 3 min
APAAP-Komplex	-	30 min	30 min
Waschen in PBS	-	3 x 3 min	3 x 3 min
Substratzugabe (Neufuchsin)	20 min	20 min	20 min
Waschen in PBS	3 x 3 min	3 x 3 min	3 x 3 min
Kernfärbung	20 s Hämalan	20 s Hämalan	20 s Hämalan
Waschen in Aqua dest.	1 min	1 min	1 min
Eindeckeln	Glycergel Mounting Medium	Glycergel Mounting Medium	Glycergel Mounting Medium

Für die Fixierung wurde EPIMET-Fixierungslösung B der Firma Micromet AG (München, D) eingesetzt. Die Primärantikörper wurden in Verdünnungspuffer *Dako REAL (Cat#S2022)*, die Sekundärantikörper und der APAAP-Komplex in einem *Dako-Puffer* zur Reduzierung von Hintergrundsignalen (*Cat#S3022*) verdünnt. Das Einschlussmedium Glycergel Mounting Medium wurde ebenso von der Firma *Dako (Glostrup,DK)* bezogen. Die Visualisierung erfolgte durch Zugabe der frisch angesetzten Substratlösung Neufuchsin (1M Tris pH 9.5, 0.56M NaNO₂, 0.625 Levamisol, 5% Neufuchsin). Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde Meyers Hämalan-Lösung verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. CTC-Detektion aus dem Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Hilfe des *CellSearch*-Systems

Für die CTC-Detektion wurden je 7.5 mL Blut von insgesamt 123 Patienten mit kolorektalem Karzinom aus vier verschiedenen Kollektiven (A-D, s. 2.1.9.) eingesetzt. Zunächst wurden 47 Patienten des Kollektivs A mit unterschiedlichen TNM-Stadien (Tumor-, Lymphknoten- und Metastasierungsstatus, Tab. 2.5.) mit Hilfe des *CellSearch*-Systems auf CTCs analysiert. Die CTC-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Tumorstadium sowie vom Lymphknoten- und Metastasierungsstatus sind in Abb. 3.1. dargestellt.

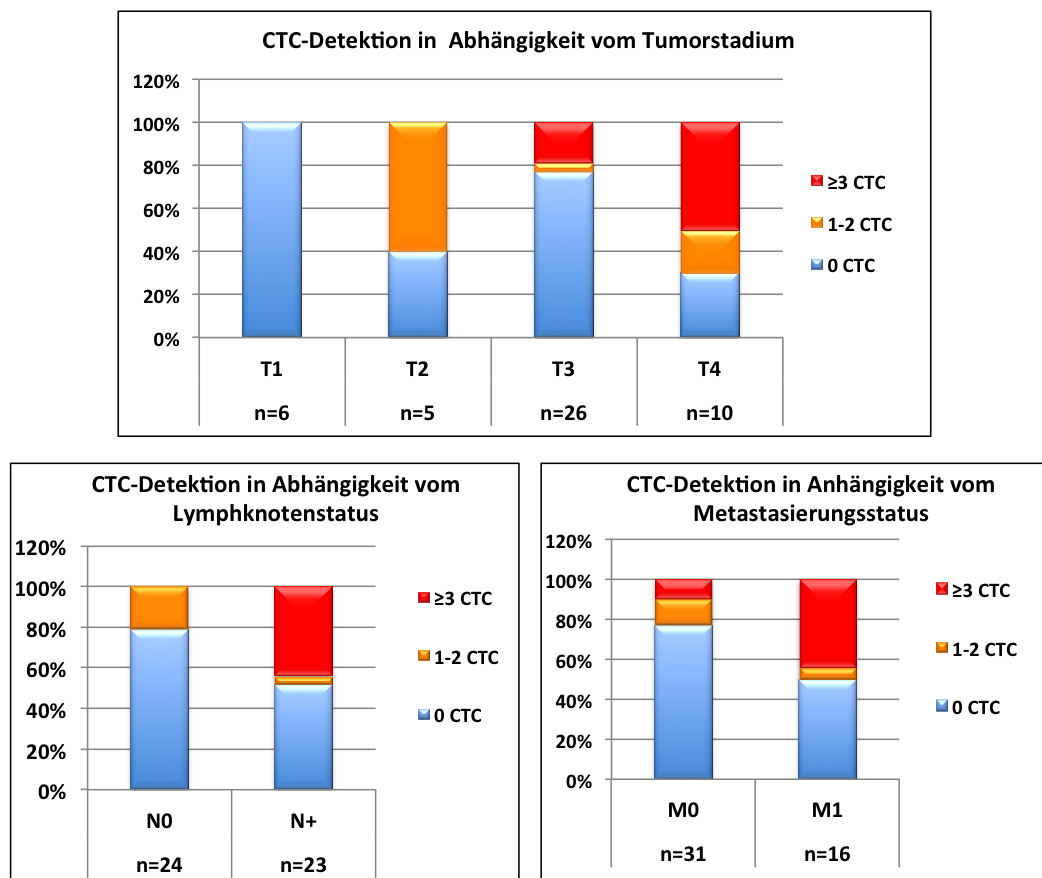


Abb. 3.1.: Detektion von CTCs aus Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom mittels *CellSearch* in Abhängigkeit vom Tumor, -Lymphknoten- und Metastasierungsstatus. n = Anzahl analysierter Patienten; T1-T4: Tumorstadium; N0: keine sichtbaren/detektierbaren Lymphknotenmetastasen; N+: Lymphknotenmetastase/n nachweisbar; M0: keine sichtbaren/detektierbaren Fernmetastasen; M1: Fernmetastase/n oder Lokalrezidiv.

Da in einer Studie durch COHEN *et al.* [67] gezeigt werden konnte, dass die Präsenz von mindestens 3 CTCs in einem Blutvolumen von 7.5 mL mit einer schlechten Prognose in metastasierten Patienten verbunden ist, wurde bei den CTC-positiven Patienten zwischen dem Nachweis von 1-2 und mindestens 3 CTCs unterschieden.

Eine generelle Assoziation zwischen dem Vorliegen von CTCs und dem Tumorstadium konnte nicht festgestellt werden. Erhöhte CTC-Zahlen von mindestens 3 CTCs konnten jedoch ausschließlich in den weiter fortgeschrittenen Tumorstadien T3 (19%) und T4 (50%) detektiert werden.

Das Vorhandensein von Lymphknoten- und von Fernmetastasen/Lokalrezidiv war mit einem signifikanten Anstieg sowohl der CTC-Positivität als auch der Anzahl detektierter CTCs gegenüber metastasefreien-Patienten zu verzeichnen. In 23% bzw. 21% der Lymphknoten-negativen bzw. Fernmetastasen-freien Patienten wurde mindestens eine CTC nachgewiesen. Patienten mit Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen zeigten mit 50 % bzw. 48% eine höhere CTC-Detektionsrate. Die Anzahl der detektierten Tumorzellen in diesem Patientenkollektiv variierte zwischen 1 und 34 CTC (Mittelwert: 6.2, Median: 4) pro 7.5 mL Blut.

Da nur 6/47 (13%) Patienten mehr als 5 CTCs/7.5 mL Blut aufwiesen (s. 2.2.3.1.) und keine CTCs zur nachfolgenden Analyse isoliert werden konnten, wurden Blutproben dreier weiterer Kollektive (B-D, s. 2.1.9.) von Patienten mit bereits fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom mittels *CellSearch* analysiert. Eine Übersicht über die erzielten CTC-Detektionsraten in den einzelnen Kollektiven sowie über die Anzahl isolierter Einzelzellen ist in Tab. 3.1. aufgeführt.

Tab. 3.1.: Detektion und Mikromanipulation von CTCs aus Patientenblut der Kollektive A-D.

Kollektiv	Anzahl Patienten	Metastasierungs-status	1-2 CTCs	≥ 3 CTCs	Anz. CTCs	Isolierte CTCs zur Einzelzellanalyse (Anz. Patienten)
A	47	M0 = 31; M1 = 16	5/47 10.6%	10/47 21.3%	1-34	0
B	35	M0 = 2; M1 = 33	8/35 22.9%	14/35 40%	1-202	107 (6)
C	35	unbekannt (fortgeschrittenes Karzinom)	9/35 25.7%	4/35 11.4%	1-64	4 (1)
D	6	M1 = 6	0/6	6/6 100%	10-42	30 (6)
<i>Gesamt</i>	123	-	17.9%	27.6%	1-202	141 (13)

Insgesamt konnte in 46% der analysierten Patienten mindestens eine CTC/7.5 mL Blut gefunden werden (Kollektiv A: 32%; Kollektiv B: 63%; Kollektiv C: 37%; Kollektiv D: 100% CTC-positive Patienten). Die Anzahl der nachgewiesenen CTCs in je 7.5 mL Blut variierte zwischen 1-202 (Mittelwert: 17 CTCs, Median: 4 CTCs). Stark erhöhte CTC-Zahlen von über 100 Zellen/7.5 mL Blut waren lediglich in drei Patienten des Kollektivs B zu beobachten, welche bereits Knochenmetastasen ausgebildet hatten.

Zur anschließenden molekularen Analyse der CTCs (s. 3.2.2.) konnten insgesamt 141 Zellen aus 13 Patienten isoliert werden.

3.2. Einzelzellanalyse

Um die mittels *CellSearch* angereicherten und detektierten CTCs näher untersuchen zu können, mussten die Zellen zunächst aus der *CellSearch*-Kartusche auf einen Objektträger überführt werden (Abb. 3.2., s. 2.2.3.1.). Da dieser Transfer stets mit einem gewissen Zellverlust (z.B. durch die mechanische Zerstörung von Zellen während des Pipettiervorganges) verbunden war, wurden lediglich Proben mit mindestens 5 intakten CTCs für weitere Analysen eingesetzt. Anhand der im *CellSearch*-System erfolgten Fluoreszenzfärbung wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Zellen mit CTC-typischen Eigenschaften (Keratin- und DAPI-positiv sowie CD45-negativ) identifiziert und mit Hilfe einer Mikromanipulationseinheit einzeln isoliert (Abb. 3.2., s. 2.2.3.1.). Um die molekulare Analyse der sehr geringen Menge gesamtgenomischer DNA (~7pg) einer Einzelzelle zu ermöglichen, wurde diese zunächst mit Hilfe kommerziell erwerblicher Kits vervielfältigt (WGA: *whole genome amplification*; s. 2.2.3.2.). Resultierende WGA-Produkte wurde schließlich für weiterführende Analysen verschiedener Parameter (Gesamtgenomische Aberrationen, Amplifikationsrate und Mutationsstatus verschiedener Gene) mit Hilfe unterschiedlicher Methoden (CGH, qPCR, Sequenzierung) eingesetzt (Abb. 3.2.).

Zur Vereinfachung wurden die WGA-Produkte von Einzelzellen im Rahmen dieser Arbeit auch als DNA der entsprechenden Zelle bezeichnet.

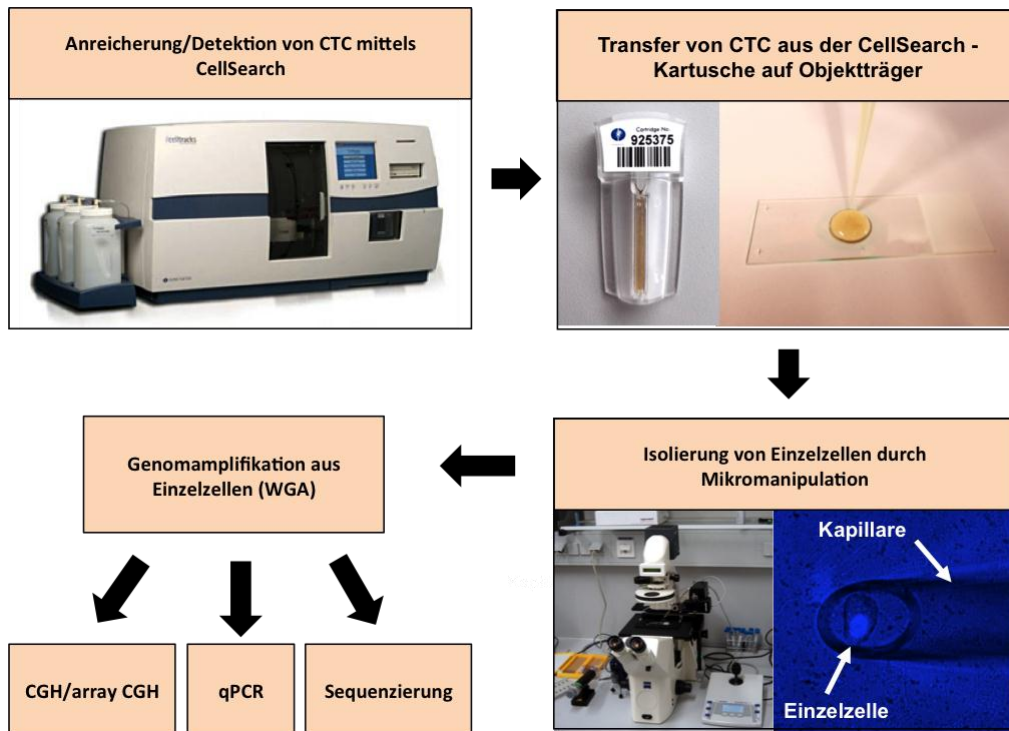


Abb. 3.2.: Schematische Übersicht einzelner Arbeitsschritte zur Analyse von mittels *CellSearch* detektierter Einzelzellen.

3.2.1. Etablierung eines WGA-Protokolls zur molekularen Analyse von Einzelzellen

Für die Etablierung eines geeigneten WGA-Protokolls wurden zwei verschiedene, auf verschiedenen Amplifikationsstrategien basierende Kits getestet: das *GenomePlex Whole Genome Amplification Kit (GenomePlex)* von Sigma-Aldrich und das *GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GenomiPhi)* der Firma GE Healthcare (s. 2.2.3.2.). Die Validierung der angewandten Analysemethoden erfolgte unter Verwendung verschiedener Tumorzelllinien. Sofern nicht anders vermerkt, wurden jeweils 200-1000 Zellen in 7.5 mL Blut eines gesunden Spenders gegeben, mit Hilfe des *CellSearch*-Systems angereichert und detektiert und schließlich nach dem Transfer aus der *CellSearch*-Kartusche mittels Mikromanipulation isoliert (s. 2.2.3.1.).

3.2.1.1. Nachweis von chromosomalen Aberrationen in genomischer DNA einzelner Zelllinienzellen mittels Metaphasen-CGH (mCGH)

Zum Nachweis des malignen Ursprungs der detektierten epithelialen Zellen sollte zunächst ein adäquates WGA-Protokoll zur Analyse von Einzelzell-DNA mittels Metaphasen-CGH (mCGH) etabliert werden. Die mCGH-Analyse ermöglicht zudem die Identifikation von unter- oder überrepräsentierten Genombereichen in den analysierten Einzelzellen.

Erste Versuche wurden unter Verwendung der MDA-MB-468 durchgeführt, welche eine 30-40fache Amplifikation des EGFR-Gens (Genelokalisation: 7p12) aufweist [67]. Jeweils 16 Einzelzellen wurden für eine WGA mit dem *GenomePlex-Kit* und dem *GenomiPhi-Kit* (s. 2.2.3.2.) eingesetzt.

Zum Vergleich der mit beiden Kits erzielten DNA-Qualität wurde jeweils 1 µL des WGA-Produkts für eine Multiplex-PCR mit dem Primergemisch 1CHR (s. Anhang III) eingesetzt. Das 1CHR-Primergemisch enthält vier Primerpaare, welche verschiedene, nichtüberlappende Bereiche des „Housekeeping“-Gens GAPDH (12p13) mit einer Länge von 100 bp, 200 bp, 300 bp bzw. 400 bp flankieren. Angelehnt an die von VAN BEERS *et al.* [118] durchgeführte Studie wurde für die mCGH-Analyse von Einzelzell-DNA ein

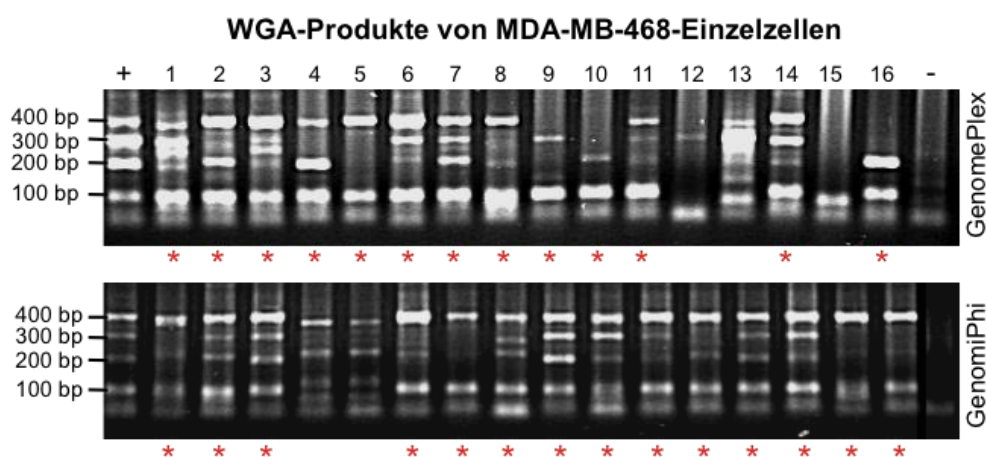


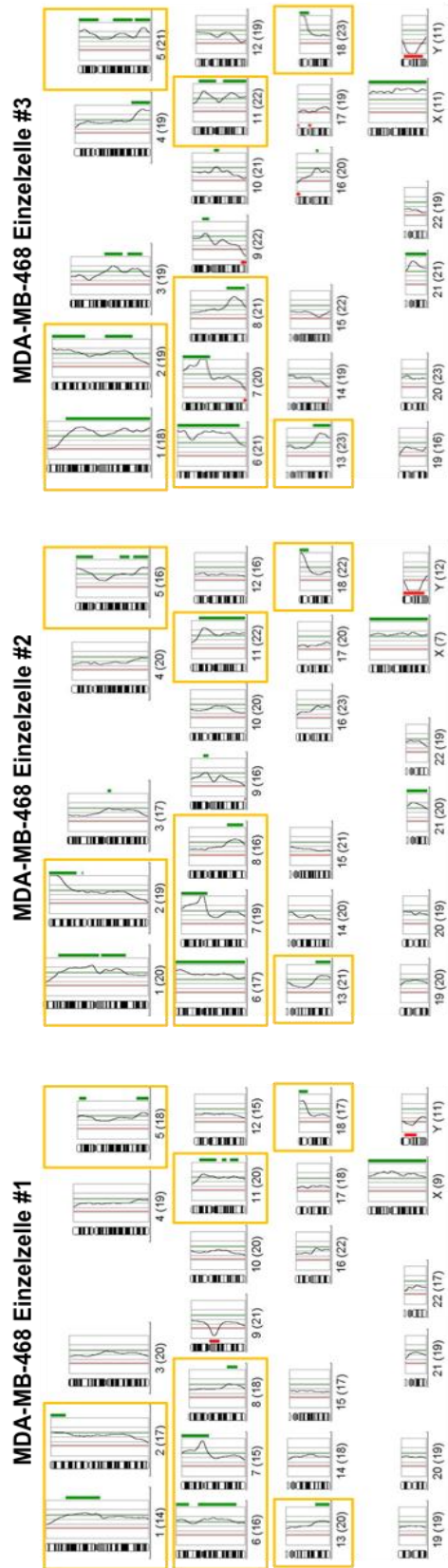
Abb. 3.3.: Gegenüberstellung der CHR1-MPLX-PCR-Ergebnisse der *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNA von 16 MDA-MB-468-Einzelzellen. [*]:MPLX-PCR positive Zellen mit mindestens einem Amplifikat ≥ 200 bp der zu erwartenden vier Amplifikate (100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp). [+] : WGA-Positivkontrolle (WGA-Produkt von 10 ng DNA-Extrakt aus $\sim 10^7$ Zellen (s. 2.2.4.1.1.) aus MDA-MB-468-Zellen); [-]: WGA-Negativkontrolle (WGA ohne Zugabe von DNA/Zellen).

positives Ergebnis der MPLX-PCR (mindestens ein Amplifikat mit einer Länge ≥ 200 bp) vorausgesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung (s. 2.2.4.6.) der MPLX-PCR-Produkte ist in Abb. 3.3. dargestellt.

Von den 16 *GenomePlex*- bzw. *GenomiPhi*-WGA-Produkten wiesen 13 bzw. 14 mindestens ein DNA-Amplifikat mit der erforderlichen Länge (≥ 200 bp) auf. Für die anschließende Metaphasen-CGH wurden die *GenomePlex*-DNAs der Zellen #4, #7 und #11 sowie die *GenomiPhi*-DNAs der Zellen #9, #11 und #14 ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Im Gegensatz zu den *GenomiPhi*-DNAs, welche lediglich sehr schwache, nicht auswertbare Hybridisierungssignale lieferten, konnte mit allen 3 *GenomePlex*-DNAs ein deutlich aberrantes CGH-Profil erhalten werden (Abb. 3.4.A). Neben dem zu erwartenden Zugewinn der Chromosomenregion 7p, welche auch das EGFR-Gen umfasst, wurden weitere übereinstimmende Zugewinne in den drei Einzelzellen detektiert (1p, 2p, 5pq, 6pq, 8q, 11pq, 13q und 18p). Ausschließlich in der DNA von einer (2q, 4q) oder zwei (1q, 3q, chr21) MDA-MB-468-Zellen auftretende chromosomale Veränderungen konnten ebenfalls beobachtet werden.

Während die *GenomePlex*-WGA-Produkte direkt für die mCGH-Analyse einsetzbar waren, konnte nach einer Aufreinigung der WGA-Produkte weder mit der *GenomePlex*- noch der *GenomiPhi*-DNA ein auswertbares mCGH-Profil erhalten werden (Abb. 3.5.). Da die Aufreinigung von DNA generell mit einem gewissen Verlust der DNA-Menge verbunden ist, sollte eine unzureichende DNA-Konzentration als Grund für die Inkompatibilität der WGA-Produkte ausgeschlossen werden. Hierzu wurden jeweils die verbliebenen WGA-Produkte aufgereinigt (s. 2.2.3.2.), MPLX-positive DNAs vereinigt (*GenomiPhi*-DNAs der Zellen: #6, #7, #8, #10, #13, #15, #16; *GenomePlex*-DNAs der Zellen: #2, #4, #5, #6, #7, #14) sowie das Volumen dieses DNA-Pools mit einer SAVANT *SpeedVac* Zentrifuge (Thermo Scientific, Wilmington, USA) reduziert. Auf diese Weise konnten aus *GenomePlex*- bzw. *GenomiPhi*-WGA-Produkten einzelner Zellen DNA-Pools mit Konzentrationen von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und 300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ hergestellt werden. Unter Verwendung dieser DNA-Pools konnten jedoch ebenfalls keine auswertbaren mCGH-Profile erhalten werden (Abb. 3.5.).

A



B

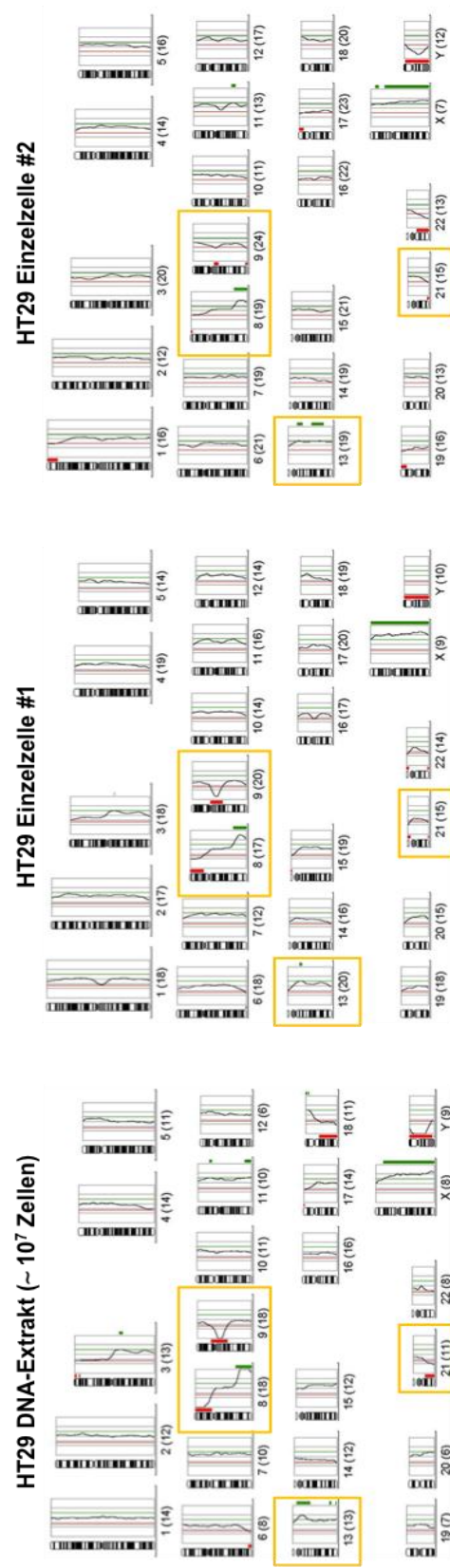


Abb. 3.4.: mCGH-Profil von DNA aus Tumorzelllinienzellen. [A]: CGH-Profil der DNA von drei verschiedenen MDA-MB-468-Einzelzellen.[B]: Gegenüberstellung des CGH-Profiles eines DNA-Extraktes aus etwa 10^7 HT29-Zellen und den Profilen der DNA zweier HT29-Einzelzellen. Zugewonnene Regionen sind in grün, deletierte Bereiche in rot visualisiert. Übereinstimmende Aberrationen sind hervorgehoben [gelbe Boxen].

	Direkt	nach Aufreinigung	DNA-Pool
GenomePlex DNA	✓	✗	✗
GenomiPhi DNA	✗	✗	✗

Abb. 3.5.: Übersicht über die Einsetzbarkeit von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNAs für die mCGH-Analyse. Die Verwendbarkeit von direkt nach einer Aufreinigung oder als DNA-Pool (100 ng/μL, 200 ng/μL, 300 ng/μL) eingesetzten WGA-Produkten beider Kits wurde gegenübergestellt. [grüner Haken]: evaluierbares CGH-Profil; [rotes Kreuz]: kein CGH-Profil erhalten.

Für weiterführende Experimente wurden mit dem *CellSearch*-System prozessierte Zellen der kolorektalen Tumorzelllinie HT29 (s. 2.1.8.) verwendet.

Zur Validierung der mit *GenomePlex*-DNA erzielten mCGH-Ergebnisse wurde genomische DNA aus $\sim 10^7$ unbehandelten HT29-Zellen isoliert (s. 2.2.4.1.1.) und ebenso wie die WGA-Produkte von zwei verschiedenen HT29-Einzelnzellen für eine mCGH eingesetzt. Die resultierenden CGH-Profile (Abb. 4.B) zeigten überwiegend übereinstimmende Aberrationen, wie Verluste in den Bereichen 8p, 9q und 21q sowie Zugewinne in den Regionen 8q und 13p. Lediglich eine Deletion im Bereich 18q konnte ausschließlich im HT29-DNA-Extrakt ($\sim 10^7$ Zellen) und nicht in der Einzelzell-DNA visualisiert werden. Folglich kann unter Verwendung von direkt eingesetzten *GenomePlex*-WGA-Produkten eine relativ verlässliche Detektion chromosomaler Veränderungen auf Einzelzellebene mittels mCGH erfolgen.

Aufgrund der unter 3.2.1.2. und 3.2.1.3. beschriebenen begrenzten Einsetzbarkeit von *GenomePlex*-DNAs für PCR-basierte Techniken sollte außerdem eine Möglichkeit zur mCGH-Analyse von *GenomiPhi*-amplifizierter Einzelzell-DNA gefunden werden. Die Inkompatibilität der *GenomiPhi*-DNA für die mCGH-Analyse sollte mit Hilfe einer erneuten WGA-Reaktion (Zweit-WGA) auf das vorhandene *GenomiPhi*-WGA-Produkt umgangen werden. Für die Zweit-WGA wurden verschiedene, in Abb. 3.6. dargestellte Ansätze verfolgt. Den Ausgangspunkt bildete hierbei die *GenomiPhi*-DNA von 4 HT29-Einzelnzellen die ein positives Ergebnis in der CHR1-Multiplex-PCR aufwiesen. Während zwei dieser WGA-Produkte zunächst mittels NucleoSeq-Säulen aufgereinigt wurden (s. 2.2.3.2.2.), wurde die DNA der anderen zwei HT29-Zellen direkt für die anschließende Zweit-WGA (*GenomiPhi* oder *GenomePlex*) eingesetzt.

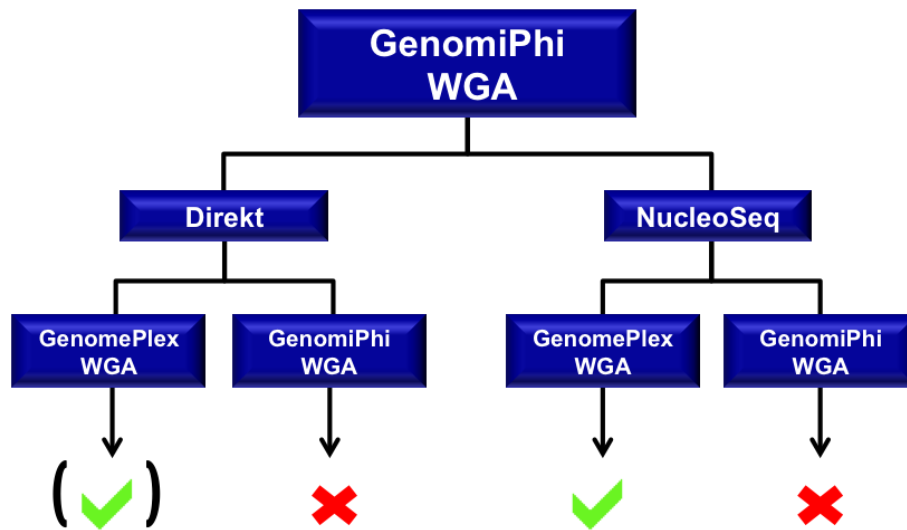


Abb. 3.6.: Aufarbeitungsschema zur Etablierung eines Protokolls zur Verwendbarkeit von *GenomiPhi*-WGA-Produkten für die mCGH-Analyse. Die *GenomiPhi*-WGA von jeweils zwei HT29-Einzelzellen wurde direkt (unaufgereinigte WGA) oder in aufgereinigter Form (Material&Methoden) für eine anschließende *GenomiPhi*- oder *GenomePlex*-WGA eingesetzt. [grüner Haken]: evaluierbares CGH-Profil; [rotes Kreuz]: kein CGH-Profil erhalten.

Für eine erneute *GenomiPhi*-WGA wurde die *GenomiPhi*-Ausgangs-DNA vollständig verwendet, oder es wurden 200 ng der aufgereinigten *GenomiPhi*-Ausgangs-DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit *GenomiPhi*-Probenpuffer auf ein Endvolumen von 20 µL aufgefüllt, 2 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend mit dem *GenomiPhi*-Kit gemäß Herstellerprotokoll (s. 2.2.3.2.2.) amplifiziert. Die resultierenden WGA-Produkte werden im Folgenden als *GenomiPhi*_{direkt} bzw. *GenomiPhi*_{NucleoSeq}-DNA bezeichnet.

Für eine Zweit-WGA mit dem *GenomePlex*-Kit wurden 10 µL der *GenomiPhi*-Ausgangs-DNA (1 : 1 verdünnt) bzw. 10 ng der aufgereinigten *GenomiPhi*-Ausgangs-DNA (Endvolumen: 10 µL) verwendet. Die Zweit-WGA wurde nach Herstellerangaben, beginnend mit der Zugabe des Lysis- und Fragmentierungsgemischs (s. 2.2.3.2.1.), durchgeführt. Die generierten WGA-Produkte werden wie folgt bezeichnet: *GenomePlex*_{direkt} bzw. *GenomePlex*_{NucleoSeq}-DNA.

Während eine erneute *GenomiPhi*-WGA auf die *GenomiPhi*-Ausgangs-DNA keine Verbesserung der CGH-Hybridisierungssignale zur Folge hatte, konnte durch eine Zweit-WGA mit dem *GenomePlex*-Kit aus beiden *GenomiPhi*-Ausgangs-DNAs (direkt bzw. aufgereinigt eingesetzt) ein evaluierbares CGH-Profil generiert werden. Die Gegenüberstellung dieser beiden CGH-Profile mit einem Profil eines HT29-DNA-Extraktes



Abb. 3.7.: mCGH-Profil von *GenomiPhi*-DNA aus HT29-Einzelzellen nach einer erneuten WGA mit dem *GenomePlex*-Kit. Das CGH-Profil eines DNA-Extrakts aus etwa 10^7 HT29-Zellen ist den CGH-Profilen von GP-WGA-Produkten aus HT29-Einzelzellen gegenübergestellt, welche direkt (*GenomePlex_{direkt}*) oder mittels NucleoSeq-Säulen aufgereinigt (*GenomePlex_{NucleoSeq}*) für eine Zweit-WGA mit *GenomePlex*-Kit eingesetzt wurden. Zugewonnene DNA-Regionen sind in grün, deletierte Bereiche in rot visualisiert. Übereinstimmende Aberrationen sind durch gelbe Boxen hervorgehoben.

aus $\sim 10^7$ -Zellen (Abb. 3.7.) zeigt, dass die im DNA-Extrakt zu verzeichnenden Aberrationen ebenso in beiden doppelt amplifizierten DNAs nachgewiesen werden konnten (Zugewinne: 3q, 8q, 11pq, 13q; Verluste: 8p, pq, 18q, 21q). Neben diesen Übereinstimmungen waren jedoch in beiden Einzelzell-DNAs zusätzliche Aberrationen zu beobachten. Während in der *GenomePlex_{NucleoSeq}*-DNA lediglich zusätzliche Verluste im Bereich 14pq und des Chromosoms 22 zu verzeichnen waren, wurden durch die erneute Amplifikationsreaktion in der *GenomePlex_{direkt}*-DNA zahlreiche zusätzliche Aberrationen generiert (Zugewinne: 1q, 6q, 7q; Deletionen: 1p, 14pq, 17pq, 20p, 22pq). Um eine annähernd verlässliche mCGH-Analyse von *GenomiPhi*-WGA-Produkten zu erreichen, müssen diese folglich mittels NucleoSeq-Säulen aufgereinigt und anschließend für eine erneute WGA mit dem *GenomePlex*-Kit eingesetzt werden.

3.2.1.2. Identifikation von Genamplifikationen in Einzelzell-DNA mittels qPCR

Während die Analyse von DNA mittels CGH einen Überblick über vorkommende Aberrationen im Gesamtgenom vermittelt, kann mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR (qPCR, s. 2.2.4.5.) die Untersuchung spezifischer, Tumor-assoziiierter Genbereiche erfolgen. Hierbei werden über die Erstellung von Standardgeraden sowohl die interessierende Zielregion als auch eine Referenzregion im Ausgangsansatz quantifiziert und miteinander ins Verhältnis gesetzt (s. 2.2.4.5.2.).

Um eine verlässliche Detektion von amplifizierten Genregionen auf Einzelzellebene zu ermöglichen, wurden zunächst qPCR-Assays unter Verwendung von Tumorzelllinien, für die eine Amplifikation des *EGFR*- bzw. *HER2*-Gens beschrieben ist, validiert. Als Referenz wurde ein im Bereich der sogenannten LINE1 (*long interspersed nuclear element 1*)-Sequenz bindendes Primerpaar verwendet. Bei LINE1 handelt es sich um im humanen Genom zufällig verteilte, retrotransposale Elemente mit einer Länge von etwa 6-8kb. Der Vorteil von LINE1 gegenüber anderen, diploid vorliegenden Referenzregionen liegt in der hohen Kopienzahl (~900 Kopien) und weiten Verbreitung dieser Sequenzen im Gesamtgenom (~17% des Gesamtgenoms) [119, 120]. Während der WGA-Reaktion möglicherweise auftretende Unregelmäßigkeiten bei der Amplifikation bestimmter DNA-Regionen könnten durch die starke LINE1-Präsenz im Genom kompensiert werden. Für die qPCR-Analyse von WGA-Produkten stellt LINE1 im Gegensatz zu diploiden Genen folglich eine stabile Referenz dar.

Um eine möglichst effiziente und aussagekräftige Analyse von Einzelzell-DNA mittels qPCR zu erzielen, wurden zunächst Versuche mit *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNAs aus Einzelzellen durchgeführt. Hierfür wurden die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-468 und BT20 mit einer ~30-40 bzw. 7-12fachen Amplifikation des *EGFR*-Gens [110, 121-123] verwendet. Jeweils 11 MDA-MB-468- sowie 7 BT20-Zellen wurden parallel für eine WGA mit beiden Kits eingesetzt. *GenomePlex*-WGA-Produkte wurden mit dem *GenElute PCR-Clean-up Kit*, *GenomiPhi*-WGA-Produkte mit Hilfe von *NucleoSeq*-Säulen aufgereinigt. Der anschließende qPCR-Assay wurde mit *EGFR_E8* (Exon 8, [110]) als Zielgen- und LINE1 als Referenzregion (s. Anhang III, [34]) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in jedem PCR-Lauf zusätzlich der *EGFR*-Amplifikationsstatus des DNA-Extraktes (aus ~10⁷ Zellen) der entsprechenden Zelllinie bestimmt. Tab. 3.2. gibt eine Übersicht der ermittelten *EGFR*-Amplifikationsraten.

Tab. 3.2.: Vergleich der durch qPCR ermittelten *EGFR*-Amplifikationsraten von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNAs aus einzelnen Zelllinienzellen. [A]: Gegenüberstellung der Amplifikationsraten von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNA von 11 MDA-MB-468-Zellen. [B]: Gegenüberstellung der Amplifikationsraten von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNA von 7 BT20-Zellen. Für den qPCR-Assay geeignete Einzelzell-DNAs wurden grün, nicht auswertbare DNAs rot unterlegt. [n.a. = nicht analysiert; Mittelwert/Median = aus Amplifikationsraten der Einzelzellen ermittelt; gDNA = DNA-Extrakt isoliert aus $\sim 10^7$ -Zellen].

A	MDA-MB-468 Einzelzelle #											Mittelwert	Median	gDNA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
Genome-Plex	0.6	4.6	7.4	13.7		20.4			15		40.4	14.7	11.2	40.4
Genomi-Phi	18.1	11.9	40.3	7.2	88.7	90.1	26.9		41.8		60.9	43.9	40.3	28.9

B	BT20 Einzelzelle #							Mittelwert	Median	gDNA
	1	2	3	4	5	6	7			
Genome-Plex		3.8	0.6		15.8		3.3	5.9	3.6	7.0
Genomi-Phi	16.5	8.5	8.5		2.0	4.6	14.9	9.2	8.5	5.9

Da für eine erfolgreiche Berechnung der *EGFR*-Amplifikationsrate sowohl ein PCR-Produkt mit dem *EGFR*- als auch dem *LINE1*-Primer erzielt werden muss, konnte lediglich von 11/18 (61%) der *GenomePlex*- und von 15/18 (83%) der *GenomiPhi*-amplifizierten Einzelzell-DNAs die *EGFR*-Amplifikationsrate ermittelt werden. Sowohl bei den MDA-MB-468- als auch der BT20-Zellen waren unabhängig vom verwendeten Kit starke Unterschiede in den Amplifikationsraten der einzelnen Zellen zu beobachten. Die Amplifikationsraten der Einzelzell-DNAs lagen hierbei in folgenden Bereichen: MDA-MB-468_{GenomePlex}: 0.6-40.5; MDA-MB-468_{GenomiPhi}: 7.2-90.1; BT20_{GenomePlex}: 0.6-15.8; BT20_{GenomiPhi}: 2.0-16.5. Wie aus Tab. 3.2. ersichtlich, konnte für beide Zelllinien in den analysierten *GenomiPhi*-DNAs eine Amplifikation des *EGFR*-Gens (Amplifikationsrate ≥ 1.5) detektiert werden, wohingegen in der *GenomePlex*-DNA einer MDA-MB-468- und einer BT20-Zelle keine *EGFR*-Genamplifikation (Amplifikationsrate <1.5) nachgewiesen werden konnte (MDA-MB-468: Zelle #1; BT20: Zelle #5).

Die Mittelwerte und Mediane der Amplifikationsraten der Einzelzell-DNAs zeigten eine weitestgehende Übereinstimmung mit der *EGFR*-Amplifikationsrate des entsprechenden

DNA-Extrakt aus $\sim 10^7$ -Zellen (MDA-MB-468_{GenomiPhi}; BT20_{GenomePlex}; BT20_{GenomiPhi}). Lediglich bei den *GenomePlex*-DNAs der MDA-MB-468-Zellen war mit einem Mittelwert bzw. Median von 14.7 bzw. 11.2 eine relativ starke Abweichung vom DNA-Extrakt mit einer Amplifikationsrate von 40.4 zu verzeichnen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Einzelzellen für eine anschließende qPCR-Analyse, sofern nicht anders vermerkt, mit dem *GenomiPhi*-Kit prozessiert.

Für die weiterführende Validierung der qPCR-Analyse von Einzelzell-DNA wurden verschiedene Zelllinien mit bekanntem Amplifikationsstatus des *EGFR*- bzw. *HER2*-Gens eingesetzt.

Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen 11 MDA-MB-468 und 7 BT20-Zellen wurden 9 bzw. 10 einzelne Zellen der Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-453 (keine *EGFR*-Amplifikation, [124]) und des MDA-MB-468-Subklons A (*EGFR*-Amplifikationsrate = 1.7-2.6 ; [110]) mittels *EGFR*-qPCR analysiert. Insgesamt konnten mit 30/39 (77%) der untersuchten Einzelzell-DNAs auswertbare qPCR-Ergebnisse erzielt werden. Im Vergleich zu den Amplifikationsraten der DNA-Extrakte ($\sim 10^7$ Zellen) zeigten die Messwerte der Einzelzell-DNAs eine relativ starke Streuung (Abb. 3.8.), vor allem in Zelllinien mit einem höheren Genamplifikationsstatus (MDA-453: 0.1-1.0; MDA-468A: 0.3-1.7; BT20: 2.0-30.0; MDA-468: 7.2-90.1). Die Mittelwerte dieser Messwerte sind jedoch für alle getesteten Zelllinien mit den Amplifikationsraten der DNA-Extrakte sowie den Literaturangaben [110, 121-124] vergleichbar.

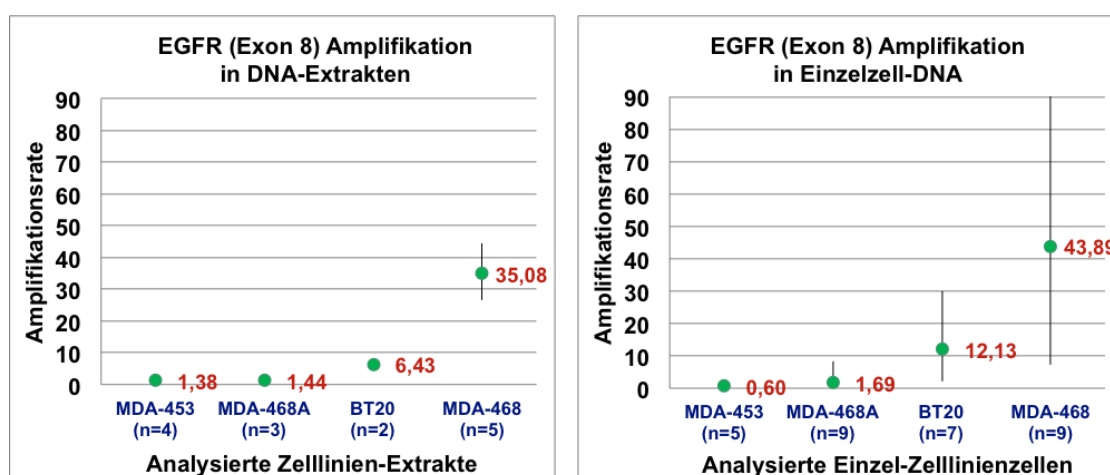
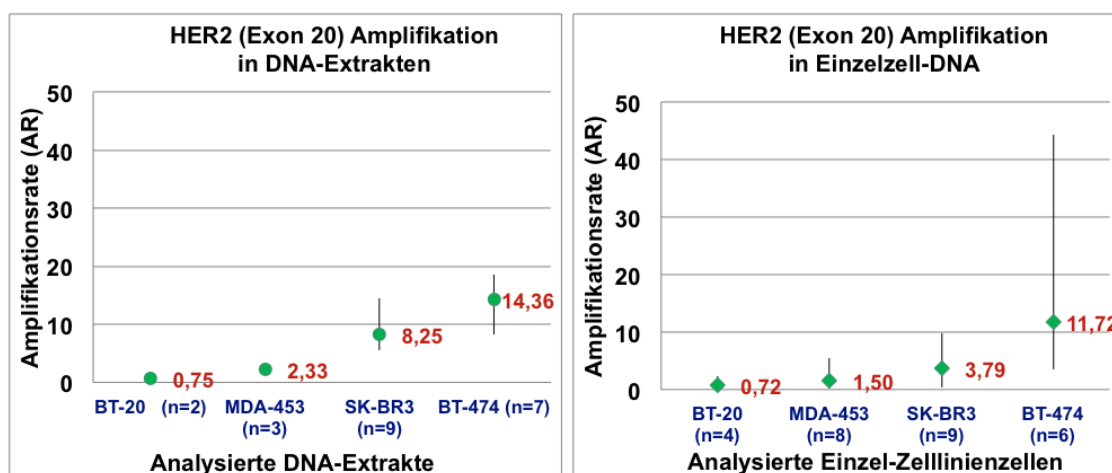


Abb. 3.8.: *EGFR*-Amplifikationsraten in DNA-Extrakten aus $\sim 10^7$ Zellen und Einzelzell-DNA verschiedener Zelllinien. Die Anzahl der ausgewerteten DNA-Extrakte bzw. Einzelzell-DNAs ist für jede Zelllinie angegeben (n = x). Die Mittelwerte der Amplifikationsraten sind hervorgehoben [grüner Punkt] und mit dem entsprechenden Wert versehen [rot]. Die Streuung der einzelnen Amplifikationsraten ist den Diagrammen ebenfalls zu entnehmen [graue Linien].

Des Weiteren wurden zwei verschiedene Region des *HER2*-Gens - im Bereich des Exons 20 und 27 - in Mammakarzinomzelllinien mit bekanntem *HER2*-Status (BT20: keine Her2-Amplifikation [125], MDA-453: 2.8, [126]; SKBR3: 6-12, [126] [127]; BT474: 9, [126]) auf Einzelzellebene untersucht. Für die Analyse mit den Zielgen-Primern *HER2*_Exon20 und Exon27 (s. Anhang III) wurde die Einzelzell-DNA von 10 BT20-, 9 MDA-MB-453-, 10 SKBR3 und 9 BT474-Zellen eingesetzt. Mit den *HER2*-Exon20-Primern konnte mit 27/38 (71%) und mit dem *HER2*-Exon27-Primern mit 26/38 (68%) der WGA-Produkte eine Genamplifikationsrate ermittelt werden. Die Ergebnisse der *HER2*-qPCR-Assays sind in Abb. 3.9. dargestellt.

A



B

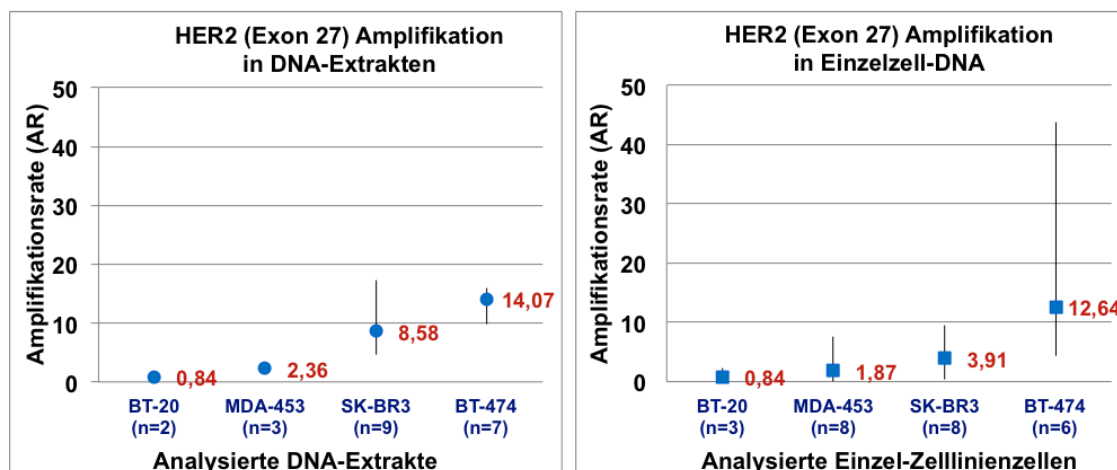


Abb. 3.9.: Amplifikationsraten zweier unterschiedlicher *HER2*-Regionen in DNA-Extrakten und Einzelzell-WGA verschiedener Zelllinien. [A]: Amplifikationsraten des Exons 20 des *HER2*-Gens in DNA-Extrakten bzw. WGA-Produkten. [B] Amplifikationsraten des Exons 27 des *HER2*-Gens in DNA-Extrakten bzw. WGA-Produkten. Die Anzahl der ausgewerteten DNA-Extrakte bzw. WGA-Produkte ist für jede Zelllinie angegeben (n = x). Die Mittelwerte der Amplifikationsraten sind hervorgehoben [grüner Punkt] und mit dem entsprechenden Wert versehen [rot]. Die Streuung der einzelnen Amplifikationsraten ist mit Hilfe von grauen Linien visualisiert.

Sowohl mit den DNA-Extrakten als auch mit den Einzelzell-DNAs konnten in beiden untersuchten HER2-Regionen annähernd identische Messwerte erzielt werden, was sich auch in den dargestellten Mittelwerten widerspiegelt. Wie zuvor beim *EGFR*-Assay waren im Vergleich zu den DNA-Extrakten relativ starke Schwankungen, zwischen den Amplifikationsraten der Einzelzellen, jedoch sehr ähnliche Mittelwerte zu verzeichnen.

Da ein Teil der analysierten WGA-Produkte (19-32%) kein auswertbares qPCR-Amplifikat lieferte, wurde eine Multiplex-PCR zur Vorhersage der Eignung eines WGA-Produktes für die qPCR-Analyse der Tumor-assoziierten Gene *HER2*, *LGR5*, *EGFR* und *AURKA* etabliert. Für die Multiplex-PCR (s. 2.2.4.4.2.) wurden vier Primerpaare in einer PCR-Reaktion eingesetzt (4CHR-MPLX-Primergemisch, s. Anhang III). Der Amplifikationserfolg einer bestimmten Zielregion sollte schließlich Auskunft über die Verwendbarkeit einzelner WGA-Produkte für den entsprechenden qPCR-Assay geben.

Zur Etablierung wurden je 15 Einzelzell-DNAs der Zelllinien BT474 und SKBR3 für die 4CHR-MPLX-PCR und eine anschließende qPCR-Analyse des *EGFR*-Gens eingesetzt. Wie in Abb. 3.10. dargestellt, war eine erfolgreiche Analyse des *EGFR*-Genamplifikationsstatus mittels qPCR ausschließlich mit Einzelzell-DNAs möglich, die ein *EGFR*-Amplifikat in der 4CHR-MPLX-PCR zeigten. Bei der BT474-Zelle #11 und der SKBR3-Zelle #13 konnten zwar Zielgen- und Referenzprimer der qPCR erfolgreich amplifiziert

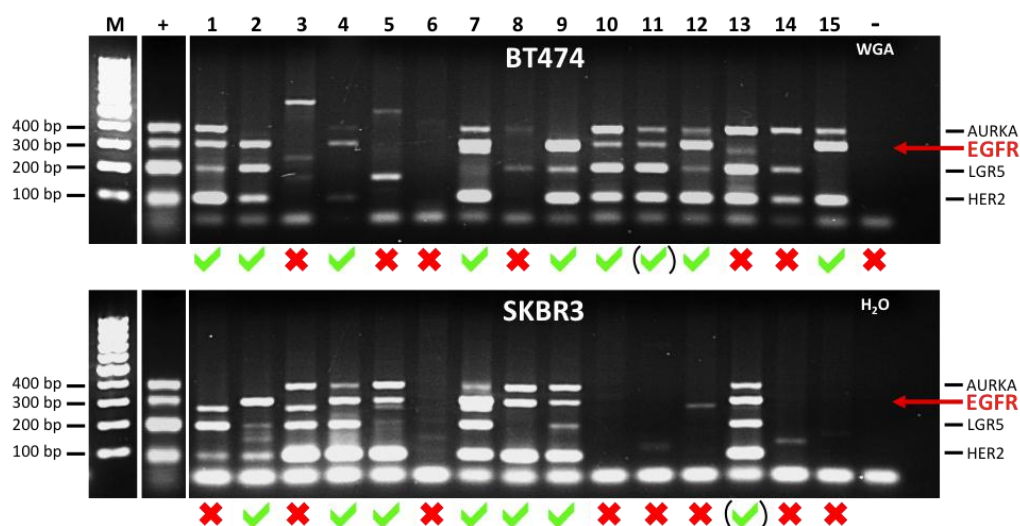


Abb. 3.10.: Korrelation der 4CHR-MPLX-PCR-Ergebnisse mit der Verwendbarkeit von WGA-Produkten für die qPCR-Analyse des *EGFR*-Gens. 4CHR-MPLX-PCR-Ergebnisse von GP-WGA-Produkten aus 15 BT474- und SKBR3-Einzelzellen. Der Amplifikationserfolg des *EGFR*-Fragments (300 bp) in der MPLX-PCR korrelierte mit der Funktionalität der WGA in der *EGFR*-qPCR. Für den qPCR-Assay geeignete und ungeeignete WGA wurden entsprechend gekennzeichnet (grüner Haken/ rotes Kreuz). [+]: WGA-Positivkontrolle (WGA-Produkt von 10 ng DNA-Extrakt aus $\sim 10^7$ BT474-Zellen (s. 2.2.4.1.1.)); [-]: WGA-Negativkontrolle (oberes Gel) bzw. Wasserkontrolle der MPLX-PCR-Reaktion (unteres Gel).

werden, die ermittelte Ausgangsmenge der LINE1-Referenzsequenzen lag mit 230 pg jedoch knapp unter der für eine verlässliche Auswertung benötigten Mindestmenge von 250 pg (s. 2.2.4.5.2).

3.2.1.3. Mutationsanalysen einzelner Tumorzellen

Neben Amplifikationen und Deletionen bestimmter DNA-Bereiche spielt das Auftreten spezifischer Genmutationen in sogenannten Onko- oder Tumorsuppressorgenen eine große Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen. Die Detektion von tumorassoziierten Genmutationen in CTCs könnte folglich sowohl als Nachweis des malignen Ursprungs der detektierten Zellen dienen als auch für therapeutische Zwecke von Bedeutung sein (s. 1.2.4.1.).

Um die Verwendbarkeit von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-WGA-Produkten für die Sequenzierung spezifischer Genbereiche zu überprüfen, wurden verschiedene Zelllinien, die Mutationen im *P53*-, *KRAS* bzw. *PIK3CA*-Gen aufweisen verwendet (Kolonkarzinom: HT29, Pankreaskarzinom: Panc-1, Mammakarzinom: MDA-231, MDA-453, MDA-468, BT20). Die zu sequenzierende Region wurde zunächst in einer klassischen PCR-Reaktion (Primerpaare: *P53_E5/6*, *P53_E8/9*, *KRAS_C12/13*, *PIK3CA_C1047*, s. Anhang III) aus der Einzelzell-DNA prä-amplifiziert (s. 2.2.4.4.1.), und das PCR-Produkt über ein präparatives Agarose-Gel aufgereinigt (s. 2.2.4.6.). Anschließend erfolgten die Sequenzierung unter Verwendung des *forward* (*P53_E5/6*, *PIK3CA_C1047*, s. Anhang III) bzw. *reverse* Primers (*KRAS_C12/13*, *P53_E8/9*, s. Anhang III) sowie die Analyse der für die entsprechende Zelllinie beschriebenen Mutation (s. 2.2.4.8.). Dadurch konnten sowohl in den *GenomePlex*- als auch in den *GenomiPhi*-DNAs die zu erwartenden Mutationen (HT29/MDA-468: *P53* R273H; Panc-1: *KRAS* G12D; MDA-231: *KRAS* G13D und *P53* R280K; MDA-453: *PIK3CA* H1047R; BT20: *P53* K132Q) nachgewiesen werden (Abb. 3.11.). Neben dem mutierten Gen wurde in einigen WGA-Produkten auch die funktionelle Wildtyp-Form des untersuchten Gens detektiert. Zur Validierung einer möglichst effizienten Methode zur Mutationsanalyse wurde Einzelzell-DNA der Zelllinien MDA-468, BT20 und Panc-1 parallel mit dem *GenomePlex*- und dem *GenomiPhi*-Kit amplifiziert, und es wurden DNA-Regionen mit bekannter Mutation analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3. dargestellt.

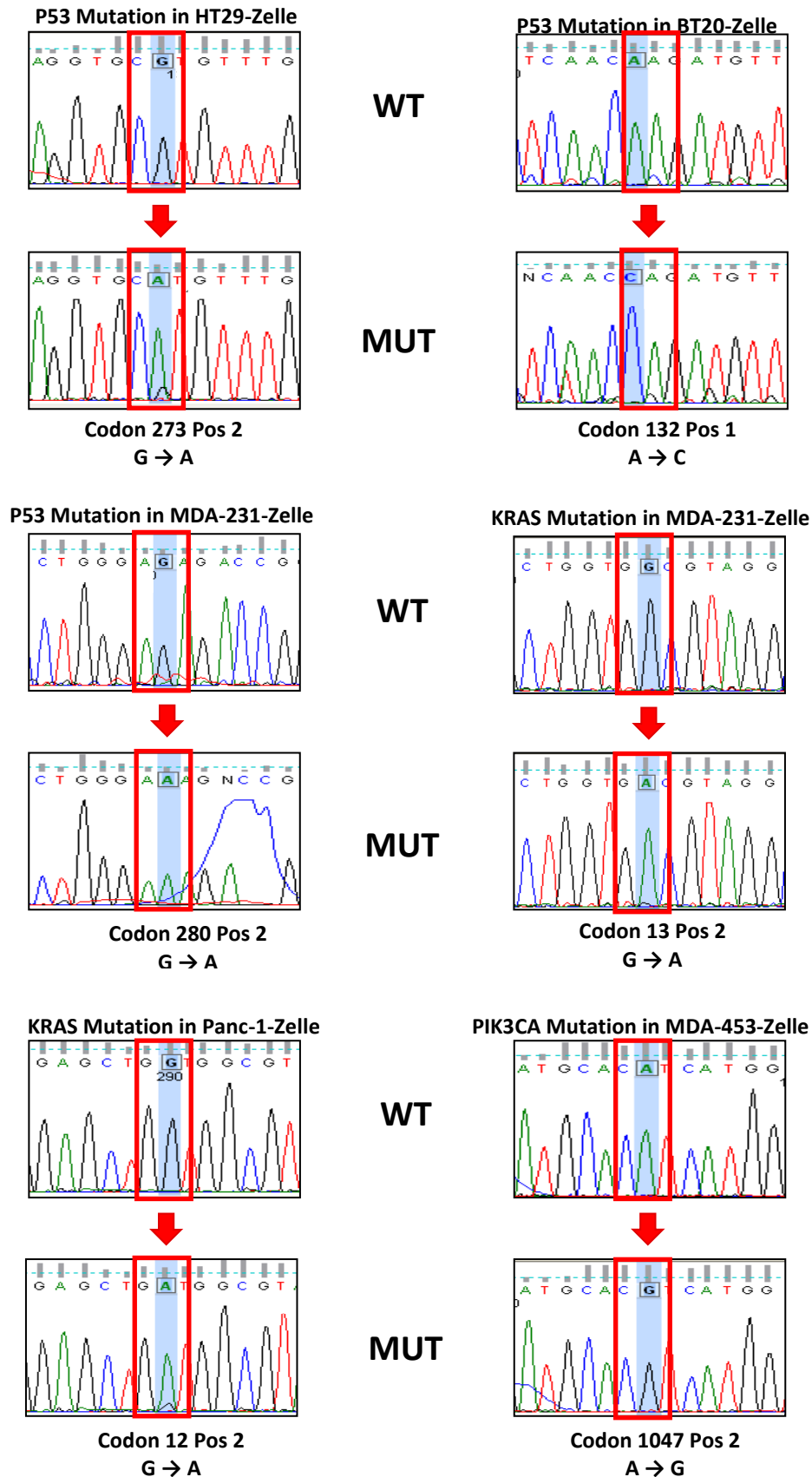


Abb. 3.11.: Detektion verschiedener Mutationen in Einzel-Zelllinienzellen. In je einer einzelnen HT29-, BT20-, MDA-231-, Panc-1- bzw. MDA-453-Zelle nachgewiesene spezifische *P53*-, *KRAS*- bzw. *PIK3CA*-Mutation (obere Sequenz: Wildtyp = WT, untere Sequenz: Mutation = MUT) sowie das betroffene Codon sind hervorgehoben (blau unterlegt bzw. rote Boxen).

Tab. 3.3.: Gegenüberstellung der Mutationsanalyse von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-Einzelzell-DNAs verschiedener Zelllinien. Effizienz der PCR und Sequenzierung spezifischer Mutationsstellen von *GenomePlex*- [A] und *GenomiPhi*-WGA-Produkten [B] von BT20- (P53 Mutation K132Q), MDA-468- (P53 Mutation R273H) und Panc-1- (KRAS Mutation G12D)-Zellen. Im Vergleich vorteilhafte Ergebnisse wurden grün, nachteilige rot unterlegt. [WT = Wildtyp] ; [MUT = Mutation].

A GenomePlex-DNAs				
Zelllinie (Mutation)	Prä-Amplifikate (Prä-Amplifikate/ analysierte DNAs)	Sequenzen (Prä-Amplifikate/ analysierte DNAs)	WT (WT/ Sequenzen)	MUT (MUT/ Sequenzen)
BT20 (P53 K132Q)	2/6	1/6	0/1	1/1
MDA-468 (P53 R273H)	1/8	0/8	-	-
Panc-1 (KRAS G12D)	9/15	7/15	6/7	1/7
Total prozentual	12/29 41%	8/29 28%	6/8 75%	2/8 25%

B GenomiPhi-DNAs				
Zelllinie (Mutation)	Prä-Amplifikate (Anz. Prä-Amplifikate/ Anz. Analysierte DNAs)	Sequenzen (Anz. Prä-Amplifikate/ Anz. Analysierte DNAs)	WT (Anz. WT/ Anz. Sequenzen)	MUT (Anz. MUT/ Anz. Sequenzen)
BT-20 (P53 K132Q)	6/9	4/9	0/4	4/4
MDA-468 (P53 R273H)	8/8	7/8	0/7	7/7
Panc-1 (KRAS G12D)	10/15	7/15	5/9	4/9
Total prozentual	24/32 75%	20/32 63%	5/20 25%	15/20 75%

Unabhängig von der Zelllinie zeigte sich, dass im Vergleich zu den *GenomePlex*-DNAs ein signifikant höherer Anteil der *GenomiPhi*-DNAs ein verwertbares Prä-Amplifikat (41% vs. 75%) und folglich auch eine Sequenz adäquater (28% bzw. 63%) Qualität lieferte. Des Weiteren konnte lediglich in 25% der erfolgreich sequenzierten *GenomePlex*-DNAs die zu erwartende Mutation (BT20: P53 K132Q; MDA-468: P53 R273H; Panc-1: KRAS G12D) nachgewiesen werden, während diese in 75% der sequenzierten *GenomiPhi*-DNAs detektiert wurde.

Da einige Einzelzellen auch die Wildtyp-Form des entsprechenden Gens zeigten und Tumorzellen auch nach der *CellSearch*-Prozedur von einer Vielzahl von Blutzellen umgeben sind, sollte der Einfluss einer möglichen Kontamination der Einzelzelle mit Leukozyten untersucht werden. Da bei der unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführten Mikromanipulation die zusätzliche Aufnahme von mehr als zwei Leukozyten weitestgehend auszuschließen ist, wurde zu diesem Zweck jeweils eine MDA-231-Einzelzelle zusammen mit einem bzw. zwei Leukozyten für eine *GenomiPhi*-WGA eingesetzt (Abb. 3.12.). Zusätzlich wurde eine MDA-231-Zelle mit etwa 2 μ L zellfreier Flüssigkeit aus der *CellSearch*-Kartusche versetzt, um einen möglichen Effekt von in dieser Flüssigkeit befindlichen freien DNA-Fragmenten zu untersuchen. DNAs

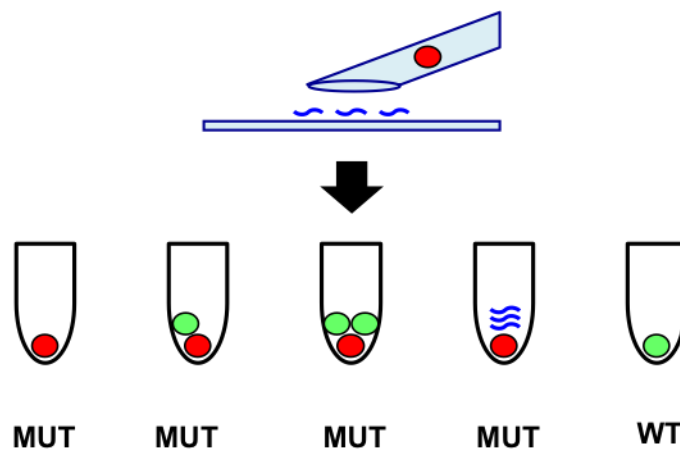


Abb. 3.12.: Untersuchung des Einflusses von Kontaminationen auf die Mutationsanalyse von Einzelzellen. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde eine MDA-231-Zelle [rot] mit Leukozyten [grün] bzw. *CellSearch*-Flüssigkeit [blau] vereinigt. Die resultierenden *GenomiPhi*-WGA-Produkte wurden schließlich auf eine R280K Mutation im *P53* Gen untersucht [WT = Wildtyp; MUT = Mutation].

einer MDA-231-Einzelzelle sowie eines einzelnen Leukozyts dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Alle Ansätze wurden in Triplikaten hergestellt, *GenomiPhi*-amplifiziert und schließlich im Bereich des Codon 280 des *P53*-Gens sequenziert.

Mit Ausnahme der WGA-Produkte eines Leukozyts und einer mit einem Leukozyten vereinigten MDA-231-Zelle konnte mit allen WGA-Produkten eine auswertbare Sequenz erhalten werden. In den verbleibenden Leukozyten-DNAs konnte erwartungsgemäß ausschließlich die Wildtyp-Form des Codons 280 beobachtet werden. In allen eine MDA-231-Zelle enthaltenden Ansätzen konnte hingegen die beschriebene Mutation (R280K) nachgewiesen werden. Weder durch den Zusatz von Leukozyten noch von zellfreier

CellSearch-Flüssigkeit konnte folglich eine Beeinträchtigung des Mutationsnachweises in MDA-231-Einzelzellen beobachtet werden.

3.2.1.4. Eignung des *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-WGA-Kits zur Analyse von Einzelzellen

In den vorhergehenden Versuchen (s. 2.1.1.–2.1.3.) erfolgte der Vergleich der WGA-Kits *GenomePlex* und *GenomiPhi* basierend auf den Einsatzmöglichkeiten der resultierenden WGA-Produkte für CGH- und PCR-basierte Analysen von Einzelzellen. Eine Zusammenfassung der Resultate dieser Zelllinienexperimente ist in Tab. 3.4. aufgeführt.

Tab. 3.4.: Zusammenfassende Gegenüberstellung der Einsetzbarkeit von *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-DNAs aus Einzelzellen für verschiedene Methoden. Die jeweils erfolgreichere Variante wurde grün, die nachteilige rot unterlegt. Als 1CHR-Multiplex-positiv (1CHR-MPLX) wurden DNAs bezeichnet, die mindestens ein PCR-Produkt mit einer Länge ≥ 200 bp lieferten. [mCGH = Metaphase-CGH; aCGH = Array-CGH; MPLX = Multiplex-PCR]

	DNA-Menge [μ g] (WGA ≥ 0.5 μ g/ gemessene WGA)	mCGH	aCGH	1CHR-MPLX (MPLX-positive WGA/ analysierte WGA)	qPCR (kompatible WGA/ analysierte WGA)	Mutationsanalyse (Sequenzen/ analysierte WGA)
<i>GenomePlex</i>	35/36 Mittelwert: 9.6 Median: 9.8 Bereich: 0.8 – 18.0	ja	ja	22/51 43 %	11/18 61 %	8/29 28 %
<i>GenomiPhi</i>	31/36 Mittelwert: 2.4 Median: 2.2 Bereich: 1.0 - 4.6	nein	ja	37/51 73 %	16/20 80 %	20/32 63 %

Die gesamtgenomische Amplifikation von Einzelzell-DNA mit dem *GenomePlex*-Kit lieferte im Vergleich zum *GenomiPhi*-Kit eine etwa 4-5fach höhere DNA-Menge von durchschnittlich 9.6 μ g sowie eine niedrigere Ausfallquote (WGA-Produkte < 0.5 μ g DNA; *GenomePlex* 1/36 Zellen, *GenomiPhi* 5/36 Zellen). *GenomePlex*-DNAs waren sowohl für die Analyse mittels mCGH als auch mittels aCGH (s. 3.2.1.1. und 3.2.2.1) einsetzbar. *GenomiPhi*-DNAs hingegen lieferten zwar evaluierbare aCGH-Profile (s. 3.2.2.1), waren jedoch weder direkt noch in aufgereinigter oder aufkonzentrierter Form für die mCGH verwendbar. Durch die erneute Amplifikation von aufgereinigter *GenomiPhi*-DNA mit dem *GenomePlex*-Kit konnte diese schließlich einer mCGH-Analyse zugänglich gemacht werden (s. 3.2.1.1.). In allen durchgeführten PCR-basierten Aufarbeitungen (1CHR-MPLX-PCR, qPCR-Assay, Mutationsanalyse) zeigten *GenomiPhi*-DNAs im Durchschnitt eine um 28% erhöhte Effizienz gegenüber *GenomePlex*-DNAs (s. 3.2.1.1., 3.2.1.2., 3.2.1.3.).

3.2.2. Einzelzellanalyse von CTCs aus dem Blut von Kolorektalkarzinom-patienten

Für die Einzelzellanalyse konnten insgesamt 151 einzelne CTCs aus 13 Patienten durch Mikromanipulation isoliert und für die gesamtgenomische Amplifikation eingesetzt werden (Tab. 3.5.). Unabhängig vom verwendeten WGA-Kit konnte aus 95% der Zellen (144/151) eine für anschließende Analysen erforderliche DNA-Menge von mindestens 0,5 µg erzielt werden. Basierend auf den zuvor beschriebenen Zelllinienexperimenten wurden, sofern nicht anders vermerkt, ausschließlich zur mCGH-Analyse bestimmte Patienten-CTCs mit dem *GenomePlex*-, alle übrigen CTCs hingegen mit dem *GenomiPhi*-WGA-Kit prozessiert. Mit jeder Patienten-CTC-Serie wurden parallel WGA-Positiv- (je 10ng genomischer Zelllinien-DNA-Extrakt) und Negativkontrollen (ohne Zusatz von DNA) mitgeführt.

Tab. 3.5: Übersicht über die Anzahl detektierter, isolierter und erfolgreich mittels WGA prozessierter Patienten-CTCs.

Patienten-ID	<i>CellSearch</i> prozessierte CTCs	Isolierte einzelne CTCs	Verwendetes WGA-Kit	Anteil verwertbare WGA-Produkte (≥0.5µg)
B#6	181	41	beide	39 (95%)
B#9	202	14	beide	14 (100%)
B#18	31	7	beide	6 (86%)
B#22	45	11	<i>GenomePlex</i>	11 (100%)
B#26	101	28	<i>GenomiPhi</i>	28 (100%)
B#38	39	10	<i>GenomiPhi</i>	10 (100%)
C#1	68	9	<i>GenomiPhi</i>	6 (67%)
D#1	35	4	<i>GenomiPhi</i>	4 (100%)
D#2	16	2	<i>GenomiPhi</i>	2 (100%)
D#3	10	3	<i>GenomiPhi</i>	3 (100%)
D#4	42	13	<i>GenomiPhi</i>	13 (100%)
D#5	23	6	<i>GenomiPhi</i>	5 (83%)
D#6	13	3	<i>GenomiPhi</i>	3 (100%)
Gesamt	806	151	-	144 (95%)

3.2.2.1. Detektion von chromosomalen Aberrationen in einzelnen CTCs mittels

Metaphasen- und ArrayCGH (mCGH/aCGH)

Zunächst sollte der maligne Ursprung der durch das *CellSearch*-System aus Patienten-Blut angereicherten und detektierten epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden 3 detektierte Zellen eines Kolorektalkarzinompatienten für eine *GenomePlex*-WGA eingesetzt. Die DNA einer Einzelzelle konnte anschließend mittels mCGH analysiert (Abb. 3.13.) werden. Um ausschließen zu können, dass die detektierten chromosomalen Veränderungen lediglich auf eine unregelmäßige Amplifikation des Einzelzell-Genoms während der WGA-Prozedur zurückzuführen sind, wurde parallel das WGA-Produkt eines einzelnen Leukozyts des Patienten untersucht.

Wie aus Abb. 3.13. ersichtlich, lieferte die amplifizierte Leukozyten-DNA mit Ausnahme des vermutlich unspezifischen Signals in der Zentromerregion des Chromosoms 9 ein balanziertes mCGH-Profil ohne sichtbare DNA-Zugewinne oder -Verluste. Aufgrund des gehäuften Vorkommens repetitiver DNA-Sequenzen, deren unvollständige Suppression zu unspezifischen Bindungen und folglich unspezifischen Fluoreszenzsignalen bei der Hybridisierung führen kann, sind besonders die Zentromer- und Telomerbereiche der Metaphase-Chromosomen anfällig für das Auftreten von unspezifischen Hybridisierungen. Das Profil der Patienten-CTC lässt hingegen, wie für maligne Tumorerkrankungen charakteristisch, verschiedene aberrante DNA-Regionen (Zugewinne: 4pq, 5p, 6q, 13pq; Verluste: 15q, 19q) erkennen.

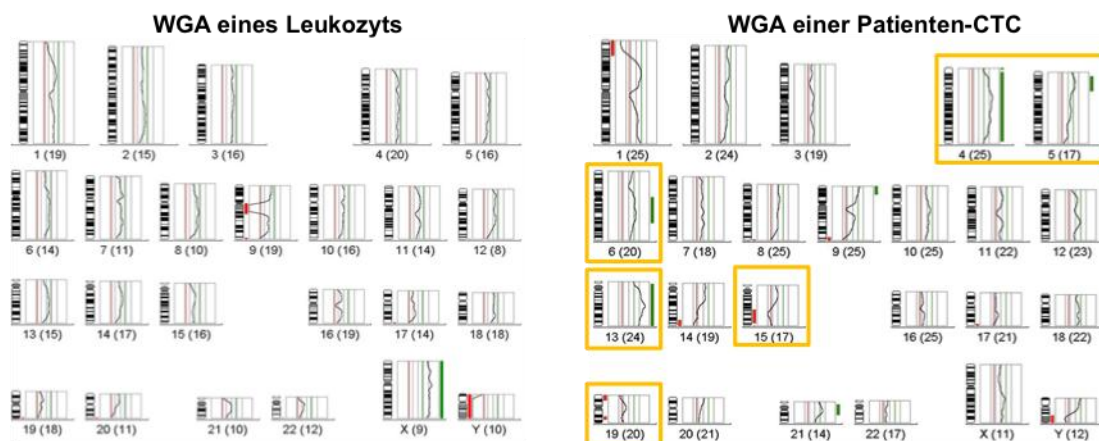


Abb. 3.13.: Gegenüberstellung der mCGH-Profile eines einzelnen Leukozyten und einer mittels *CellSearch*-System detektierten epithelialen Zelle aus einem Kolorektalkarzinompatienten. Chromosomale Aberrationen (gelbe Boxen) sind in grün (DNA-Zugewinne) bzw. rot (DNA-Verluste) dargestellt.

Weiterführende Untersuchungen von Patienten-CTCs wurden mit Hilfe von *array*-CGH- (aCGH)-Analysen (s. 2.2.4.9.2.) durchgeführt, für die sowohl *GenomePlex*- als auch *GenomiPhi*-DNAs eingesetzt wurden.

Im Gegensatz zur mCGH erfolgt die Hybridisierung der markierten Proben- und Referenz-DNA bei der aCGH auf DNA-Fragmente, welche das Gesamtgenom repräsentieren und immobilisiert in Form eines Rasters vorliegen. Dadurch können Aberrationen in einer weitaus höheren Auflösung ($\geq 100\text{-}200\text{ kb}$) als mit der klassischen CGH ($\geq 2\text{-}10\text{ Mb}$) detektiert werden. Die resultierenden Fluoreszenzsignale werden mit Hilfe eines Scanners erfasst, und durch eine Auswertungssoftware wird das zur Basis 2 logarithmierte Verhältnis der Signalintensitäten (Log2-Ratio) ermittelt. In Abhängigkeit von der Stärke vorhandener Hintergrundsignale wurden chromosomale Bereiche mit einer Log2 Ratio von ≥ 0.3 bis 0.5 als Zugewinne, mit einer Log2 Ratio ≤ -0.3 bis -0.5 als Verluste definiert.

Um in CTCs gehäuft auftretende chromosomale Veränderungen zu identifizieren und die spezifischen Zugewinnen/Verlusten in den einzelnen CTCs eines Patienten zu untersuchen, wurden mit den WGA-Produkten von 32 CTCs aus 5 Kolorektalkarzinompatienten (B#6, B#9, B#18, B#22, B#26, C#1) aCGHs durchgeführt. Während 11 CTCs lediglich ein artefaktreiches, nicht eindeutig auswertbares Profil lieferten (Patient B#6: 6/12 Profile; B#9: 1/4; B#22: 2/4; B#26: 2/11), waren in 19 CTCs deutliche chromosomale Veränderungen erkennbar (B#6: 4/12; B#9: 3/4; B#22: 2/4; B#26: 9/11; C#1: 1/1). Neben diesen aberranten CGH-Profilen wurden für 2 CTCs aus Patient B#6 auch balanzierte CGH-Profile erhalten, welche den malignen Charakter der entsprechenden Zellen in Frage stellen.

Das in Abb. 3.14. exemplarisch dargestellte CGH-Profil einer einzelnen CTC des Patienten C#1 lässt zahlreiche, u.a. auch für kolorektale Primärtumoren typische genomische Aberrationen (Zugewinne: 7pq, 20q, 8q, Verluste: 8p) erkennen. Durch die zusammenfassende Betrachtung der 19 aberranten Profile (s. Anhang IV, Abb. 3.14. und 3.15) konnten folgende, gehäuft in CTCs auftretende Aberrationen identifiziert werden: Zugewinne von 7pq, 8q, 12pq, 13pq, 20pq, sowie Verluste von 1p, 3p, 4pq, 5q, 8p, 14pq, 18pq, 21pq, 22pq (detektiert in ≥ 10 CTC und ≥ 3 Patienten).

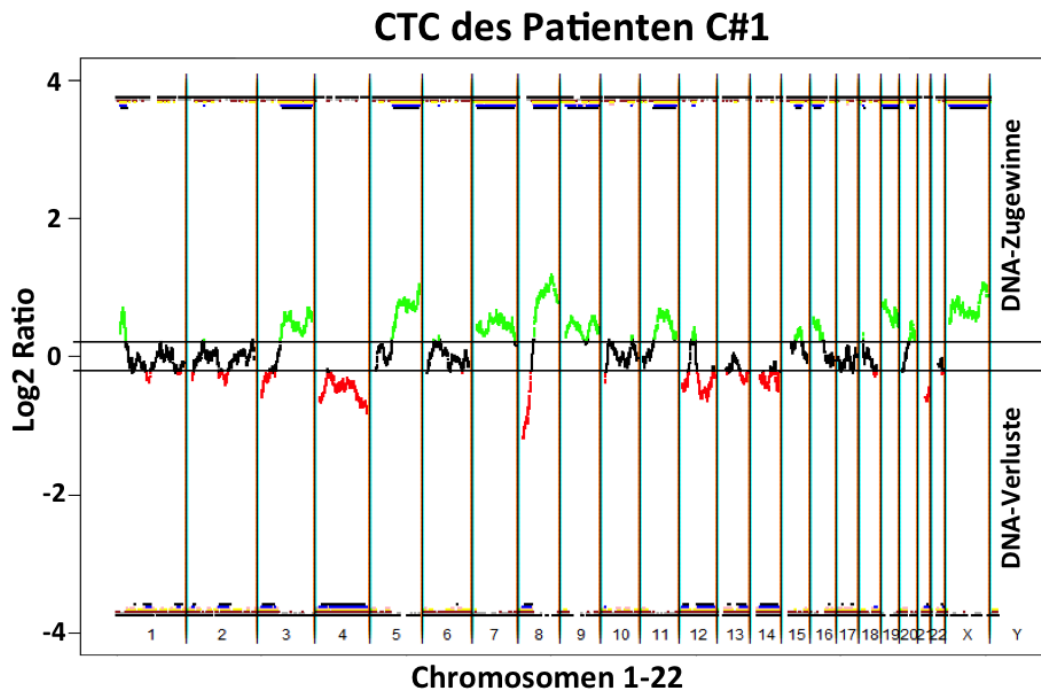


Abb. 3.14.: aCGH-Profil einer Einzel-CTC des Patienten C#1. DNA-Zugewinne mit einer Log2-Ratio ≥ 0.3 sind in grün, DNA-Verluste mit einer Log2-Ratio ≤ -0.3 in rot dargestellt. DNA-Bereiche des Y-Chromosoms sind auf der verwendeten Array-Plattform nicht berücksichtigt.

Die Gegenüberstellung der aberranten Profile mehrerer aus einem Patienten stammenden CTCs [4 CTCs des Patienten B#6, 3 CTCs des Patienten B#9, 2 CTCs des Patienten B#22 (s. Anhang IV) sowie 9 CTCs der Patientin B#26 (Abb. 3.15.)] zeigte sowohl übereinstimmende als auch voneinander abweichende Aberrationen innerhalb der analysierten CTC-Population.

Zur Veranschaulichung sind in Abb. 3.15. die Profile von 9 analysierten CTCs der Patientin B#26 dargestellt. Während einige chromosomale Veränderungen in allen 9 Zellen nachgewiesen wurden (Zugewinn von 7pq, 13pq und 20pq), waren auch zahlreiche, ausschließlich in einer einzigen Zelle vorkommende Aberrationen (z.B. der Verlust von 2pq in CTC #28, von 10pq in CTC #25 und 15pq in CTC #26) zu beobachten. Insgesamt war eine relativ starke Heterogenität von DNA-Zugewinnen und -Verlusten in der CTC-Population zu verzeichnen.

CTCs der Patientin Graz #26

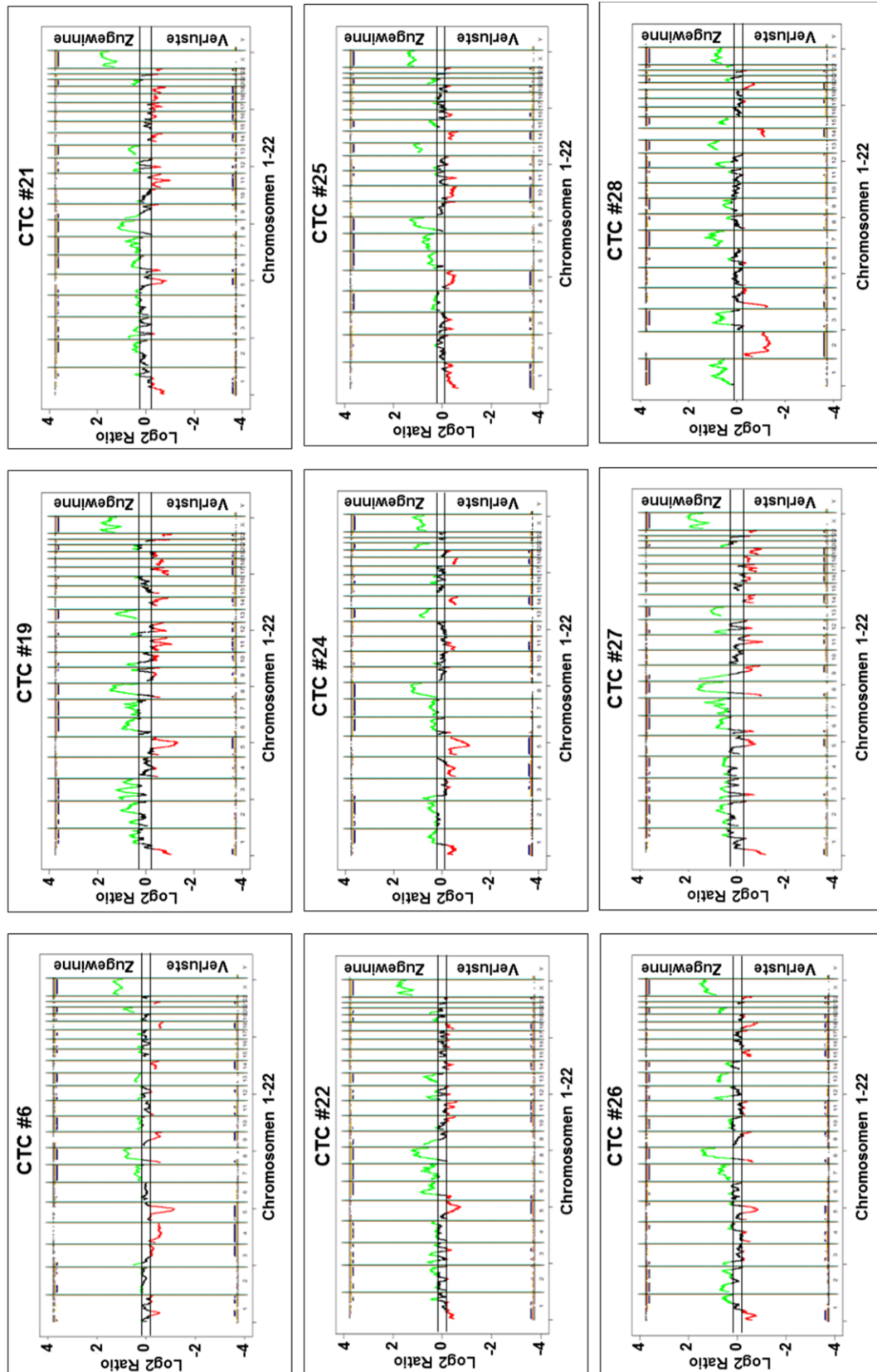


Abb. 3.15.: aCGH-Profile der WGA-Produkte von 9 einzelnen CTCs der Patientin B#26. DNA-Zugewinne ($\text{Log}_2\text{-Ratio} \geq 0.3$) sind in grün, DNA-Verluste ($\text{Log}_2\text{-Ratio} \leq -0.3$) in rot visualisiert.

3.2.2.2. Identifikation von Genamplifikationen in einzelnen CTCs mittels qPCR

Während die CGH-Analyse einen Überblick über genetische Aberrationen in den einzelnen Patienten-CTCs lieferte, sollte durch verschiedene qPCR-Assays (s. 2.2.4.5.2.) der Amplifikationsstatus ausgesuchter Genregionen bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein die zu analysierende Zielsequenz flankierendes Primerpaar parallel mit den LINE1-Referenzprimern (s. Anhang III, [34]) für eine qPCR eingesetzt. Aus dem Quotient der ermittelten DNA-Mengen des Ziel- und Referenzgens in der Ausgangsprobe konnte die Amplifikationsrate des Zielgens in den einzelnen CTCs ermittelt werden (s. 2.2.4.5.2.). Basierend auf den Ergebnissen der qPCR-Optimierungsversuche (s. 3.2.1.2.) wurden Zellen mit einer Amplifikationsrate ≥ 1.5 als amplifiziert klassifiziert.

Für die Analyse der einzelnen CTCs mittels qPCR wurden folgende, in kolorektalen Primärtumoren häufig überexprimierte Gene selektiert: *EGFR*, *LGR5*, *AURKA*, *C-MYC* (s. 1.2.4.2.).

3.2.2.2.1. EGFR-Amplifikationsstatus von CTCs

Für die Analyse des Amplifikationsstatus des *EGFR*-Gens (Primer: *EGFR_E8*, Anhang III) wurden insgesamt 135 WGA-Produkte einzelner CTCs aus 13 verschiedenen Kolorektalkarzinompatienten eingesetzt (Tab. 3.6.). Von den 42 CTCs (7 Patienten), für die eine Auswertung der qPCR möglich war, zeigten 60% einen Zugewinn der analysierten *EGFR*-Region (Amplifikationsrate: 1.71-108.1). In allen untersuchten Patienten konnte mindestens eine *EGFR*-amplifizierte Zelle nachgewiesen werden. In den Patienten B#6, B#9 und B#26 wurden zusätzlich CTCs ohne *EGFR*-Amplifikation gefunden. Basierend auf dem Mittelwert der Amplifikationsraten der einzelnen CTCs war lediglich der Patient B#6 nicht als *EGFR*-amplifiziert einzustufen.

Tab. 3.6.: Übersicht der Amplifikationsrate (AR) des *EGFR*-Gens einzelner CTCs verschiedener Darmkrebspatienten 17 CTCs von B#6, 2 CTCs von B#18 und alle CTCs von B#22 wurden mit dem *GenomePlex*-Kit amplifiziert.

Patienten-ID	Analysierte CTCs	Auswertbare qPCR-Signale	Nicht amplifiziert (AR < 1.5)	Ampliziert (AR ≥ 1.5)	Bereich der AR	Mittelwert der AR
B#6	38	6	5	1	0.2-1.8	1.0
B#9	13	5	2	3	0.7-10.3	3.3
B#18	4	0	-	-	-	-
B#22	9	0	-	-	-	-
B#26	28	17	10	7	0.1-14.5	3.0
B#38	10	4	0	4	10.4-15.2	12.8
C#1	4	0	-	-	-	-
D#1	4	2	0	2	3.3-4.0	3.7
D#2	2	0	-	-	-	-
D#3	2	0	-	-	-	-
D#4	13	6	0	6	6.8-108.1	30.9
D#5	5	0	-	-	-	-
D#6	3	2	0	2	3.5-18.9	11.2
Gesamt	135	42	17	25	-	-

3.2.2.2.2. AURKA-Amplifikationsstatus von CTCs

Die Bestimmung des Amplifikationsstatus des *AURKA*-Gens von insgesamt 136 Einzelzellen aus 13 Patienten wurde unter Verwendung der Primer *AURKA_F* und *AURKA_R* durchgeführt. Wie Tab. 3.7. zu entnehmen ist, konnten mit 51/136 Einzelzell-DNAs von 10 Patienten auswertbare qPCR-Signale erhalten werden. Eine Amplifikation der analysierten Zielsequenz (Amplifikationsrate: 1.7-32.8) konnte in 45% der CTCs beobachtet werden. In 8/10 Patienten konnte mindestens eine *AURKA*-amplifizierte CTC detektiert werden. Anhand der gemittelten Amplifikationsraten konnten jedoch nur 6 Patienten als *AURKA*-amplifiziert identifiziert werden.

Tab. 3.7.: Übersicht der Amplifikationsrate (AR) des *AURKA*-Gens einzelner CTCs verschiedener Darmkrebspatienten. 17 CTCs von B#6, 2 CTCs von B#18 und alle CTCs von B#22 wurden mit dem *GenomePlex*-Kit amplifiziert.

Patienten-ID	Analysierte CTCs	Auswertbare qPCR-Signale	Nicht amplifiziert (AR < 1.5)	Ampliziert (AR ≥ 1.5)	Bereich der AR	Mittelwert der AR
B#6	38	9	8	1	0.1-1.9	0.8
B#9	13	7	3	4	0.2-32.8	7.6
B#18	6	3	2	1	0.2-2.7	1.1
B#22	9	0	-	-	-	-
B#26	28	16	9	7	0.1-7.3	1.6
B#38	10	6	1	5	0.3-15.3	6.3
C#1	4	0	-	-	-	-
D#1	3	2	0	2	3.9-4.5	4.2
D#2	2	1	-	1	4.0	4.0
D#3	2	0	-	-	-	-
D#4	13	4	2	2	0.4-8.4	3.4
D#5	5	1	1	0	1.4	1.4
D#6	3	2	2	0	0.7-1.3	1.0
Gesamt	136	51	28	23	-	-

3.2.2.2.3. C-MYC-Amplifikationsstatus von CTCs

Insgesamt 135 CTCs aus 13 Patienten wurden zudem einer qPCR mit den Zielsequenzprimern C-MYC_E2 (s. Anhang III) unterzogen. Von den 42 evaluierbaren CTCs aus 9 Patienten konnte in 69% eine Amplifikation (Amplifikationsrate: 1.52-36.3) des *C-MYC*-Genbereiches ermittelt werden (Tab. 3.8.). Mindestens eine *C-MYC*-amplifizierte Zelle war in 8 der 9 Patienten nachweisbar. Unter Berücksichtigung der gemittelten Amplifikationsraten der Einzelzellen konnten 7 Patienten als *C-MYC*-amplifiziert klassifiziert werden.

Tab. 3.8.: Übersicht der Amplifikationsrate (AR) des *C-MYC*-Gens einzelner CTCs verschiedener Darmkrebspatienten. 17 CTCs von B#6, 2 CTCs von B#18 und alle CTCs von B#22 wurden mit dem *GenomePlex*-Kit amplifiziert.

Patienten-ID	Analysierte CTCs	Auswertbare qPCR-Signale	Nicht amplifiziert (AR < 1.5)	Amplifiziert (AR ≥ 1.5)	Bereich der AR	Mittelwert der AR
B#6	36	9	4	5	0.1-18.8	3.7
B#9	13	3	0	3	1.9-9.1	4.7
B#18	6	3	2	1	0.2-2.1	1.1
B#22	9	0	-	-	-	-
B#26	28	12	6	6	0.6-4.7	2.2
B#38	10	5	0	5	2.1-26.9	11.4
C#1	4	0	-	-	-	-
D#1	4	1	0	1	3.6	3.6
D#2	2	0	-	-	-	-
D#3	2	0	-	-	-	-
D#4	13	6	0	6	2.2-36.3	12.6
D#5	5	1	1	0	1.3	1.3
D#6	3	2	0	2	2.0-2.8	2
Gesamt	135	42	13	29	-	-

3.2.2.2.4. *LGR5*-Amplifikationsstatus von CTCs

Für die Untersuchung der Amplifikationsrate des *LGR5*-Gens wurden 136 CTCs aus 13 Patienten eingesetzt. Der qPCR-Assay wurde unter Verwendung der Primer *LGR5_E1* (s. Anhang III) durchgeführt. Hierbei konnten mit 44 WGA-Produkten einzelner CTCs (10 Patienten) evaluierbare CT-Werte erzielt und eine *LGR5*-Amplifikation (AR: 1.53-18.1) in 61% dieser CTCs detektiert werden (Tab. 3.9.). Anhand der gemittelten Amplifikationsraten einzelner CTCs eines Patienten konnte die CTC-Population von 8 von 10 untersuchten Patienten als *LGR5*-amplifiziert eingestuft werden.

Tab. 3.9.: Übersicht der Amplifikationsrate (AR) des *LGR5*-Gens einzelner CTCs verschiedener Darmkrebspatienten. 17 CTCs von B#6, 2 CTCs von B#18 und alle CTCs von B#22 wurden mit dem *GenomePlex*-Kit amplifiziert.

Patienten-ID	Analysierte CTCs	Auswertbare qPCR-Signale	Nicht amplifiziert (AR < 1.5)	Amplifiziert (AR ≥ 1.5)	Bereich der AR	Mittelwert der AR
B#6	38	9	2	7	0.7-9.4	2.9
B#9	13	7	2	5	0.1-22.5	5.5
B#18	6	2	2	0	0.3-0.6	0.5
B#22	9	0	-	-	-	-
B#26	28	10	6	4	0.3-3.8	2.3
B#38	10	5	1	4	0.5-13.2	5.2
C#1	4	0	-	-	-	-
D#1	3	1	1	0	0.6	0.6
D#2	2	1	0	1	2.9	2.9
D#3	2	0	-	-	-	-
D#4	13	6	3	3	0.5-6.4	2.2
D#5	5	1	0	1	18.1	18.1
D#6	3	2	0	2	1.8-1.9	1.9
Gesamt	136	44	17	27	-	-

3.2.2.2.5. Zusammenfassung detektierter Genamplifikationen in Patienten-CTCs

Tab. 3.10. gibt eine Übersicht über die Detektionsraten der vier analysierten Zielgene *EGFR*, *AURKA*, *C-MYC* und *LGR5*. Eine Amplifikation des *C-MYC*-Gens war mit 69% am häufigsten im untersuchten CTC-Kollektiv zu beobachten. Der *AURKA*-Lokus lag hingegen lediglich in 45% der CTCs amplifiziert vor. Insgesamt konnte für alle vier Zielgene eine deutliche Heterogenität des Amplifikationsstatus einzelner CTCs eines Patienten festgestellt werden.

Tab. 3.10.: Übersicht detektierter Amplifikationen des *EGFR*-, *LGR5*-, *AURKA*- bzw. *C-MYC*-Gens.

*	<i>EGFR</i> n = 135 CTCs 13 Patienten	<i>AURKA</i> n = 136 CTCs 13 Patienten	<i>C-MYC</i> n = 135 CTCs 13 Patienten	<i>LGR5</i> n = 136 CTCs 13 Patienten
Auswertbare qPCR-Signale	42 CTCs (31%) 7 Patienten	51 CTCs (37%) 10 Patienten	42 CTCs (31%) 9 Patient	44 CTCs (32%) 10 Patienten
Amplifikation (AR ≥ 1.5)	25 CTCs (60%) 7 Patienten	23 CTCs (45%) 8 Patienten	29 CTCs (69%) 8 Patienten	27 CTCs (61%) 8 Patienten

3.2.2.3. Mutationsanalyse von einzelnen CTC

Weiterhin erfolgte eine Mutationsanalyse einzelner Patienten-CTCs in verschiedenen *Hot Spot*-Regionen des *p53*-, *KRAS*-, *BRAF*- und *PIK3CA*-Gens. Das im Kolorektalkarzinom am häufigsten mutierte Gen *APC* wurde aufgrund seiner geringen klinischen Relevanz und dem Fehlen spezifischer Regionen mit erhöhter Mutationsfrequenz (*Hot Spot*-Regionen) in den nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Die untersuchten Genbereiche sind in Abb. 3.16. dargestellt.

Insgesamt wurden 8 verschiedene Primerpaare eingesetzt: *p53*_C175, *p53*_E7 und *p53*_E8/9, *KRAS*_C12/12 und *KRAS*_61, *BRAF*_C600, *PIK3CA*_C542-546 und *PIK3CA*_C1047 (s. Anhang III).

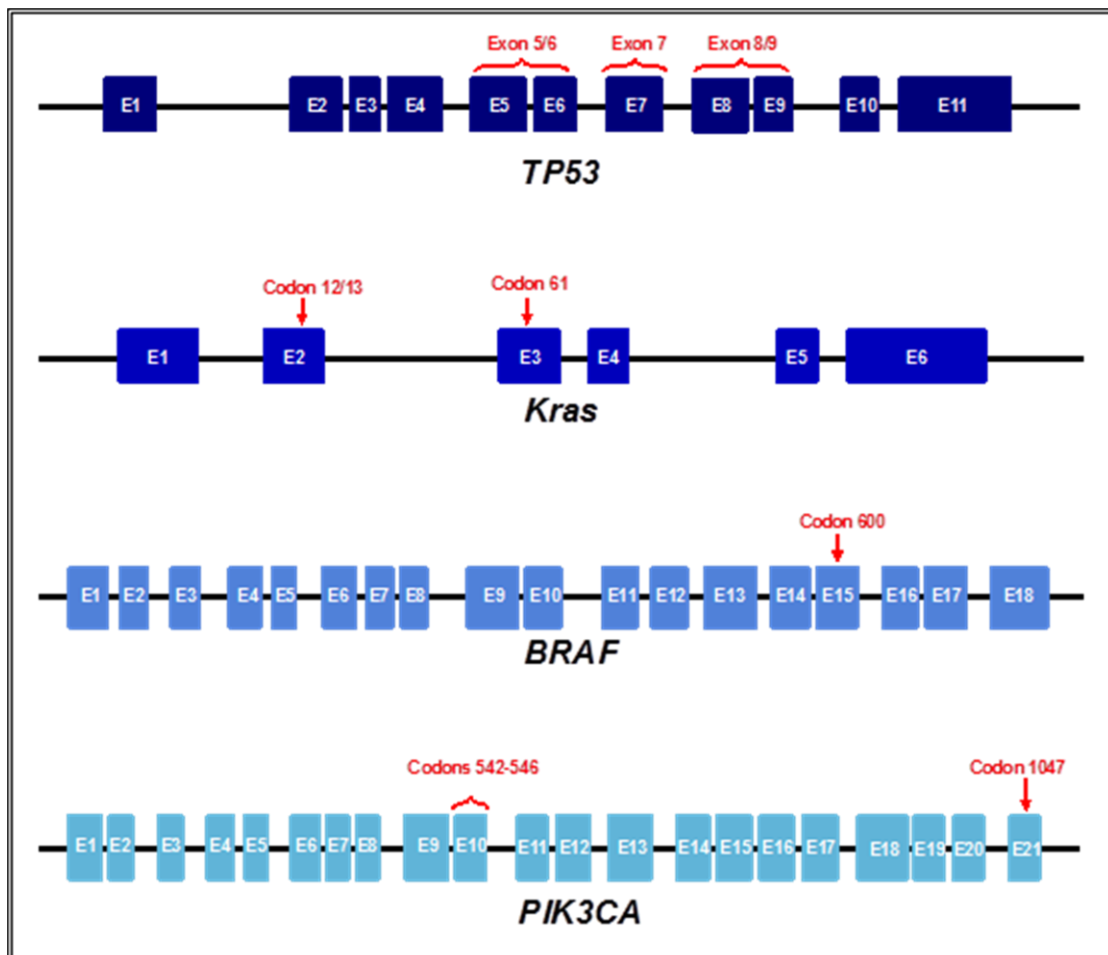


Abb. 3.16.: Übersicht der im Rahmen der Mutationsanalyse untersuchten Gene und *Hot Spot* Regionen. Die Exonbereiche (E1 bis EX) der 4 Gene sind in Form einzelner Boxen dargestellt. Die analysierten Hot-Spot-Regionen sind in rot hervorgehoben.

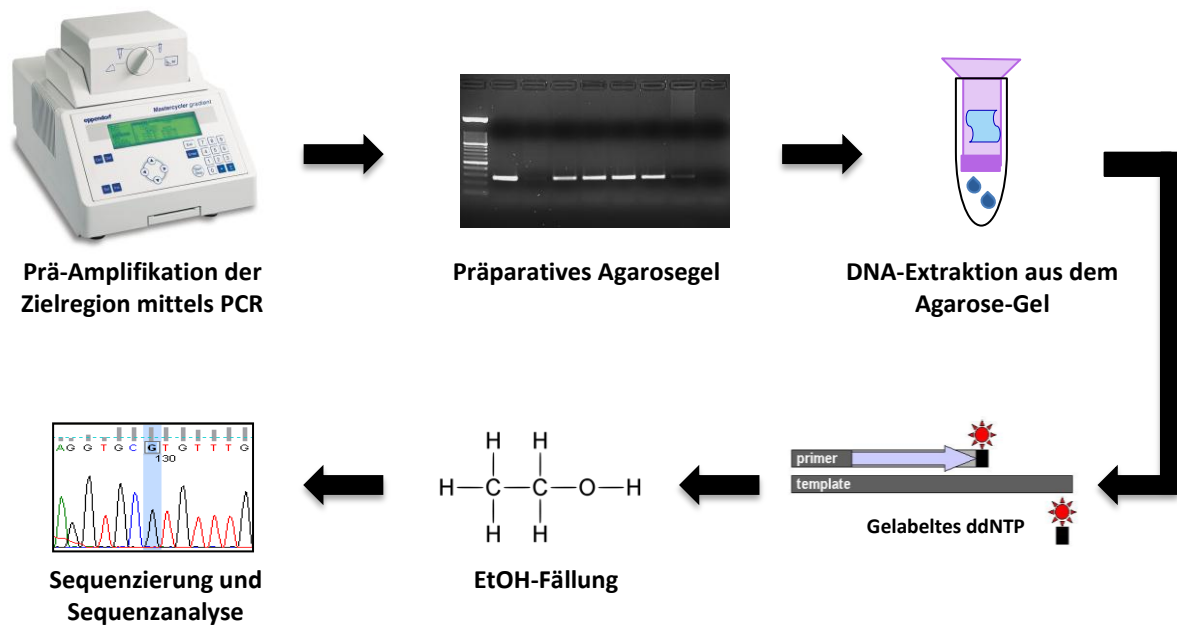


Abb.3.17.: Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte zur Mutationsanalyse von Einzelzell-DNA.

Eine schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Analyse von Einzelzell-DNA in den 8 *Hot Spot* Regionen der 4 Zielgene ist in Abb. 3.17 aufgeführt. Nach einer Prä-Amplifikation der zu sequenzierenden Zielregion erfolgte eine Aufreinigung des Amplifikats in einem präparativen Agarosegels. Das resultierende Amplifikat wurde für eine *BigDye* Markierungs-Reaktion eingesetzt, gefällt und sequenziert.

Für die Mutationsanalyse wurden insgesamt 141 CTCs aus 13 Kolorektalkarzinom-patienten eingesetzt. Die beiden DNA-Regionen des *PIK3CA*-Gens konnten aufgrund geringer DNA-Mengen von 2 CTCs lediglich in 139 CTCs untersucht werden. Außerdem mussten 17 CTCs des Patienten B#6 aufgrund einer Kontamination der Negativkontrolle für die Zielregionen P53_C175, P53_E7, P53_E8/9 sowie BRAF_C600 von der Analyse ausgeschlossen werden.

Zur Veranschaulichung der Resultate und Interpretation der Mutationsanalyse einzelner CTCs zeigt Abb. 3.18. exemplarisch eine detaillierte Übersicht der Untersuchung von 38 Einzelzellen des Patienten B#6. Die ausführlichen Darstellungen der Ergebnisse aller CTCs sind dem Anhang V zu entnehmen.

ERGEBNISSE

Sequenzen	Prä-Amplifikate	Analysierte Zielregionen	PIK3CA_2	PIK3CA_1	BRAF	KRAS_2	KRAS_1	P53_3	P53_2	P53_1	CTC
1/2	2/8	8/8			WT						20
0/1	1/8	8/8									21
1/7	1/7	7/8	WT								22*
0/1	1/7	7/8									23*
2/2	2/7	7/8		542 E→K			12 G→V				24*
-	0/7	7/8									25*
1/1	1/7	7/8									26*
1/1	0/7	7/8									27*
2/3	3/7	7/8				WT	12 G→V				28*
1/1	1/7	7/8									29*
1/1	1/7	7/8									30*
5/6	6/7	7/8	WT	545 E→A		WT					31*
3/3	3/7	7/8	WT	545 E→A							32*
1/1	1/7	7/8									33*
1/1	1/7	7/8									34*
3/3	3/7	7/8					12 G→V				35*
0/1	1/7	7/8									36*
3/4	4/7	7/8		545 E→A			12 G→V				37*
4/4	4/7	7/8				WT	WT				38*

Sequenzen	Prä-Amplifikate	Analysierte Zielregionen	PIK3CA_2	PIK3CA_1	BRAF	KRAS_2	KRAS_1	P53_3	P53_2	P53_1	CTC
7/7	7/8	8/8	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT		1
-	0/8	8/8									2
7/8	8/8	8/8	WT	WT	WT						3
8/8	8/8	8/8	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT		4
-	0/8	8/8									5
-	0/8	8/8									6
8/8	8/8	8/8	WT	542 E→K	WT	WT	12 G→V	WT	WT		7
5/7	7/8	8/8		545 E→A	WT		WT		WT		8
8/8	8/8	8/8	WT	545 E→A	WT	WT	WT	WT	WT		9
-	0/8	8/8									10
1/1	1/8	8/8							WT		11
7/8	8/8	8/8	WT	WT	WT	WT			WT		12
8/8	8/8	8/8	WT	542 E→K	WT	WT	12 G→V	273 R→C	WT		13
7/8	8/8	8/8	WT		WT	WT	12 G→V	273 R→C	WT		14
6/6	6/8	8/8	WT	WT		WT			WT		15
2/2	2/8	8/8			WT	WT					16
6/7	7/8	8/8	WT	545 E→A			WT	WT	WT		17
0/1	1/8	8/8									18
8/8	8/8	8/8	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT		19

Abb. 3.18.: Mutationsanalyse von 38 CTCs des Patienten B#6. Mutationsanalyse der 8 Hot-Spot-Regionen des P53, KRAS, BRAF und PIK3CA-Gens aufgeführt. [schwarz: Sequenzbereich für diese CTC wurde nicht analysiert; grau: kein Prä-Amplifikat oder keine auswertbare Sequenz der Zielregion erhalten; gelb/WT: Wildtyp der Zielregion; orange: Mutations- und Wildtyp-Peak im angegebenen Codon vorhanden; rot: nur Mutationspeak im angegebenen Codon vorhanden]. * : *GenomePlex*-WGA-Kit prozessierte CTC.

Insgesamt konnten in 12 CTCs des Patienten B#6 Mutationen im *P53*- (Codon 273 R→C, 2CTC), *KRAS*- (Codon 12 G→C, 7 CTC) und/oder *PIK3CA*-Gen (Codon542 E→K oder Codon 545 E→A, 9 CTC) identifiziert werden. Bei den *P53*²⁷³-Mutationen (CTC #13 und #14) war ausschließlich der Mutations-Peak zu verzeichnen. Alle *PIK3CA*⁵⁴²-mutierten CTCs (CTC #7, #13, #24) hingegen zeigten neben dem Mutations-Peak auch den Wildtyp-Peak im Codon 542. In den detektierten *PIK3CA*⁵⁴⁵- und *KRAS*¹²-mutierten Zellen waren sowohl CTCs mit dem Mutations-Peak allein als auch CTCs mit dem Mutations- und Wildtyp-Peak zu beobachten (*KRAS*¹²: MUT = CTC #13, #24, MUT/WT= CTC #7, #14, #28, #35, #37; *PIK3CA*⁵⁴⁵: MUT = CTC #8, #9, #17, #32 und #37, MUT/WT = CTC #31). Neben diesen mutierten Zellen traten auch zahlreiche Zellen mit einer Wildtyp-Form dieser Sequenzbereiche auf (*P53*²⁷³: MUT= 2, WT = 7; *KRAS*¹²: MUT = 7, WT = 12; *PIK3CA*^{542/545}: MUT = 9, WT = 6). Interessanterweise konnte eine *PIK3CA*^{542/545}-Mutation sowohl in allen *KRAS*¹²-mutierten CTCs (CTC #7, #13, #24, #37) als auch in *KRAS*¹²-WT-Zellen (CTC #8, #9, #17, #31, #32) gefunden werden. Insgesamt zeigte sich eine starke Heterogenität bezüglich des *P53*²⁷³, *KRAS*¹²- und *PIK3CA*^{542/545}-Genstatus zwischen den einzelnen CTCs des Patienten B#6.

Wie die Abb. 3.18. illustriert, ist die vollständige Untersuchung aller Zielregionen eines Gens aufgrund von Ausfällen bei der Prä-Amplifikation oder Sequenzierung häufig nicht möglich. Zellen, für die mindestens in einer von mehreren untersuchten *Hot Spot* -Regionen (*P53*, *KRAS*, *PIK3CA*) eine Mutation detektiert werden konnte, werden im Folgenden als mutiert bezeichnet (z.B. CTCs des Patienten B#6: *P53*-mutiert: #13 und #14, *KRAS*-mutiert: #7, #13, #14, #24, #28, #35, #37, *PIK3CA*-mutiert: #7, #8, #9, #13, #17, #24, #31, #32, #37). Von einem intakten, in der Wildtyp-Form vorliegenden Gen wird gesprochen, wenn mindestens eine der analysierten *Hot Spot*-Regionen erfolgreich sequenziert und als nicht-mutiert identifiziert werden konnte (z.B. CTCs des Patienten B#6: *P53*-WT: #1, #3, #4, #7, #8, #9, #11, #12, #15, #17, #19).

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Mutationsanalyse von insgesamt 141 CTCs aus 13 Kolorektalkarzinompatienten ist Tab. 3.11. zu entnehmen.

Tab. 3.11.: Übersicht der Mutationsanalyse einzelner CTCs verschiedener Kolorektalkarzinompatienten. 17 CTCs von B#6, 2 CTCs von B#18 und alle CTCs von B#22 wurden mit dem *GenomePlex*-WGA-Kit amplifiziert. [WT : Wildtyp; MUT: Mutation; n.a. : nicht analysiert/keine auswertbare Sequenz erhalten].

Patienten-ID	Anzahl CTCs	<i>P53</i>			<i>KRAS</i>			<i>BRAF</i>			<i>PIK3CA</i>		
		WT	MUT	n.a.	WT	MUT	n.a.	WT	MUT	n.a.	WT	MUT	n.a.
B#6	38	18	2	18	13	7	18	14	-	24	8	9	21
B#9	14	10	-	4	9	-	5	9	-	5	6	1	7
B#18	6	5	-	1	5	-	1	1	-	5	4	1	1
B#22	11	9	2	-	7	-	4	2	-	9	4	-	7
B#26	28	7	15	6	21	-	7	20	-	8	20	3	5
B#38	10	6	-	4	5	-	5	4	-	6	5	3	2
C#1	4	-	-	4	1	-	3	-	1	3	1	2	1
D#1	4	4	-	-	4	-	-	4	-	-	4	-	-
D#2	2	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
D#3	3	2	-	1	2	1	-	1	-	2	-	1	2
D#4	13	2	4	7	7	-	6	7	-	6	6	-	7
D#5	5	3	-	2	3	-	2	2	-	3	2	1	2
D#6	3	2	-	1	2	-	1	2	-	1	2	-	1
Gesamt	141	70	23	48	81	8	52	68	1	72	64	21	56

Lediglich in einer der 141 analysierten Patientenzellen konnte eine Mutation im *BRAF*⁶⁰⁰-Gen (Codon 600 V→E, nur MUT-Peak) nachgewiesen werden (Patient C#1, CTC #1). Mutationen im *KRAS*-Lokus konnten in 8, im *P53*-Gen in 23 und im *PIK3CA*-Gen in 21 CTCs gefunden werden. Eine detaillierte Übersicht über die Mutationsanalyse der einzelnen Zellen ist im Anhang V gegeben.

Die am häufigsten detektierte genetische Veränderung stellte die *PIK3CA*-Mutation des Codons 545 (E→A) dar, welche in CTCs von 8 /13 (62%) Patienten (B#6, B#9, B#18, B#26, B#38, C#1, D#3, D#5) zu beobachten war. Beim Patienten B#6 waren sowohl CTCs mit einer *PIK3CA* im Codon 545 (CTCs #8, # 9, #17, #31, #32, #37) als auch CTCs mit einer Mutation im Codon 542 (E→K) zu verzeichnen (CTCs # 7, #13, #24).

P53-Mutation in vier verschiedenen Codons (R273C, R280K, R282W, R289K) wurden in den CTCs von 4/13 (31%) Patienten. In den Patienten B#6 (R273C), B#22 (R280K) und B#26 (R282W) wurden ausschließlich Mutationen (MUT-Peak und MUT/WT-Peak) in jeweils einem spezifischen Codon nachgewiesen. Der Patient D#4 zeigten hingegen in drei CTCs eine Mutation im Codon 273 (CTC #5, #8, #10) sowie in einer Einzelzelle eine Mutation in Codon 289 (CTC #4).

Eine Mutation des *KRAS*-Gens im Codon 12 (G→V) war lediglich in 2/13 (15%) Patienten zu beobachten (MUT- Peak und MUT/WT-Peak).

Mit Ausnahme der einzelnen *BRAF*⁶⁰⁰-mutierten CTC des Patienten C#1 und *PIK3CA*⁵⁴⁵-mutierten Zelle des Patienten D#3 wurden in allen anderen Patienten neben mutierten CTCs auch CTCs mit der Wildtyp-Form des entsprechenden Gens detektiert.

Insgesamt war in 3 Patienten [D#1 (4 CTC), D#2 (2 CTC) und D#6 (3 CTC)] in keiner der analysierten *Hot Spot*-Regionen eine Veränderung nachweisbar. Da für diese Zellen auch keine CGH-Profile vorliegen, ist bezüglich ihres malignen Charakters keine verlässliche Aussage möglich.

3.3. Etablierung eines Zytotoxizitätstests mit Hilfe des CK19-EPISPOT-Assays

Da mit Hilfe der EPISPOT-Technik ausschließlich intakte, lebensfähige Tumorzellen im Blut von Krebspatienten nachgewiesen werden, sollte ein CK19(Keratin 19)-EPISPOT-Assay zur Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika auf diese CTCs entwickelt werden.

Nach der Etablierung und Optimierung des CK19-EPISPOT-Assays unter Verwendung der kolorektalen Tumorzelllinie HT29 wurde die Auswirkung verschiedener Zytostatika auf die CK19-Immunospots untersucht. Als Positivkontrolle für den Zytotoxizitäts-Assay wurde ein Oxaliplatin-resistenter HT29-Subklon selektioniert und parallel eingesetzt.

3.3.1. Etablierung und Optimierung des CK19-EPISPOT-Assay

3.3.1.1. Bestimmung der Wiederfindungsrate von CK19-sekretierenden Tumorzellen

Zur Validierung des CK19-EPISPOT-Assays wurden zunächst Spiking-Experimente mit der kolorektalen Zelllinie HT29 durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Zellzahlen (50, 100, 200, 1000 Zellen) in Blut eines gesunden Spenders gegeben, mit Hilfe des *RosetteSep*-Antikörpercocktails aus dem Blut angereichert und CK19-sekretierende Zellen mit dem EPISPOT-Assay als Immunospot visualisiert. Um den Einfluss des Blutvolumens auf die Wiederfindungsrate von CK19-sekretierenden Zellen zu untersuchen, wurden außerdem verschiedene Blutvolumina (2 mL und 10 mL) verwendet.

Da unbekannt ist, wie groß der Anteil an aktiv CK19-sekretierenden Zellen der HT29-Zellen ist, wurde parallel zur angereicherten Zellfraktion die entsprechende Anzahl HT29-Zellen direkt auf die EPISPOT-Membran transferiert (Kontrollzellen) und analysiert. Eine CK19-Sekretion konnte in etwa 35-60% aller HT29-Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abb. 19.A). Die Wiederfindungsraten der zugeführten HT29-Zellen konnten unter Berücksichtigung der Immunospotzahl in der Kontrolle ermittelt werden. Die Verwendung eines kleineren Blutvolumens von 2 mL lieferte höhere Wiederfindungsraten (100% von 1000 Zellen; 79% von 100 Zellen) als die

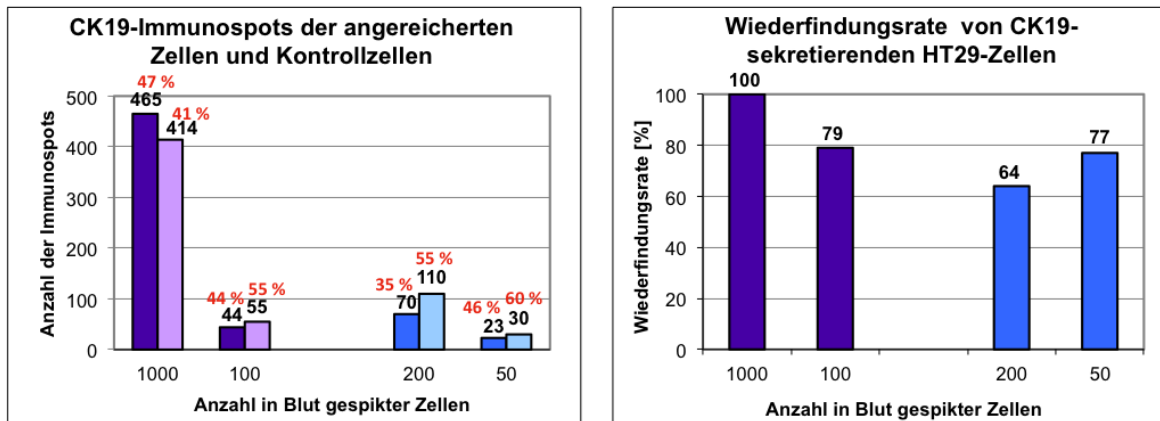


Abb. 3.19.: CK19-EPISPOT-Ergebnisse von Spiking-Experimenten mit HT29-Zellen. Es wurde sowohl ein Blutvolumen von 2 mL [lila Balken] als auch von 10 mL [blaue Balken] mit verschiedenen Zellzahlen versetzt. (A) Anzahl der detektierten CK19-Immunospots in den angereicherten Zellfraktionen [dunkellila/dunkelblau] und den entsprechenden Kontrollansätzen [helllila/hellblau]. Der prozentuale Anteil CK19-sekretierender HT29-Zellen ist in rot dargestellt. (B) Aus der Spot-Anzahl der angereicherten Zellen und ihrer Kontrollen ermittelte Wiederfindungsraten.

Anreicherung aus 10 mL Blut (64% von 200 Zellen; 77% von 50 Zellen, Abb. 3.19.B). Im Vergleich zum Ansatz mit 1000 zugeführten Zellen (Wiederfindungsrate: 100%) konnten unter Verwendung von kleineren Zellzahlen (50, 100 und 200 Zellen) geringere Wiederfindungsraten von 64-79% erzielt werden.

3.3.1.2. Kultivierung von Tumorzellen im Anschluss an die EPISPOT-Detektion

Da eine mögliche Kultivierung von Patienten-CTCs im Anschluss an ihre Detektion eine detaillierte Charakterisierung dieser Zellen erlauben würde, wurde die Lebens- und Teilungsfähigkeit der angereicherten HT29-Zellen aus 3.3.1.1. im Anschluss an ihre Inkubation auf der EPISPOT-Membran untersucht.

Hierzu wurden die Zellen von der EPISPOT-Membran zunächst in 48well-Kulturplatten und zu einem späteren Zeitpunkt in T25-Kulturflaschen überführt. Unabhängig von der ursprünglich zugegebenen Zellzahl war mit allen Ansätzen eine erneute Kultivierung der Zellen möglich. Abb. 3.20. zeigt exemplarisch die Anzucht einer 80% konfluenten Zellkultur (T25-Kulturflasche) aus ursprünglich 50 HT29-Zellen in 10 mL Blut nach Anreicherung über *RosetteSep* und ihrer Inkubation auf der EPISPOT-Membran.

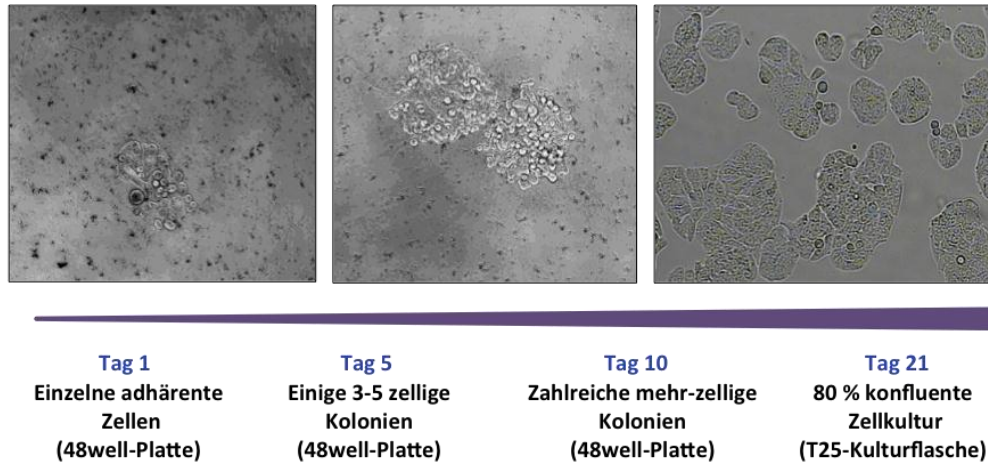


Abb. 3.20.: Kultivierung von 50 mit dem RosetteSep-Antikörpercocktail angereicherten HT29-Zellen nach ihrer Inkubation auf der EPISPOT-Membran.

3.3.1.3. Optimierung der Lagerungsprozedur von mit RosetteSep-angereicherten Zellfraktionen

Um die Analyse mehrerer Patientenproben in einem EPISPOT-Assay zu ermöglichen, sollte eine möglichst schonende Lagerungsmöglichkeit von mit Hilfe des *RosetteSep*-Antikörpercocktails angereicherten Zellen gefunden werden.

Es wurden drei verschiedene Variationen zum Einfrieren von 200 aus 6 mL angereicherten HT29-Zellen in flüssigem Stickstoff getestet (Abb. 3.21.). Zunächst wurde die Zellfraktion lediglich in 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in FCS (Fötales Kälberserum) eingefroren. Die EPISPOT-Analyse dieser Zellen zeigte jedoch nur eine sehr geringe Wiederfindungsrate (10%). und eine anschließende Kultivierung der Zellen war ebenfalls nicht durchführbar. In einem zweiten Ansatz wurde die Gesamtzellzahl der angereicherten Fraktion durch die Zugabe von 1 mL unangereichertem Blut erhöht und

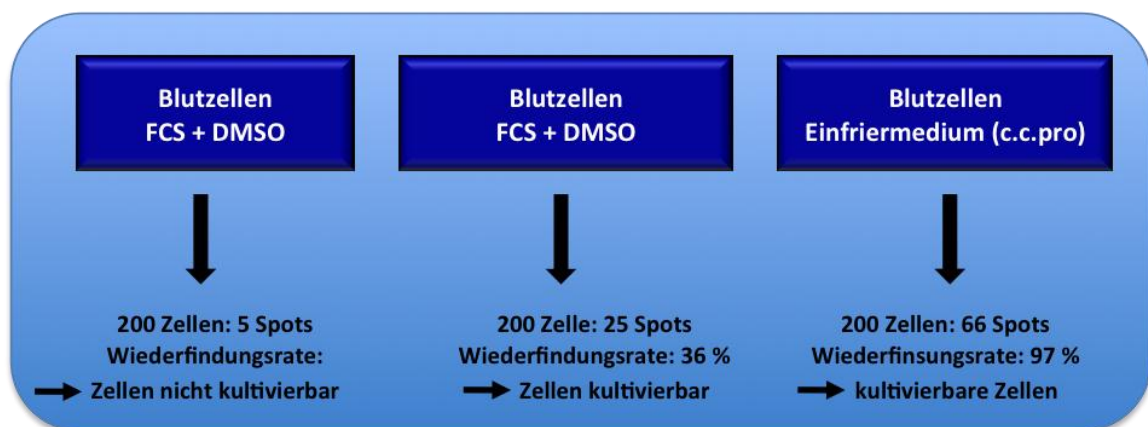


Abb. 3.21.: Strategien zum Einfrieren von mittels *RosetteSep*-Antikörpercocktail angereicherten Zellfraktionen.

erneut 10% DMSO in FCS als Einfriermedium verwendet. Hierdurch konnte die Wiederfindungsrate mit dem EPISPOT-Assay auf 36% gesteigert werden, und eine erneute Anzucht der Zellen war möglich. Schließlich konnte durch Zugabe von 1 mL unangereichertem Blut und unter Verwendung des käuflich erwerblichen Einfriermediums der Firma c.c.pro (Oberdorla, D) eine Wiederfindungsrate von 97% erzielt und folglich ein geeignetes Protokoll zur Lagerung von angereicherten Zellen zur EPISPOT-Analyse gefunden werden.

3.3.2. Einfluss von Zytostatika auf die Immunospots von CK19-sekretierenden Zellen

3.3.2.1. CK19-EPISPOT-Analyse von HT29-Zellen unter Zytostatikaeinwirkung

Um zu untersuchen, ob die Zugabe von Zytostatika während der 48stündigen Inkubation der HT29-Zellen auf der EPISPOT-Membran einen Einfluss auf die Zellen und die resultierenden Immunospots hat, wurden jeweils 1000 HT29-Zellen mit der klinischen Dosis von 5-Fluorouracil und/oder Oxaliplatin versetzt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Wie aus Abb. 3.22. erkennbar, war ein Rückgang sowohl der Anzahl als auch der Größe/Fläche der Immunospots unter Einwirkung der Zytostatika zu beobachten. Die alleinige Zugabe von Oxaliplatin zeigte hierbei den geringsten, die Zugabe beider Zytostatika den deutlichsten Effekt. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt lediglich durch eine Hemmung der CK19-Sekretion oder tatsächlich durch einen Rückgang lebensfähiger Tumorzellen bedingt ist, wurden die Zellen im Anschluss an ihre Inkubation auf der EPISPOT-Membran zur weiteren Kultivierung in unbehandeltem RPMI-Medium 48well-Kulturplatten überführt. Während die Kontrollzellen nach 6 Tagen ein etwa 40% konfluentes Wachstum zeigten, waren bei allen Zytostatika-behandelten Zellen lediglich vereinzelte, adhärente Zellen zu beobachten.

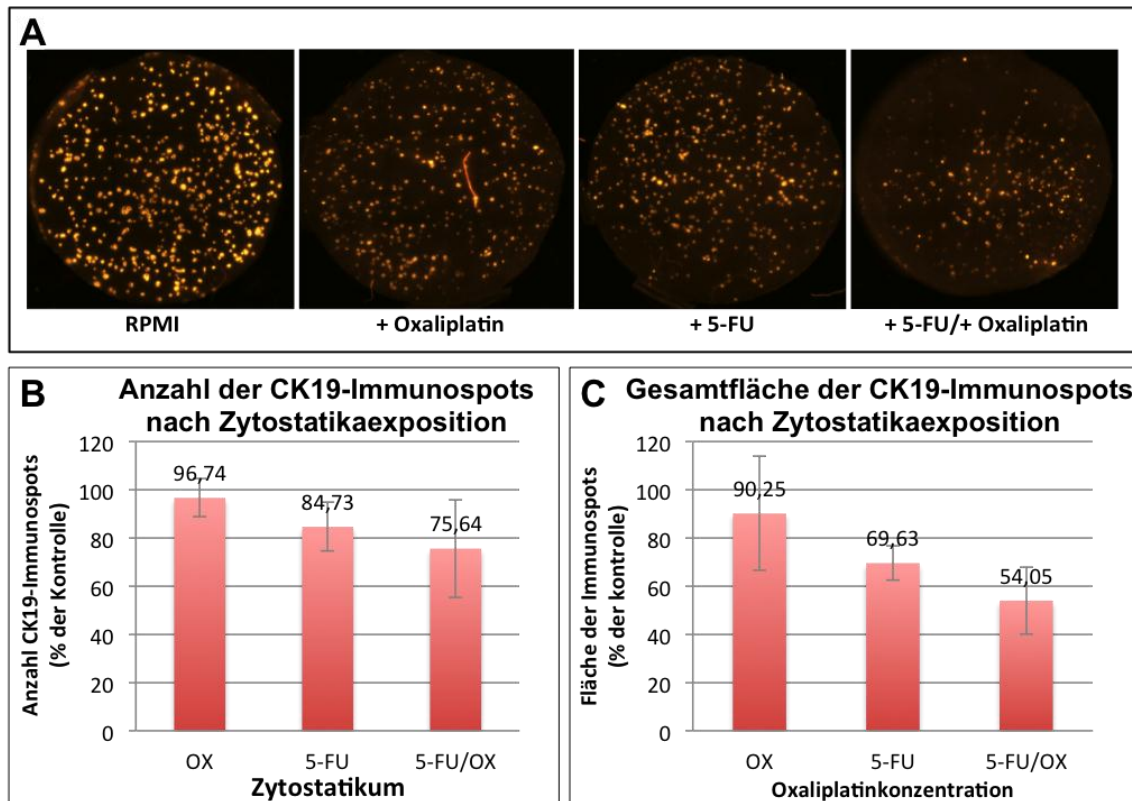


Abb. 3.22.: CK19 EPISPOT-Analyse von HT29-Zellen unter Zytostatikaeinfluss. Jeweils 1000 HT29-Zellen wurden während ihrer 48stündigen Inkubation auf der EPISPOT-Membran mit der klinischen Dosis 5-Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin oder 5-FU und Oxaliplatin versetzt. (A) Eine Abnahme der Anzahl, Größe und Fluoreszenzintensität der Immunospots auf den EPISPOT-Membranen ist nach der Zytostatikabehandlung erkennbar. (B) Prozentualer Anteil der Anzahl detektierter CK19-Immunospots nach Zytostatikaexposition im Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen. (C) Prozentualer Anteil der Gesamtfläche/-größe der vorhandenen Immunospots im Bezug auf die Gesamtfläche/-größe der unbehandelten Kontrolle. Positive und negative Standardabweichungen sind in den einzelnen Balken dargestellt (schwarze Linien). [RPMI/Kontrolle: HT29-Zellen in RPMI-Medium ohne Zytostatikazusatz]

3.3.2.2. Selektion von Zytostatika-resistenten HT29-Subklonen

Als Positivkontrolle für den Zytotoxizitäts-Assay sollten HT29-Subklone mit resistenten Eigenschaften gegenüber den Zytostatika Oxaliplatin (Ox) und 5-Fluorouracil (5-FU) generiert werden. Hierzu sollte bei der Kultivierung der Zellen die Konzentration des jeweiligen Zytostatikums im Zellmedium schrittweise bis zum Erreichen der klinischen Dosis (5-FU: 2 µg/ml; Ox: 2 µmol/L) erhöht werden. Während eine 5-FU-Konzentration von 1µg/mL zum Absterben aller Zellen führte, konnte ein HT29-Subklon unter Einwirkung der klinischen Oxaliplatin-Dosis erfolgreich selektiert und weiter kultiviert werden. Dieser HT29-Subklon wird im Folgenden als HT29OxR bezeichnet.

3.3.2.2.1. Nachweis der Oxaliplatin-Resistenz von HT29OxR- gegenüber HT29-Zellen

Zum Nachweis der Oxaliplatin-Resistenz des selektierten HT29OxR-Klons wurden zunächst jeweils 4×10^5 HT29- und HT29OxR-Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät und mit der klinischen Dosis Oxaliplatin versetzt. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurde nach 24h, 48h, 72h und 96h fotografisch festgehalten (Abb. 3.23.).

Während die HT29OxR-Zellen sowohl in RPMI- als auch in Oxaliplatin-versetztem Medium ein annähernd identisches Zellwachstum aufwiesen, wurde das Wachstum der HT29-Zellen durch die Zugabe von Oxaliplatin deutlich gehemmt. Morphologisch lässt sich bei den HT29-OxR ein etwas vom Wachstum der HT29-Zellen abweichende Kolonienbildung erkennen. Die HT29OxR-Zellen zeigten insgesamt eine abgerundetere Form mit weniger Zell-Zell-Kontakten, was im Gegensatz zur großflächigen, inselartigen Kolonienbildung der HT29-Zellen die Ausbildung von kleineren, unstrukturierteren Kolonien zu Folge hatte.

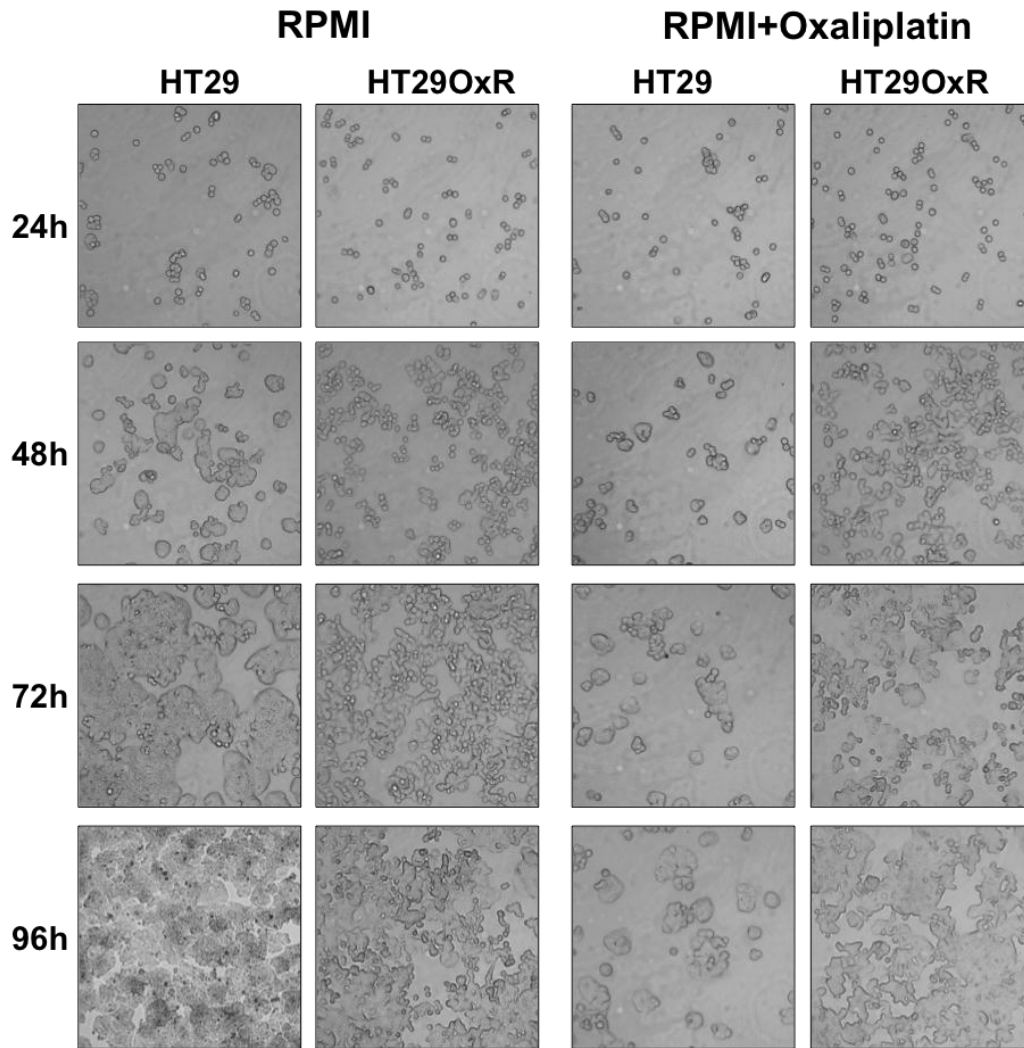


Abb. 3.23.: Gegenüberstellung des Zellwachstum von HT29- und HT29OxR-Zellen unter Oxaliplatinexposition nach 24h, 48h, 72h und 96h.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Zytostatika auf das Zellwachstum von HT29- und HT29-OxR-Zellen durch eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer (s. 2.2.1.1.) nach Zytostatikaexposition untersucht. Jeweils 4×10^5 HT29- und HT29OxR-Zellen wurden in T25-Kulturflaschen ausgesät und der klinischen Dosis Oxaliplatin und/oder 5-FU ausgesetzt. Nach 24h, 48h, 72h und 96h Inkubationszeit wurden die Zellen aus der Kulturflasche gelöst, und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wurde die Gesamtzellzahl ermittelt. Die aus diesen Auszählungen ermittelte Überlebensrate der Zellen ist in Abb. 3.24. dargestellt.

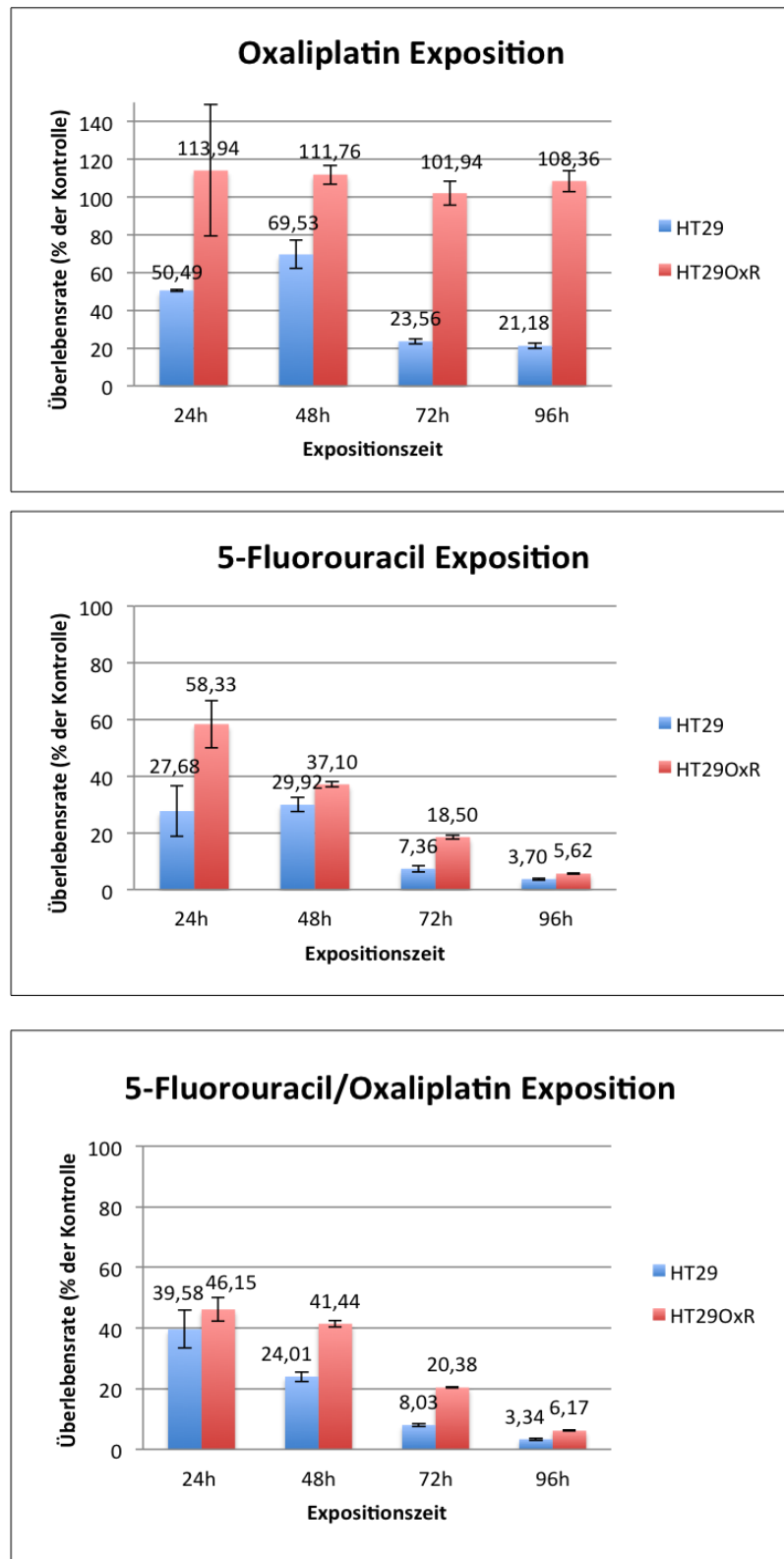


Abb. 3.24.: Darstellung der Überlebensraten von HT29- und HT2OxR-Zellen unter Einwirkung von Zytostatika in Abhängigkeit von der Expositionszeit. Zellviabilität nach Oxaliplatin- (A), 5-FU- (B) und kombinierter Oxaliplatin/5-FU-Exposition (C). Die Überlebensrate ergibt sich als der prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl des untersuchten Ansatzes im Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle. Die positive und negative Standardabweichung der Ergebnisse sind in den einzelnen Balken dargestellt (schwarze Linien).

Für die HT29-Zellen war unter Einwirkung von Oxaliplatin und/oder 5-FU bereits nach 24h eine deutlich Abnahme der Zellviabilität/Überlebensrate zu verzeichnen. Nach 48h war lediglich in den 5-FU/Ox-Ansätzen ein weiterer Rückgang intakter Zellen zu verzeichnen, während sich für die Oxaliplatin-behandelten Zellen eine höhere und für die 5-FU-behandelten Zellen eine etwa gleichbleibende Überlebensrate ergab. Nach einer längeren Expositionszeit von 72h und 96h konnte jedoch wieder eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auf 21% (Ox), 4% (5-FU) bzw. 3% (5-FU/Ox) beobachtet werden.

Die Auszählung der HT29OxR-Zellen zeigte unter Einwirkung von 5-FU und 5-FU/Ox mit steigender Expositionszeit ebenfalls eine deutliche Abnahme intakter Zellen (nach 96 h: 6% für 5-FU und 5-FU/Ox). Im Gegensatz dazu war nach Zugabe von Oxaliplatin hingegen kein negativer Effekt auf die Viabilität der HT29OxR-Zellen zu verzeichnen.

3.3.2.2.1. Expressionsanalyse Tumor-assoziiierter Proteine in HT29OxR-Zellen

Unter der Annahme, dass die erworbene Oxaliplatin-Resistenz der HT29OxR-Zellen mit einer veränderten Gen- und Proteinexpression verbunden ist, wurde die Expression verschiedener Tumor-assoziiierter Proteine mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.25).

Da der Vorgang der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) im Rahmen des Metastasierungsprozesses mit einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit, einer verminderten Apoptoserate sowie einer gesteigerten Resistenz gegenüber Therapeutika einhergeht [48, 128, 129], wurde zunächst die Expression verschiedener EMT-Marker analysiert.

Zum einen wurde die Expression der Keratine 8, 18 und 19 untersucht. Eine Herunterregulation der Keratin-Expression im Rahmen der EMT konnte bereits in mehreren Studien demonstriert werden [48, 50-54]. Die Untersuchung von HT29- und HT29OxR-Zellysaten zeigte jedoch eine annähernd gleichbleibende Expression der beschriebenen Keratine.

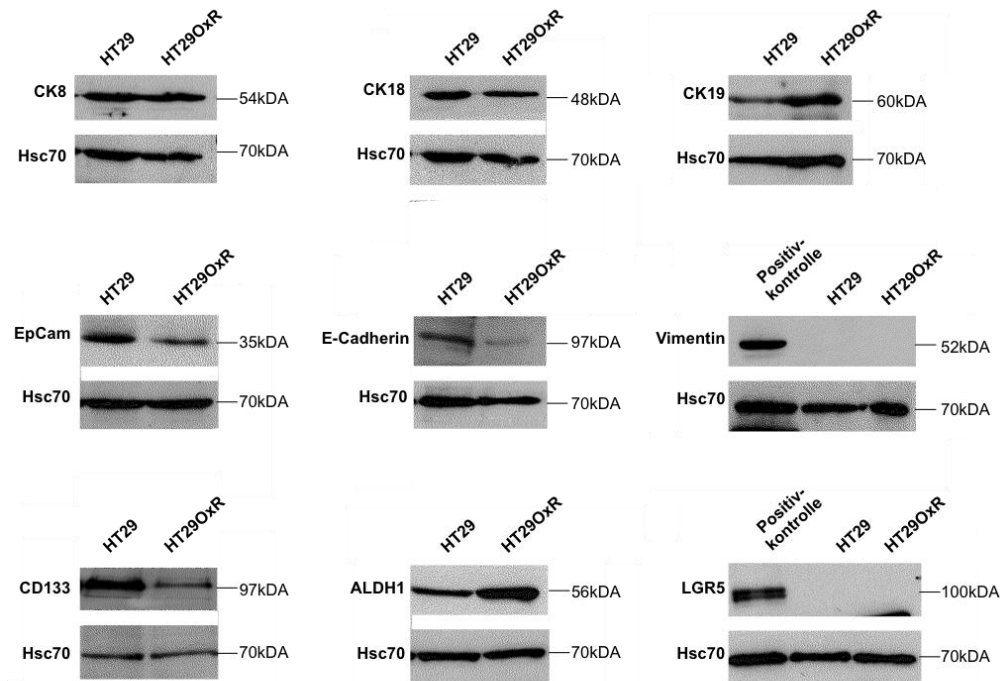


Abb. 3.25.: Untersuchung der Proteinexpression von HT29- und HT29OxR-Zellen mittels Westernblot. Es wurde die Expression der Keratine 8, 18 und 19, der EMT-Marker EpCAM, E- Cadherin und Vimentin sowie der Stammzellmarker CD133, ALDH1 und LGR5 bestimmt. Als Beladungskontrolle wurde die konstitutiv exprimierte Form des Hitzeschockproteins 70 (Hsc70) detektiert.

Zum anderen wurde die Expression weiterer EMT-assoziiierter Proteine, wie z.B. EpCAM, E-Cadherin und Vimentin, analysiert. Die Expression von EpCAM und E-Cadherin nimmt beim Übergang der Tumorzelle von einem epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp ab, während die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin zunimmt [48, 50-54]. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse dieser EMT-Marker in HT29- und HT29OxR-Zellen konnte sowohl eine im Vergleich zu den HT29-Zellen reduzierte EpCAM- als auch E-Cadherin-Expression in HT29OxR-Zellen detektiert werden. Eine Expression von Vimentin war hingegen weder in HT29- noch in HT29OxR-Zelllysaten nachweisbar.

Da sich Zytostatika negativ auf verschiedene Stoffwechselvorgänge auswirken die im Zusammenhang mit dem Zellwachstum und der Zellteilung stehen, ist eine aktive Teilung der zu eliminierenden Zellen für die zytotoxische Wirkung dieser Substanzen essentiell. Oxaliplatin z.B. führt zur Entstehung von Stoffwechselprodukten im Körper, welche Quervernetzung der DNA hervorrufen und folglich den Abbruch der DNA-Synthese sowie Zytotoxizität bewirken. Während bei einem Großteil der Primärtumorzellen eine hohe Proliferationsrate zu verzeichnen ist, sind nach der sogenannten Krebsstammzell-

Hypothese auch stammzellartige Tumorzellen mit einer stark verminderten Zellteilungsrate in der Tumormasse enthalten [130-132]. Für diese Zellen wird ähnlich wie für normale Stammzellen eine Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung postuliert. Darüber hinaus wird vermutet, dass Krebsstammzellen maßgeblich am Tumorwachstum sowie der Ausbildung von Metastasen beteiligt sind. Aufgrund ihrer niedrigen Zellteilungsaktivität wird für diese Tumorstammzellen eine Resistenz gegenüber der Wirkung von Zytostatika angenommen [131, 132].

Die Untersuchung der Expression des Stammzellmarkers CD133 (*cluster of differentiation 133*) ergab eine geringere CD133-Expression in den HT29OxR- gegenüber den HT29-Zellen. Diese Beobachtung konnte zudem durch eine qPCR auf RNA-Ebene verifiziert werden (HT29: fold increase 7.78; HT29OxR: fold increase 0.43; Referenzgen: Beta-2-Mikroglubin). Für das Stammzell-assoziierte Protein ALDH1 (*Aldehydehydrogenase 1*) hingegen war eine leichte Hochregulation in den HT29OxR-Zellen zu beobachten. Der kolorektale Stammzellmarker LGR5 (*Leucin-rich G-Protein coupled receptor 5*) war weder in den HT29- noch in den HT29OxR-Zellen nachweisbar.

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Westernblot-Analyse wurde die Expression von CK19, EpCAM, E-Cadherin, CD133 und ALDH1 in HT29- und HT29OxR zusätzlich mit immunzytochemischen Methoden untersucht (Abb. 3.26.). Wie zuvor im Westernblot, war eine deutliche Reduktion der EpCAM- und E-Cadherin-Expression zu verzeichnen. Zudem war eine größere Anzahl ALDH1- und CK19-positiver Zellen in den HT29OxR gegenüber den HT29-Zellen zu beobachten. Eine Abnahme der CD133-Expression wie mittels Westernblot und qPCR-Analyse detektiert konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden.

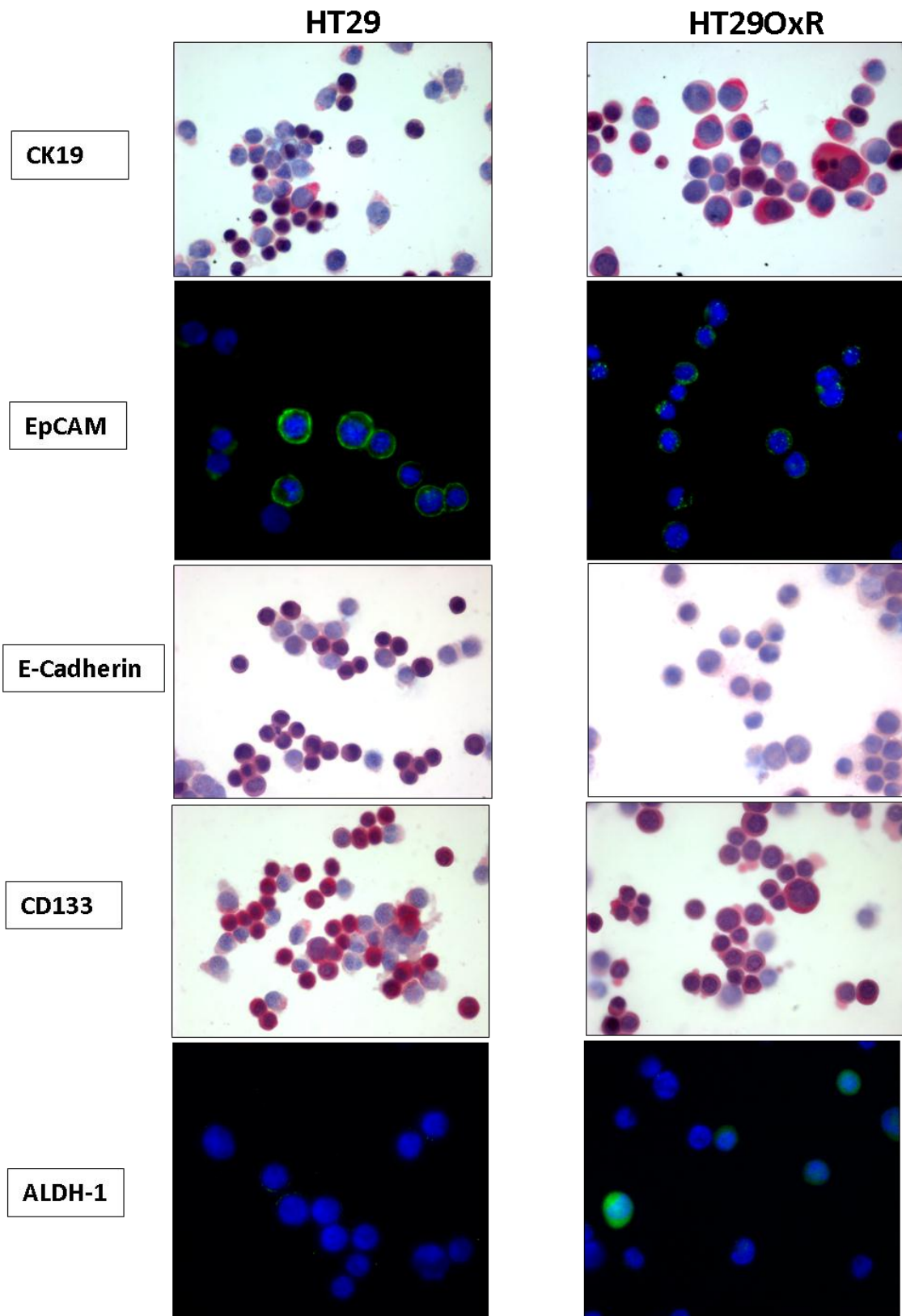


Abb. 3.26.: Immunzytochemische Analyse von HT29- und HT29OxR-Zellen. Die Untersuchung der CK10- und E-Cadherin-Expression erfolgte durch APAAP-Immunzytochemie (s. 2.2.6.2.2.). Durch die alkalische Phosphatase katalysierte Umsetzung des Substrates Neufuchsin wurden die Zielprotein (rot) sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun (blau). Der Nachweis von ALDH1 und EpCAM erfolgte durch Immunfluoreszenz (s. 2.2.6.2.1.) mit Alexa 488 (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) visualisiert.

3.2.3. Analyse und HT29OxR-Zellen mit Hilfe des EPISPOT-Assay unter Oxaliplatinexposition

Um die Eignung von HT29OxR-Zellen als Positivkontrolle für den Zytotoxizitätstest zu untersuchen, wurde ein CK19-EPISPOT-Assay mit jeweils 1000 HT29- und HT29OxR-Zellen unter Einsatz von unterschiedlichen Oxaliplatin-Konzentrationen durchgeführt.

Wie Abb. 3.27. und 3.28. zu entnehmen ist, war eine Abnahme der CK19-Immunospotzahl bei den HT29-Zellen bereits nach Zugabe der ½-fachen klinischen Oxaliplatindosis sichtbar, welche mit steigender Oxaliplatinkonzentration nicht signifikant weiter zunahm. Bei den HT29-OxR-Zellen konnte hingegen unter Einwirkung aller eingesetzten Oxaliplatindosen eine Vielzahl CK19-sekretierender Zellen detektiert werden. Im Vergleich zu den HT29-Zellen waren bei den HT29OxR-Zellen deutlich stärkere Hintergrundsignale zu beobachten.

Auch bezüglich der Fluoreszenzintensität war eine leichte Abnahme in den Oxaliplatin-behandelten HT29-Zellen gegenüber den HT29OxR-Zellen zu verzeichnen. Diese reduzierte Fluoreszenzintensität war unter Verwendung von höheren Oxaliplatinkonzentration (5 Ox, 10 Ox) mit weniger als 40% der Intensität der Immunospots der unbehandelten Kontrolle deutlich nachweisbar. Bei geringeren Oxaliplatinkonzentrationen (1/2 Ox, 1 Ox, 2 Ox) wiesen die Immunospots noch 50-65% der Fluoreszenzintensität im Bezug zur Kontrolle auf. Insgesamt konnte eine Korrelation der reduzierten Fluoreszenzintensität mit einer abnehmenden Anzahl von Immunospots beobachtet werden (Abb. 3.28.). Mit Ausnahme einer verringerten Fluoreszenzintensität bei einer ½-fachen Oxaliplatindosis, konnten keine signifikanten Veränderungen der Anzahl und Fluoreszenzintensität der detektierten CK19-Immunospots der HT29OxR-Zellen nachgewiesen werden.

Wie an den Standardabweichungen in der Abb. 3.28 erkennbar, waren z.T. relativ starke Schwankungen sowohl in der Anzahl als auch den Fluoreszenzintensitäten der Immunospots in den einzelnen Ansätzen der Triplikate zu verzeichnen. Insgesamt konnte zwar ein Effekt der Oxaliplatin-Exposition in den HT29-Zellen beobachtet werden, eine direkte Abhängigkeit der abnehmenden Spotanzahl und Fluoreszenzintensität mit einer steigenden Oxaliplatin-Konzentration konnte hingegen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

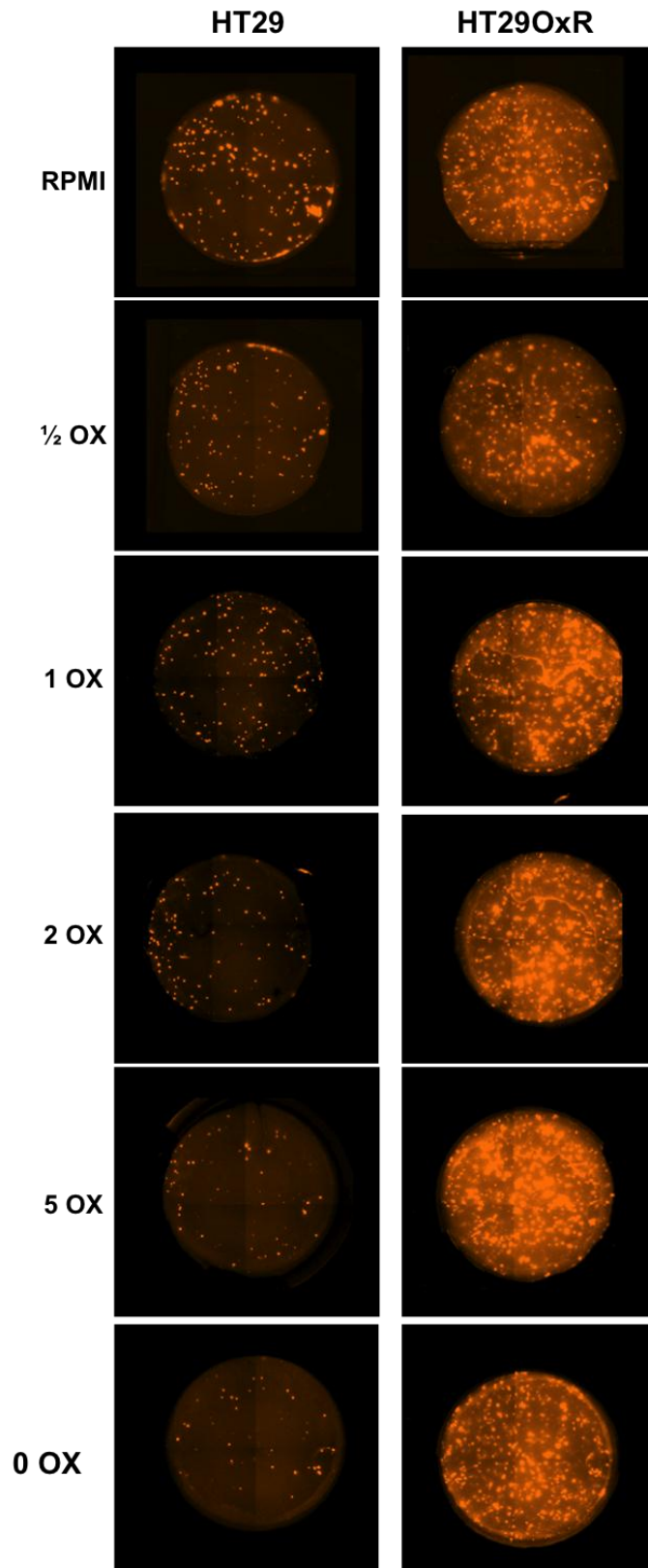


Abb. 3.27.: CK19-EPISPOT mit HT29- und HT29OxR-Zellen unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Oxaliplatin. EPISPOT-Membranen mit detektierten CK19-Immunospots nach Zugabe der 1/2-, 1-, 2-, 5- und 10fachen klinischen Oxaliplatindosis. [RPMI: Kontrolle in unbehandeltem RPMI-Medium].

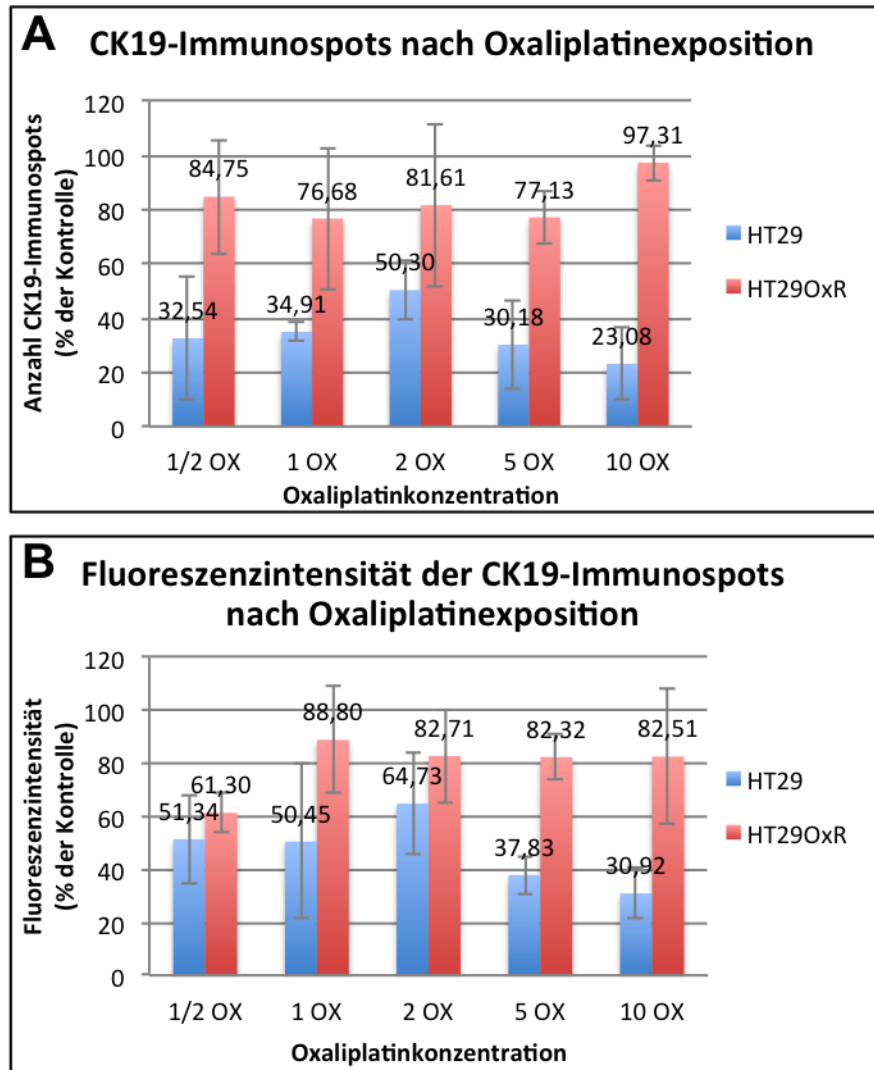


Abb. 3.28: Anzahl und Fluoreszenzintensität der CK19-Immunospots nach Einwirkung verschiedener Oxaliplatinkonzentrationen. Die Anzahl (A) und Fluoreszenzintensität (B) der CK19-Immunospots nach Oxaliplatin-Behandlung wurde als prozentualer Anteil im Bezug auf die Spotanzahl und Fluoreszenzintensität des Kontrollansatzes (HT29- bzw. HT29-OxR in unbehandeltem RPMI-Medium) dargestellt. Die positive und negative Standardabweichung der Ergebnisse ist in den einzelnen Balken dargestellt (graue Linien). [1/2 OX, 1 OX usw. : ½-fache, 1-fache klinische Oxaliplatindosis usw].

4. Diskussion

Wie bei den meisten Krebserkrankungen stellt der Prozess der Metastasierung einen kritischen Schritt im Krankheitsverlauf des kolorektalen Karzinoms dar. Die Ausbreitung des primären Tumors in andere Organe und/oder Gewebe bildet letztlich die Hauptursache aller Krebs-bedingten Todesfälle. Der komplexe Metastasierungsprozess ist bisher noch weitestgehend unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass zirkulierende oder disseminierte Tumorzellen (CTCs/DTCs) im Blut und/oder Knochenmark von Krebspatienten die Grundlage für die Ausbildung von Fernmetastasen bilden. Diese Annahme wird durch zahlreiche Studien belegt, die eine schlechtere Prognose für CTC/DTC-positive Patienten zeigen [67-73] und die Eignung von CTCs zur Überwachung des Therapieerfolges im Verlaufe der Erkrankung demonstrieren [92, 95, 133]. Zur Anreicherung der seltenen CTCs aus einer Vielzahl von Blutzellen und zur Detektion dieser Zellen werden verschiedene Techniken eingesetzt, als einzige FDA-zugelassene Methode zur Überwachung von metastasierten Brust, Prostata- und Darmkrebspatienten stellt das automatisierte *CellSearch*-System jedoch derzeit den „Gold-Standard“ dar. Die weiterführende Analyse detektierter CTCs könnte nicht nur zu einem besseren Verständnis des Metastasierungsvorganges, sondern auch zur Identifizierung neuer Zielmoleküle für Therapiezwecke führen. Des Weiteren könnte die Untersuchung einzelner CTCs als „flüssige Biopsie“ zur Analyse therapeutisch relevanter Marker Anwendung finden und einen Beitrag zur Entwicklung von individuellen Therapieansätzen leisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Verwendung von Zelllinienmodellen verschiedene Methoden (CGH, qPCR, Sequenzierung) zur Analyse der DNA aus einzelnen, mittels *CellSearch* detektierten Tumorzellen etabliert. Die entwickelten Methoden wurden schließlich zur Detektion verschiedener Aberrationen (chromosomale Zugewinne/Verluste, Amplifikationen der Gene EGFR, AURKA, C-MYC und LGR5 sowie Mutationen in KRAS, BRAF, PIK3CA und P53) im Genom einzelner CTCs aus dem Blut von Kolorektalkarzinompatienten eingesetzt. Hierdurch konnte nicht nur der maligne Ursprung der analysierten Zellen nachgewiesen, sondern sowohl eine genotypische

Heterogenität zwischen den CTCs verschiedener Patienten als auch zwischen den aus einem Patienten stammenden CTCs demonstriert werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines Zytotoxizitäts-Assays zur Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika auf lebensfähige CTCs.

4.1. Detektion von CTCs mit Hilfe des *CellSearch*-Systems

Für die Anreicherung und Detektion von CTCs in 7.5mL peripherem Blut von insgesamt 123 Kolorektalkarzinompatienten wurde das *CellSearch*-System verwendet. Diese automatisierte Aufarbeitung beinhaltet eine Anreicherung der Zellen durch den Epithel-spezifischen Marker EpCAM sowie die immunzytochemische Detektion von CTCs mit einem Anti-Keratin-Antikörper (Keratine 8, 18 und 19). Um eine Unterscheidung der CTCs von verbleibenden Leukozyten zu ermöglichen, wird außerdem ein an Leukozyten bindender anti-CD45-Antikörper eingesetzt. Als CTCs kategorisierte Zellen müssen darüber hinaus einen über DAPI-Färbung identifizierten intakten Zellkern aufweisen.

Die Untersuchung von 31 metastasefreien (M0) und 16 metastasierten (M1) Patienten des Kollektivs A zeigte eine signifikante Korrelation sowohl der CTC-Positivität als auch der Anzahl detektierter CTCs mit dem Vorhandensein von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen. So konnte in 23% bzw. 21% der Lymphknoten-negativen (n = 24) bzw. M0-Patienten und in 50% bzw. 48% der Lymphknoten-positiven (n = 23) bzw. M1-Patienten mindestens eine CTC nachgewiesen werden. Eine erhöhte CTC-Anzahl von mindestens 3 CTCs war lediglich in 8% der M0-Patienten und in keinem Lymphknoten-negativen Patienten zu beobachten. Von den Patienten mit Lymphknoten- bzw. Fernmetastasierten Patienten wiesen dagegen 42% bzw. 43% eine erhöhte CTC-Zahl auf. Weiterhin waren ≥ 3 CTCs ausschließlich in Blutproben von Patienten mit weiter fortgeschrittenen Tumorstadien (T3 und T4) zu verzeichnen.

Die erzielten Detektionsraten in M0- und M1-Patienten zeigen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorheriger *CellSearch*-Studien (Tab. 4.1.), welche ≥ 1 CTC in 48% [67], ≥ 2 CTCs in 29%-61% [67, 93, 94, 134, 135] und ≥ 3 CTCs in 26-33% [91, 136] der untersuchten metastasierten Patienten nachweisen konnten. Für metastasenfreie Patienten mit kolorektalem Karzinom konnten Detektionsraten von 15%-26% [90, 93, 94] sowie eine Korrelation der CTC-Positivität

Tab. 4.1.: CTC-Detektionsraten in Kolonkarzinompatienten, detektiert mit dem *CellSearch*-System.

Studie	Patienten	Grenzwert	CTC-Detektionsrate
COHEN <i>et al.</i> , 2008 [67]	N = 430 Stadium IV	≥1 CTCs ≥3 CTC	≥1 CTCs : 48% ≥3 CTC : 26%
COHEN <i>et al.</i> , [135]	N = 50 Stadium IV	≥2 CTCs	38%
ALLARD <i>et al.</i> , 2004 [134]	N = 333 Stadium IV	≥2 CTCs	30%
TOL <i>et al.</i> , 2010 [91]	N = 467 Stadium IV	≥3 CTCs	29%
MAESTRO <i>et al.</i> , 2009 [94]	M0 = 164 M1 = 31	≥2 CTCs	M0 : 15% M1 : 61%
HIRAIWA <i>et al.</i> , 2008 [94]	N = 40 Stadium I-IV	≥2 CTCs	M0 : 18% M1 : 41%
SASTRE <i>et al.</i> 2007 [93]	M0 = 66 M1 = 28	≥2 CTCs	M0 : 26% M1 : 61%

mit dem Lymphknoten-, Metastasierungsstatus und dem Tumorstadium [90] gezeigt werden.

Im Vergleich zum Mamma- und Prostatakarzinom werden im Blut von Kolorektalkarzinompatienten mit Hilfe des *CellSearch*-Systems geringere CTC-Zahlen detektiert [134, 137]. Da das Blut aus dem Darm über die sogenannte Vena Portae (Pfortader) direkt der Leber zugeführt wird, wäre es denkbar, dass die Filterfunktion der Leber den Eintritt von CTCs in den peripheren Blutkreislauf erschwert. Diese Postulation wird durch vorläufige Daten des Instituts für Tumorbilogie (unveröffentlicht) und eine Studie durch JIAO *et al.* [138] unterstützt, die eine höhere CTC-Detektionsrate und -anzahl in mesenterialem Blut (aus der Vena Portae) gegenüber peripherem Blut beim Kolorektalkarzinom zeigen.

Unter Verwendung anderer Techniken zur CTC-Detektion wie z.B. PCR-basierten Nachweismethoden oder durch die Verwendung mehrerer Marker zur CTC-Anreicherung und/oder Detektion konnten in verschiedenen Studien [79-81] höhere CTC-Detektionsraten als mit dem *CellSearch*-System im peripheren Blut von Darm-krebspatienten erzielt werden. Die vergleichsweise geringere CTC-Detektionsrate mit dem *CellSearch*-System, ist vermutlich auf die Verwendung von EpCAM als alleinigem Marker zur CTC-Anreicherung zurückzuführen. Als epitheliales Zelladhäsionsprotein vermittelt EpCAM

die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten sowohl in Normal- als auch in Primärtumorgewebe. Da die Expression von EpCAM zur Mobilisierung von Zellen aus der Tumormasse im Verlauf der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) herabreguliert wird [48, 139, 140] und das *CellSearch*-System ausschließlich EpCAM-positive Zellen selektioniert, bleiben EpCAM-negative CTCs mit dieser Technik unentdeckt. Die klinische Relevanz von EpCAM-negativen CTCs konnte jedoch bisher noch nicht belegt werden ([141, 142]).

4.2. Einzelzellanalyse

Eine erfolgreiche Genotypisierung von einzelnen CTCs könnte im Gegensatz zur derzeit routinemäßig durchgeführten Analyse von kleinen Primärtumorbiopsien zu beliebigen Zeitpunkten detaillierte Informationen über die mit dem Krankheitsverlauf einhergehenden genetischen Veränderungen liefern. Da die Expression spezifischer Zielmoleküle (z.B. EGFR) und der Nachweis therapeutisch relevanter Mutationen/Genamplifikationen (z.B. *KRAS*-Mutationen) sowohl innerhalb der Tumormasse als auch zwischen Primärtumor und entsprechenden Fernmetastasen variieren kann [18, 20, 143, 144], ist die Eignung der Primärtumoranalyse als Kriterium für Therapieentscheidungen in Frage zu stellen. So könnte z.B. eine im Primärtumor unentdeckte *KRAS*-Mutation zur Verabreichung einer EGFR-Immuntherapie führen, welche aufgrund dieser Mutation therapeutisch unwirksam und darüber hinaus mit schwerwiegenden Nebenwirkungen für den Patienten verbunden ist.

Die Detektion von CTCs mit Hilfe des *CellSearch*-Systems könnte folglich nicht nur zur Überwachung des Therapieerfolges von klinischem Nutzen sein, sondern durch weiterführende Analysen der detektierten CTCs auf Einzelzellebene als „flüssige Biopsie“ zur Entwicklung individuellerer Therapiemaßnahmen beitragen.

4.2.1. Methodische Aspekte

Die Einzelzell-Analyse stellt aufgrund der sehr geringen DNA-Menge von etwa 7pg pro Zelle eine methodische Herausforderung dar und erfordert eine gute Qualität des Ausgangsmaterials sowie ein geeignetes Protokoll zur Amplifikation der Gesamt-DNA der Zelle (*Whole Genome Amplification*, WGA). Die WGA-Reaktion selbst sollte eine möglichst hohe Effizienz aufweisen und eine möglichst homogene Amplifikation des Gesamtgenoms bewerkstelligen.

Der Vergleich der WGA-Kits *GenomePlex* und *GenomiPhi* mit Hilfe von Zelllinien-experimenten zeigte, dass die Auswahl eines geeigneten WGA-Protokolls durch die sich anschließenden Folgeapplikationen bestimmt wird.

So lieferten in der mCGH-Analyse ausschließlich direkt eingesetzte *GenomePlex*-WGA-Produkte Hybridisierungssignale mit einer zur Detektion von chromosomalen Aberrationen hinreichenden Intensität. Die weitestgehende Übereinstimmung der CGH-Profile einzelner Tumorzellen und genomischer DNA aus etwa 10^7 Zellen der entsprechenden Zelllinie ließ auf eine repräsentative Amplifikation der Einzelzell-DNA durch das *GenomePlex*-Kit schließen. Diese Schlussfolgerung wurde außerdem durch das annähernd balanzierte mCGH-Profil, welches mit der *GenomePlex*-DNA eines einzelnen Leukozyten aus Normalblut erhalten wurde, unterstützt.

Für die mCGH-Analyse von *GenomiPhi*-Produkten war eine Zweit-Amplifikation der WGA-Produkte mit dem *GenomePlex*-Kit erforderlich. Weitere Optimierungsversuche konnten die im Vergleich zum *GenomePlex*-DNAs geringere DNA-Menge der *GenomiPhi*-DNAs als Ursache für die Inkompatibilität dieser DNAs für die mCGH-Analyse ausschließen. Da die *GenomePlex*-DNA in fragmentierter und die *GenomiPhi*-DNA in hochmolekularer vorliegt, ist dieses Phänomen vermutlich auf eine ineffiziente Fluoreszenz-Markierung der mehr als 10kb langen *GenomiPhi*-DNA-Moleküle zurückzuführen. Des Weiteren ist jedoch auch das Vorliegen der amplifizierten DNAs in unterschiedlichen Puffersystemen als kritischer Faktor für die Markierungs- und /oder Hybridisierungsreaktion in Betracht zu ziehen.

Im Gegensatz zur mCGH waren aCGH-Analysen mit den WGA-Produkten beider Kits durchführbar. Diese erfolgreiche Analyse wird höchstwahrscheinlich durch die

Verwendung eines von der mCGH abweichenden Markierungs- und Hybridisierungsprotokolls verursacht.

Für die Analyse mit Hilfe PCR-basierter Methoden (Multiplex-PCR, qPCR, Sequenzierung) waren *GenomePlex*-WGA-Produkte (Ausfallquote: 39-72%) im Vergleich zu GenomiPhi-DNAs (Ausfallquote: 20-37%) nur begrenzt geeignet. Die erfolgreiche Amplifikation spezifischer Zielregionen mittels klassischer, quantitativer real time und/oder Multiplex-PCR war häufig nicht möglich. Dies könnte zum einen auf eine unregelmäßige Amplifikation des Genoms, zum anderen aber auch auf den Verlust der untersuchten Zielregionen durch die DNA-Fragmentierung im Zuge der WGA-Reaktion zurückzuführen sein. Des Weiteren könnten derartige Verluste und/oder Unregelmäßigkeiten in der WGA-Reaktion Einfluss auf die Quantifizierung gezielter DNA-Sequenzen wie z.B. EGFR mittels qPCR haben. Hierdurch könnte der von den Literaturangaben (AR: 30-40; [110, 121, 122]) und der Amplifikationsrate des MDA468-DNA-Extraktes ($\sim 10^7$ Zellen, AR: 40.4) abweichende Mittelwert bzw. Median von 14.2 bzw. 11.2 für die *GenomePlex*-DNAs der MDA468-Einzelnzellen begründet sein.

Der Mittelwert bzw. der Median der EGFR-Amplifikationsraten der analysierten GenomiPhi-DNAs von MDA-468- und BT20-Einzelnzellen (MDA-468: 43.9 bzw. 40.3; BT20: 9.2 bzw. 8.5) korrelierte mit den in den DNA-Extrakten ($\sim 10^7$ Zellen) detektierten sowie den publizierten EGFR-Amplifikationsraten (MDA-468: 30-40; BT20: 6-14) [110, 121-123]. Die zu verzeichnende Heterogenität des EGFR-Amplifikationsstatus innerhalb der analysierten MDA-MB-468-Zellpopulation (Bereich: 7.2-90.1) konnte bereits mit Hilfe von FISH-Analysen in einer Studie von AGELOPOULOUS *et al.* [121] demonstriert werden (Bereich: 2-60). Die Koexistenz von Zellen mit unterschiedlichen Amplifikationsraten (etwa 4-20fach) des EGFR-Gens konnte in BT20-Zellen ebenfalls im Rahmen von FISH-Analysen beobachtet werden (Institut für Tumorbologie, unpublizierte Daten).

Weiterführenden qPCR-Analysen von DNAs aus einzelnen CTCs und Zellextrakten ($\sim 10^7$ Zelllinienzellen) mit bekanntem EGFR- und/oder HER2-Amplifikationsstatus zeigten ebenfalls eine weitestgehende Übereinstimmung der gemittelten Amplifikationsraten der Einzelzellen mit denen der entsprechenden DNA-Extrakte und Literaturangaben. In Zelllinien, für die in vorangegangenen Untersuchungen ein nicht-amplifizierter Genstatus gezeigt wurde (EGFR: MDA-453, HER2: BT20), wurden bei der Analyse von Einzelzell-

DNAs ausschließlich Amplifikationsraten von ≤ 1 erhalten. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass durch die qPCR-Analyse ein verlässlicher Nachweis von Genamplifikationen auf Einzelzell-Ebene möglich ist.

Vor allem in Zelllinien mit relativ starker Überrepräsentation des *EGFR*-Gens waren sehr unterschiedliche Amplifikationsraten zwischen den Einzelzell-DNAs zu verzeichnen. Da die Analysen der MDA-MB-468-Zelllinie [121] eine Koexistenz verschiedener Genotypen in der Zellpopulation einer Zelllinien zeigen konnten und die gemittelten Messwerte der Amplifikationsrate des DNA-Extraktes entsprechen, deuten die variierenden Amplifikationsraten auf eine Heterogenität bezüglich des *EGFR*- bzw. *HER2*-Gens in den untersuchten Zelllinienzellen hin. Annähernd identische Werte für die Analyse der Einzelzell-DNAs unter Verwendung von zwei in verschiedenen Regionen des *HER2*-Gens bindenden Primerpaaren bestätigt zudem die Reproduzierbarkeit der entwickelten qPCR-Assays.

Der Nachweis bekannter Punktmutationen in den Tumor-assoziierten Genen *P53*, *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* konnte generell sowohl mit *GenomePlex*- als auch mit GenomiPhi-DNAs einzelner Tumorzelllinienzellen durchgeführt werden. Auswertbare Sequenzen konnten mit 63% der GenomiPhi-, aber mit lediglich 28% der *GenomePlex*-DNAs erhalten werden. Des Weiteren wurde in 75% der erfolgreich sequenzierten GenomiPhi-WGA-Produkte die zu erwartende Mutation nachgewiesen. Unter Verwendung der *GenomePlex*-WGA war dies nur in 25% der erhaltenen Nukleotidsequenzen der Fall. Da bisher keine weiteren Studien zur möglichen Koexistenz von genotypisch unterschiedlichen Zellen innerhalb einer Zelllinie durchgeführt wurden und die Generierung von Zelllinien aus der genetisch heterogenen Primärtumormasse erfolgt, ist es denkbar, dass neben zahlreichen, in einem spezifischen Genlokus mutierten Zellen auch Zellen mit einem intakten Wildtyp-Gen in der Zellpopulation einer Tumorzelllinie existieren. Der Detektion von Wildtyp-Sequenzen des untersuchten Gens könnten jedoch auch methodische Gründe, wie die präferentielle Vervielfältigung eines einzelnen Allels durch die WGA sowie die Kontamination der Ausgangszelle mit Blutzellen zugrunde liegen. Letzteres konnte durch die erfolgreiche Detektion der erwarteten *P53* Mutation in WGA-Produkten von mit 1-2 Leukozyten versetzten MDA-231-Einzelzellen nahezu vollständig ausgeschlossen werden.

Tab. 4.2.: Publikationen zur Analyse von Einzelzellen. Die WGA unter Verwendung der Φ 29Phi-Polymerase entspricht der Aufarbeitung mittels *GenomiPhi*-Kit. [DOP-PCR: degenerated oligonucleotide priming PCR; LOH: Analyse des Verlustes der Heterozygotie; BAC: bakterielle artifizielle Chromosomen]

Studie	Zelltyp	DTC/CTC-Anreicherungs-methode	WGA-Protokoll	Folgeapplikation
GEIGL&SPEICHER, 2007 [105]	Zelllinienzellen, DTCs von Brust-, Prostata und Darmkrebspatienten	Ficoll-Dichte-gradient	Linker-Adapter PCR/ <i>GenomePlex</i>	mCGH/aCGH
MATHIESEN <i>et al.</i> 2012 [64]	Zelllinienzellen CTC/DTC von Brustkrebspatientinnen	Ficoll-Dichte-gradient	<i>GenomePlex</i>	aCGH
HANNEMANN <i>et al.</i> , 2010 [110]	Zelllinienzellen CTCs/DTCs von Brustkrebspatientinnen	Ficoll-Dichte-gradient	Φ 29Phi-Polymerase	aCGH, qPCR
STOECKLEIN <i>et al.</i> , 2008 [145]	DTCs von Oesophaguskarzinompatienten	Ficoll-Dichte-gradient	Linker-Adapter PCR	qPCR, aCGH
FUHRMANN <i>et al.</i> , 2007 [104]	Zelllinienzellen DTCs von Brustkrebspatientinnen	Ficoll-Dichte-gradient	Linker-Adapter-PCR	BAC aCGH, qPCR
FIEGLER <i>et al.</i> , 2007 [103]	Zelllinienzellen DTCs von Brustkrebspatientinnen	Ficoll-Dichte-gradient	<i>GenomePlex</i>	aCGH
SPITS <i>et al.</i> , 2006 [146]	Zelllinienzellen	-	Φ 29Phi-Polymerase	BAC aCGH, Sequenzierung
LE CAIGNEC <i>et al.</i> , 2006 [147]	Lymphoblasten Fibroblasten Blastomere	-	Φ 29Phi-Polymerase/ DOP-PCR	aCGH
SCHARDT <i>et al.</i> , 2005[108]	DTCs von Brustkrebspatientinnen	Ficoll-Dichte-gradient	Linker-Adapter PCR	LOH, qPCR
LANGER <i>et al.</i> , 2004 [107]	Zelllinienzellen Zellen aus Leukämiepatienten	-	Linker-Adapter PCR	mCGH
SCHMIDT-KITTLER <i>et al.</i> , 2003 [109]	DTCs von Brustkrebspatientinnen	Ficoll-Dichte-gradient	Linker-Adapter PCR	aCGH
KLEIN <i>et al.</i> 1999/2002 [148, 149]	DTCs aus Brust-, Prostata und Gastrointestinalkrebspatienten	Ficoll-Dichte-gradient	Linker-Adapter-PCR	mCGH, LOH, Sequenzierung

Während die Analyse von DNA aus einzelnen, mit Hilfe des *CellSearch Epithelial Kit* angereicherten und detektierten Tumorzellen bisher noch nicht beschrieben wurde, wurden verschiedene Protokolle zur Amplifikation und Analyse von Einzelzell-DNA aus anderen Zelltypen sowie aus Tumorzellen, die mittels anderer Aufarbeitungsmethoden detektiert wurden, veröffentlicht (Tab. 4.2.).

Neben der *GenomePlex*- und *GenomiPhi*-Technik konnten auch DOP (degenerated oligonucleotide primed)- und Linker-Adapter PCR-basierte Methoden erfolgreich zur

Amplifikation von Einzelzell-DNA eingesetzt werden [104, 105, 107-109, 145, 147-149]. Während zahlreiche Publikationen die Eignung der WGA-Produkte für Array- oder Metaphasen-CGH-Analysen zur Detektion chromosomaler Aberrationen zeigen [64, 103-105, 109, 110, 145-147], wurden nur in wenigen Studien Analysen der Einzelzell-DNAs durch PCR-basierte Methoden, wie qPCR und Sequenzierungen durchgeführt [145, 146]. Eine erfolgreiche Analyse von GenomiPhi-DNAs mittels mCGH sowie die Analyse von *GenomePlex*-DNAs mittels PCR-basierter Methoden wurden bisher jedoch nicht beschrieben. Die Eignung von *GenomePlex*-DNAs für mCGH-Analysen [105], von *GenomePlex*- und GenomiPhi-DNAs für aCGH-Analysen [64, 103, 105, 110, 146, 147] sowie von GenomiPhi-DNAs für qPCR-Analysen [110] wurde hingegen bereits an anderen Zelltypen und/oder an mit Hilfe von Ficoll-Dichtezentrifugation angereicherten DTCs aus dem Knochenmark von Krebspatienten gezeigt.

Insgesamt bilden die in dieser Arbeit etablierten Methoden zur Analyse von Einzelzell-DNA eine solide Basis für die genotypische Charakterisierung von CTCs im Anschluss an ihre Anreicherung und Detektion mit dem *CellSearch*-System.

4.2.2. Genotypische Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von Kolorektalkarzinompatienten

Von den insgesamt 806 mit Hilfe des *CellSearch*-Systems nachgewiesenen CTCs aus dem Blut von 13 Kolorektalkarzinompatienten konnten lediglich 141 (aus 13 Patienten) isoliert und deren Genom unter Verwendung des *GenomePlex*- bzw. des GenomiPhi-Kits amplifiziert werden. Die geringe Ausbeute ist dadurch begründet, dass die CTCs am Ende des *CellSearch*-Laufes nicht direkt für die Mikromanipulation zugänglich sind, sondern zunächst aus der *CellSearch*-Kartusche auf einen Objektträger transferiert werden müssen. Dieser Transfer ist mit relativ großen Zellverlusten verbunden, da sowohl Zellen in der Kartusche oder der verwendeten Pipettenspitze zurückbleiben als auch durch die während des Transfervorgangs einwirkenden Scherkräfte beschädigt werden können. Des Weiteren muss das erneute Auffinden der CTCs manuell am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Im Vergleich zur automatisierten CTC-Detektion durch den *CellTracks Analyzer* im Anschluss an den *CellSearch*-Lauf ist von einer geringeren Effizienz dieses manuellen Suchvorgangs auszugehen. Aufgrund der zu verzeichnenden Zellverluste müssen für die

erfolgreiche Isolierung zumindest einer CTC zuvor mindestens 5 CTCs durch das *CellSearch*-System im Blut eines Patienten detektiert werden.

Mit Hilfe der aCGH-Analyse von 32 CTCs aus 5 verschiedenen Kolorektalkarzinompatienten konnte für 19 CTCs ein aberrantes CGH-Profil erhalten und folglich der maligne Ursprung dieser Zellen nachgewiesen werden. Während 11 Einzelzell-DNAs höchstwahrscheinlich aufgrund einer verminderten Qualität der DNA ein nicht eindeutig auswertbares, artefaktreiches Profil lieferten, konnten in 2 analysierten Zellen keine chromosomalen Aberrationen beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass entweder eine Kontamination der Einzelzell-DNA mit Normal-DNA z.B. DNA aus Blutzellen vorliegt oder es sich bei der detektierten Zelle nicht um eine Tumorzelle handelte. Wie durch PANTEL *et al.* [150] gezeigt, können in seltenen Fällen (11.3% von 53 Patienten) auch Keratin- und DAPI-positive sowie CD45-negative Zellen im Blut von Patienten mit benignen Darmerkrankungen über das *CellSearch*-System detektiert werden. Zumeist ist jedoch eine manuelle Unterscheidung dieser Zellen von CTCs anhand verschiedener zellmorphologischer Kriterien möglich. In einer Studie von SCHARDT *et al.* [108] konnten in einzelnen CTCs, die ein balanziertes CGH-Profil aufwiesen, Amplifikationen des HER2-Gens durch LOH-Analysen detektiert werden. Es ist denkbar, dass in Tumorzellen, die zu einem relativen frühen Zeitpunkt der Tumorprogression disseminieren, die in den verbleibenden Zellen des Primärtumors einhergehende Anhäufung chromosomaler Aberration nicht erfolgt und folglich nicht nachweisbar ist [63, 108].

Anhand der aberranten CGH-Profile der 19 CTCs konnten folgende gehäuft auftretende Veränderungen des Genoms identifiziert werden: Zugewinne von 7pq, 8q, 12pq, 13pq, und 20pq, sowie Verluste von 1p, 3p, 4pq, 5q, 8p, 14pq, 18pq, 21pq und 22pq.

Laut Literaturangaben sind die detektierten Zugewinne in den Regionen 8q, 12pq, 7pq und 20pq sowie Verluste in 18pq in etwa 30-63% kolorektaler Primärtumoren zu verzeichnen [151]. Für die in zahlreichen Tumorentitäten auftretende Deletion der 8p-Region konnte eine Assoziation mit der Progression und Metastasierung des Primärtumors aufgezeigt [152, 153]. Analysen von Primärtumor und zugehörigen Metastasen zeigten eine erhöhte Anzahl chromosomaler Veränderungen in den Metastasen. So konnten z.B. die in CTCs zu beobachtenden Zugewinne von 8q und 20pq und Verluste in 18q in 50-81% der analysierten Metastasen nachgewiesen werden [151].

Durch BRUIN *et al.* [154] wurde außerdem die Korrelation eines Zugewinns des Chromosoms 20 im Primärtumor mit dem Vorhandensein von Lebermetastasen beschrieben.

Die neben diesen für das kolorektale Karzinom charakteristischen Aberrationen zusätzlich in CTCs beobachteten Veränderungen (Zugewinn von 13pq, Verluste von 1p, 3p, 4pq, 5q, 14pq, 21pq und 22pq) könnten durch die Aktivierung und/oder den Funktionsverlust spezifischer Gene in diesen Regionen eine Rolle bei der Disseminierung von Tumorzellen in den Blutkreislauf spielen.

Abgesehen von einigen übereinstimmenden DNA-Zugewinnen und –Verlusten konnten innerhalb der CTC-Population eines Patienten sehr unterschiedliche chromosomale Aberrationen detektiert werden. Diese genotypische Heterogenität wird unter 4.2.3. näher diskutiert.

Von den 136 für die Bestimmung des EGFR-, c-MYC-, AURKA- und LGR5-Amplifikationsstatus mittels qPCR eingesetzten CTCs erfüllten lediglich 31-37% die für eine verlässliche Auswertung erforderlichen Kriterien. Diese geringe Ausbeute ist zum einen durch die schlechte Performance der 28 mittels *GenomePlex* amplifizierten Zellen bedingt, von denen je nach untersuchter Zielregion nur 0,08% auswertbare Messwerte lieferten. Zum anderen kommt auch der Verlust der qPCR-Zielgene im Zuge der WGA-Reaktion als mögliche Ursache in Frage.

Insgesamt konnte in 100%, 80%, 88% bzw. 80% der Patienten, von denen CTCs analysiert wurden, mindestens eine CTC mit einer Amplifikation des EGFR-, AURKA, C-MYC bzw. LGR5-Gens nachgewiesen werden. Diese Detektionsraten stehen im Einklang mit den durch aCGH vermehrt nachgewiesenen Zugewinnen der chromosomalen Regionen (7p, 20q, 8q und 12pq), in denen diese 4 Gene lokalisiert sind. Während die Analyse des EGFR-Amplifikationsstatus auf Einzelzellebene bereits mit DTCs/CTCs von Brustkrebspatientinnen durchgeführt wurde [110], sind bisher keine Daten bezüglich der Amplifikation von AURKA, C-MYC und LGR5 in DTCs/CTCS verfügbar. Wie auch durch die Untersuchungen von HANNEMANN *et al.* [110] gezeigt konnte in allen analysierten Patienten mindestens eine CTC mit einer EGFR-Amplifikation identifiziert sowie eine deutliche Heterogenität der Amplifikationsrate zwischen den CTCs eines Patienten beobachtet werden. Analysen von kolorektalen Primärtumoren zufolge ist eine EGFR-

Amplifikation lediglich in 28-29% aller Tumoren nachweisbar [155]. Mehrere Studien [32, 34] konnten jedoch zeigen, dass Amplifikationen des EGFR-Lokus im Primärtumor mit dem Ansprechen auf anti-EGFR-Immuntherapien (Cetuximab, Panitumumab) korrelieren und folglich eine Rolle bei der Progression und/oder Metastasierung von EGFR-amplifizierten Tumoren spielen. Basierend auf dieser Assoziation mit einem Fortschreiten der Krebserkrankung ist es denkbar, dass innerhalb des Primärtumors Subklone aus wenigen EGFR-amplifizierten Zellen existieren, die mit Hilfe der gängigen Analyseverfahren an Tumorbiopsien nicht nachweisbar sind, jedoch ein hohes Potential zur Disseminierung aufweisen.

Amplifikationen des AURKA-Gens sind in etwa 52-53% aller Kolorektalkarzinome zu finden [37, 155] und mit einer erhöhten Immortalität und chromosomalen Instabilität betroffener Zellen verbunden [156, 157]. Eine Amplifikation des C-MYC-Onkogens ist in 4-39% kolorektaler Primärtumoren zu verzeichnen [41, 155, 158, 159]. Untersuchungen von Primärtumoren und dazugehörigen Lebermetastasen zeigten, dass C-MYC-Amplifikationen im Vergleich zum Primärtumor in den Metastasen häufiger vorkommen (ROCHLITZ *et al.* [41]: 4% vs. 59%) und dass Zugewinne in der C-MYC-Region mit einem invasiveren und aggressiveren Phänotyp assoziiert sind.

DNA-Zugewinne in der Region 12q, in der das LGR5-Gen, das einen kolorektalen Stammzellmarkers kodiert, lokalisiert ist, konnten bereits in kolorektalen Primärtumoren nachgewiesen werden [160, 161]. Darüber hinaus wird eine Überexpression von von Stammzellmarkern wie LGR5 als mögliche Ursache für die Resistenz gegen zytostatische Therapiemaßnahmen in Betracht gezogen [131, 132]

Die Assoziation der analysierten Genamplifikationen mit einem stark invasiven, aggressiven und therapieresistenten Phänotyp sowie die im Vergleich zu Primärtumoranalysen erhöhte Detektionsrate dieser Amplifikationen in CTCs legt die Vermutung nahe, dass nur wenige, mit spezifischen genotypischen Eigenschaften (z.B. EGFR-, AURKA-, C-MYC- und/oder LGR-Genamplifikationen) ausgestattete Zellen der Primärtumormasse die Fähigkeit zur Disseminierung besitzen und als CTCs nachweisbar sind.

Bei der Mutationsanalyse verschiedener *Hot Spot*-Regionen der Gene P53, KRAS, BRAF und PIK3CA konnten je nach Zielregion für 49%- 66% der eingesetzten 141 CTCs aus 13 Patienten auswertbare Sequenzen erhalten werden. Ähnlich wie bei der qPCR-Analyse

sind die zu verzeichnenden Ausfälle vermutlich auf eine WGA-bedingte Unterrepräsentation der Zielregionen zurückzuführen.

Insgesamt konnte in mindestens einer CTC von 8/13 Patienten (62%) eine PIK3CA-, von 4/12 Patienten (33%) eine P53-, von 2/13 Patienten (15%) eine KRAS- und von 1/13 Patienten (8%) eine BRAF-Mutation detektiert werden. Während die Detektionsrate für BRAF-Mutationen mit den Literaturangaben für kolorektale Primärtumoren (5-12%, [21, 27]) übereinstimmt, liegt die Häufigkeit von P53 und KRAS-Mutationen in CTCs etwas unter dem anhand von Primärtumoranalysen ermittelten Bereichen (P53: 40-61% [22, 24, 26]; KRAS: 27-60% [21, 24, 28]). Dies ist jedoch vermutlich auf die geringe Anzahl analysierter Patienten zurückzuführen. Auffällig ist die weite Verbreitung von PIK3CA-Mutationen, die in 21 CTCs von 8 verschiedenen Patienten gefunden wurden, in Primärtumoren jedoch lediglich mit einer Häufigkeit von 15-20% beschrieben sind [21, 27]). Diese Beobachtung stellt zum einen die Effizienz und Verlässlichkeit der Primärtumoranalyse in Frage. Zum anderen wird hierdurch angedeutet, dass eine dauerhafte Aktivität von PIK3CA und folglich die Expression der Zielgene der PI3K/Akt-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Disseminierung von Tumorzellen in die Blutzirkulation einnehmen könnten.

4.2.3. Genotypische Heterogenität der CTCs einzelner CTC-Population

Die genotypische Charakterisierung der CTCs von 13 verschiedenen Kolorektalkarzinompatienten zeigte in jeder der untersuchten CTC-Populationen eine stark ausgeprägte Heterogenität bezüglich chromosomaler Aberrationen, Genamplifikationen und Mutationen. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten der Studien von KLEIN *et al.* [148] und STOECKLEIN *et al.* [145] überein, in denen die Analysen von Einzelzell-DNAs aus dem Knochenmark von Brust- und Prostatakarzinompatienten mittels CGH, LOH, qPCR sowie Sequenzierungen ebenfalls ein sehr heterogenes genotypisches Muster in den einzelnen CTCs individueller Patienten zeigten. Inwieweit diese Koexistenz verschiedener Genotypen in einer CTC-Population die intratumorale Heterogenität des Primärtumors [18, 20] reflektiert, ist noch unklar. Schließlich ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den analysierten CTCs lediglich um eine Subpopulation des Primärtumors handelt, die die Fähigkeit zur Disseminierung in die Blutzirkulation

aufweist. Zudem ist anzunehmen, dass wiederum nur vereinzelte, sich genotypisch von den restlichen CTCs unterscheidende Zellen dieser Subpopulation in der Lage sind, in distante Organe zu gelangen und dort Fernmetastasen zu bilden. Das gleichzeitige Auftreten von CTCs mit und ohne spezifische Aberrationen/Mutationen/Amplifikationen in einer CTC-Population unterstützt die in der Literatur beschriebene Hypothese [63, 74, 162] die Disseminierung von Tumorzellen bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Tumorgenese stattfinden kann. Im Gegensatz hierzu postuliert das sogenannte lineare Modell der Tumorprogression, dass eine Disseminierung von Tumorzellen erst in einem späteren Stadium der Erkrankung erfolgt. Dieses Modell wird durch eine Arbeit von MATHIESSEN *et al.* [64] unterstützt, in der aCGH-Analysen von einzelnen CTCs und den dazugehörigen Primärtumoren von Brustkrebspatientinnen weitestgehend übereinstimmende Aberrationen zeigten.

Zusammenfassend demonstrieren die erhaltenen Daten, dass die Analyse von einzelnen CTCs detailliertere Auskünfte über die genotypische Beschaffenheit der Erkrankung als die routinemäßigen Primärtumoranalysen und folglich zusätzliche Information zur Entwicklung von individuell auf das Krankheitsbild des einzelnen Patienten abgestimmten Therapiemaßnahmen liefern könnten.

4.3. Zytotoxizitäts-Assay mit Hilfe des CK19 EPISPOTs

Die Entwicklung eines CK19-EPISPOT-Assays zur Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika auf lebensfähige CTCs erfolgte im Zelllinienmodell mit HT29-Zellen. Zur Generierung einer Positivkontrolle konnte im Vorfeld ein Oxaliplatin-resistenter HT29-Subklon selektiert (HT29OxR) werden.

4.3.1. Selektion eines Oxaliplatin-resistenten HT29-Subkons

Durch die Exposition von HT29- und HT29OxR-Zellen mit den Zytostatika Oxaliplatin und/oder 5-Fluoruracil und einer anschließenden Zellzahlbestimmung konnte für die HT29OxR-Zellen eine spezifische Resistenz gegenüber Oxaliplatin nachgewiesen werden. Während nach 96h nur noch 21% der in RPMI-Medium kultivierten HT29-Zellen unter Oxaliplatin-Einwirkung vorhanden waren, zeigten die HT29OxR-Zellen in unbehandeltem und mit Oxaliplatin-versetztem RPMI-Medium mit einer Zellviabilität von 108% ein fast identisches Wachstum. Die im Vergleich zu einer 24-stündigen nach 48-stündiger Exposition zu verzeichnende höhere Zellviabilität der HT29-Zellen ist vermutlich auf verschiedene methodische Aspekte, wie z.B. Ungenauigkeiten von Verdünnungs-/Pipettievorgängen oder eine unvollständiges Ablösen der Zellen von der Kulturflasche im Vorfeld der Auszählung zurückzuführen. Die Einwirkung von 5-FU zeigte zwar einen etwas geringeren Effekt auf die HT29OxR-Zellen, führte jedoch in beiden Zellen nach 96h zu einem fast vollständigen Absterben der Zellen (Zellviabilität: 3,7 bzw. 5.6%). Weitere in der Literatur beschriebene Studien zur Oxaliplatin- oder 5-FU-Exposition von HT29-Zellen bestätigen einen deutlichen Rückgang der Überlebensraten, jedoch mit etwas abweichenden Werten. So zeigten DALLAS *et al.* [171] nach 72-stündiger Einwirkung der klinischen Dosis Oxaliplatin- oder 5-FU eine höhere Viabilität der HT29-Zellen von 40% bzw. 58% (Daten dieser Arbeit: 24% bzw. 7%). In einer Arbeit von LINK *et al.* [163] hingegen konnte für HT29-Zellen unter 5-FU-Exposition (klinische Dosis) bereits nach 24h nur noch eine Zellviabilität von 15% beobachtet werden (Daten dieser Arbeit: 28%). Diese Unterschiede sind höchstwahrscheinlich durch die Verwendung verschiedener HT29-Zellklone sowie voneinander abweichende Kulturbedingungen begründet.

Neben einem uneingeschränkten Wachstum unter Oxaliplatin-Exposition zeigten die HT29OxR-Zellen einen morphologisch von den HT29-Zellen abweichenden Phänotyp mit einer Reduktion von Zell-Zell-Kontakten. Dieser Verlust der für die epitheliale Zellorganisation charakteristischen Zellkontakte konnte auch in Experimenten von SOLMI *et al.* [163] beobachtet werden. Da disseminierende, progrediente Tumorzellen im Rahmen der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zur Mobilisierung aus dem Zellverband des Primärtumors ihre Kontakte zu benachbarten Zellen auflösen, lag die Vermutung nahe, dass die Abnahme der Zell-Zell-Kontakte der selektierten HT29OxR-Zellen mit der EMT assoziiert sein könnte. Die vergleichende Expressionsanalyse verschiedener EMT-Marker (Keratine 8, 18, 19, EpCAM, E-Cadherin und Vimentin) von HT29- und HT29OxR-Zellen mittels Western-Blot zeigte vergleichbare Expressionen der epithelialen Keratine, sowie die Abwesenheit des mesenchymalen Markers Vimentin in HT29- und HT29OxR-Zellen. Im Einklang mit den morphologischen Veränderungen konnte jedoch eine reduzierte Expression der Zelladhäsionsmolekül EpCAM und E-Cadherin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse konnten zudem durch immunzytochemische Färbungen für das Keratin 19, EpCAM und E-Cadherin bestätigt werden. Publierte Ergebnisse zu Untersuchungen von HT29OxR-Zellen durch YANG *et al.* [164] konnten neben einem EMT-spezifischen Phänotyp, ebenso eine verringerte E-Cadherin, jedoch zusätzlich eine Erhöhung der Vimentin-Expression in einem generierten HT29OxR-Klon zeigen.

Literaturangaben zur Folge geht die EMT mit einer Reduktion der Expression epithelialer Proteine, wie den Keratinen, EpCAM und E-Cadherin [165-168], sowie einem parallelen Expressionsanstieg mesenchymaler Proteine, wie z.B. Vimentin [169] einher. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten deuten folglich darauf hin, dass in den HT29OxR-Zellen die EMT bereits eingeleitet, jedoch noch nicht vollständig erfolgt ist. Für die HT29OxR-Zellen ist folglich anzunehmen, dass sie sich in einem Übergangszustand vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp befinden könnten. Die Assoziation einer EMT-spezifischen Proteinexpression mit einem erhöhten Metastasierungspotential sowie einer verstärkten Resistenz gegenüber Zytostatika konnte bereits durch verschiedene Studien demonstriert werden [48, 128, 129].

Da sowohl für die Zytostatikaresistenz als auch für die EMT häufig ein Zusammenhang mit stammzellartigen Eigenschaften der entsprechenden Tumorzellen beschrieben

wurde [131, 132, 170], wurden neben der Expression von EMT-spezifischen Proteinen auch die Expression der Stammzellmarker ALDH1, CD133 und LGR5 mittels Westernblot untersucht. Während für LGR5 (*leucin-rich repeat containing G-Protein coupled receptor 5*), das in Kolonepithelstammzellen häufig exprimiert wird [46, 47] weder in HT29- noch in HT29OxR eine detektierbare Proteinmenge zu beobachten waren, war eine relativ geringe Zunahme der ALDH1- und eine deutliche Abnahme der CD133-Expression in HT29OxR-Zellen zu verzeichnen. Die immunzytochemische Überprüfung dieser Daten konnte die erhöhte ALDH1-Expression nicht eindeutig belegen. Die Herunterregulation von CD133 konnte hingegen sowohl immunzytochemisch als auch mittels qPCR bestätigt werden. Diese Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu Analysen von HT29OxR-Zellen durch DALLAS *et al.* [171], die eine Erhöhung der CD133-Expression in HT29OxR- gegenüber HT29-Zellen zeigten. Im Gegensatz zu unserem parental HT29-Klon, der ein relativ hohes CD133-Expressionlevel aufweist, war eine Expression des CD133-Proteins in den HT29-Ausgangszellen von DALLAS *et al.* [171] nicht zu verzeichnen. Diese Beobachtung demonstriert die Unterschiede zwischen verschiedenen, unter unterschiedlichen Bedingungen kultivierten HT29-Klonen, welche zu abweichenden Ergebnissen zwischen einzelnen Studien führen können.

Darüber hinaus konnten zahlreiche Studien in verschiedenen Tumorentitäten eine Korrelation zwischen der CD133-Positivität von Tumorzellen mit der Fähigkeit die Neubildung von Tumoren/Metastasen zu beeinflussen und einer erhöhten Chemotherapieresistenz zeigen [172-174]. In einer Studie von SUN *et al.* [175] konnten in neuronalen Stammzellkulturen jedoch auch CD133-negative Zellen nachgewiesen werden, die eine verringerte Zellteilungsrate und die Fähigkeit zur Differenzierung aufwiesen. Weitere Studien [176-178] konnten für CD133-negative Hirn- und kolorektale Tumorzellen eine tumor-initiierende Wirkung im Mausmodell nachweisen. Diese Daten sowie die in der Literatur stark variierenden molekularen Eigenschaften von stammzellartigen Tumorzellen [46, 143, 179-182], könnten einen ersten Erklärungsansatz für die verringerte CD133-Expression in den HT29OxR-Zellen darstellen.

4.3.2. Verwendung des CK19 EPISPOT als Zytotoxizitäts-Assay

Unter Verwendung der kolorektalen Tumorzelllinie HT29 konnten mit dem CK19-EPISPOT-Assay 79-100% bzw. 64-77% von in 4 mL bzw. 10 mL Blut transferierten CK19-sekretierenden Zellen nachgewiesen werden. Bisher sind keine Literaturangaben bezüglich der Wiederfindungsraten von CK19-sekretierenden Tumorzellen mit dem EPISPOT-Assay zu Vergleichszwecken verfügbar. ALIX-PANABIÈRES *et al.* [96] konnten mit Hilfe der EPISPOT-Technik jedoch eine Wiederfindungsrate von 37-100% für MUC1-sekretierende MCF7-Zellen demonstrieren. Darüber hinaus, wurde in dieser Studie wie auch in dieser Arbeit gezeigt, dass mit einer geringer werdenden Anzahl zugefügter Zellen zu 10 mL Blut ein Anstieg der Wiederfindungsrate zu beobachten ist [96]. Diese Beobachtung sowie eine weitere Studie von ALIX-PANABIÈRES *et al.* [97], in der die Detektion von bis zu einer CK19-sekretierenden Zelle in 10 mL Blut gezeigt wurde, demonstriert die Sensitivität des EPISPOT-Assays. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das unprozessierte CK19-Protein und nicht nur das im Zuge der Apoptose durch Caspase-Spaltung entstehende CK19-Teilfragment CYFRA freigesetzt wird [97].

Unter Einwirkung der klinischen Dosis der Zytostatika Oxaliplatin und/oder 5-Fluorouracil konnte eine Abnahme der Anzahl, der Fluoreszenzintensität und der Größe/Fläche der CK19-Immunospots beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der Bestimmung der Überlebensrate nach der Kultivierung von HT29-Zellen in Zytostatika-behandeltem Medium (s. 4.3.1.) wurde durch die Zugabe von Oxaliplatin der geringste, durch die Zugabe beider Zytostatika der stärkste Effekt hervorgerufen. Der Einfluss der Oxaliplatin-Exposition auf die HT29-Zellen ist anhand der resultierenden Immunospots zwar deutlich erkennbar, die Auswertung der Immunospots ergab jedoch lediglich eine Abnahme der Anzahl bzw. der Fläche der Immunospots von 3% bzw. 10%. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die zu Beginn der Oxaliplatin-Exposition noch intakten Zellen, eine CK19-Sekretion aufweisen, die zwar im Laufe der Expositionszeit von 48h durch die Wirkung des Zytostatikas abnimmt, jedoch noch als Immunospot mit geringer Fluoreszenzintensität nachweisbar ist. Einen deutlichen Hinweis auf eine Reduktion der Anzahl lebensfähiger Zellen durch die Zugabe von Zytostatika während der Inkubation auf der EPISPOT-Membran lieferte der Versuch die Zellen im Anschluss an die Rosette-Sep- und EPISPOT-Prozedur weiter zu kultivieren. Während die unbehandelten HT29-

Zellen erneut kultivierbar waren, konnten die mit Zytostatika versetzten HT29-Zellen aufgrund der geringen Zellzahl nicht wieder herangezogen werden.

In einem weiteren Versuch unter Verwendung verschiedener Oxaliplatin-Konzentrationen war hingegen bereits durch die halbe klinische Dosis ein deutlicherer Rückgang (67% und 49%) der Anzahl und der Fluoreszenzintensität der Spots zu beobachten. Eine mögliche Erklärung für diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnte zum einen darin liegen, dass die Auswertung der beiden Experimente mit unterschiedlichen Systemen (CellaVista-System, Roche bzw. ELISPOT-Axio Imager M1) erfolgt ist. Zum anderen wäre denkbar, dass sich die analysierten HT29-Zellen zum Zeitpunkt der Oxaliplatin-Zugabe in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befanden und folglich die Wirkung des Oxaliplatins, also eine Verlangsamung der S-Phase und schließlich eine Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase [183], unterschiedlich lange Expositionszeiten erforderte. Je länger der Zeitraum bis zum Einsetzen der zytostatischen Wirkung ist, desto mehr CK19 kann durch die Zelle freigesetzt und als Immunospot mit entsprechender Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Zum Die beschriebene Abnahme der Anzahl und Fluoreszenzintensität der detektierten Spots nach Oxaliplatin-Zugabe war unter Einwirkung der 10fachen klinischen Oxaliplatin-Dosis mit 77% und 69% am stärksten. Der geringste Effekt konnte jedoch nicht mit der einer 1/2fachen, sondern mit einer 2fachen klinischen Oxaliplatin-Dosis beobachtet werden. Folglich konnte zwar die Wirkung bereits der 1/2fachen Oxaliplatin-Dosis auf die HT29-Zellen und die resultierenden CK19-Immunsots, jedoch keine direkte Anhängigkeit zwischen der Oxaliplatinkonzentration und dem negativen Effekt auf die Immunsots nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu HT29-Zellen zeigten die HT29-OxR-Zellen nach Zugabe der verschiedenen Oxaliplatin-Konzentrationen eine geringere Abnahme der Anzahl (11-39%) und Fluoreszenzintensität (19-40%) der Immunsots. Insgesamt konnten deutlichere Unterschiede zwischen den HT29- und HT29OxR-Zellen in Bezug auf die Immunospotanzahl als auf die Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden. Eine Veränderung der Spotgröße/-fläche konnte mit der für dieses Experiment verwendeten Auswertungsmethode (CellaVista System, Roche Diagnostics) nicht ermittelt werden.

Zusammenfassend scheint die Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener Zytostatika mit Hilfe des CK19-EPISPOT möglich zu sein. Als Grundlage für die Feststellung des

zytotoxischen Effektes einer Substanz sollte die Anzahl und/oder die Fläche der detektierten Immunospots dienen, da bezüglich dieser Parameter die deutlichste Abnahme unter Zytostatika-Exposition sowie der größte Unterschied zwischen HT29- und HT29OxR-Zellen zu beobachten war. Inwieweit dieser Zytotoxizitäts-Assay zur Analyse einer geringen Anzahl CK19-sekretierender Zellen (1-100) anwendbar ist, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Des Weiteren ist die Analyse von Blutproben von Tumorpatienten zunächst die Durchführung von Validierungsexperimenten mit Patientenproben erforderlich.

4.4. Ausblick

Bezüglich der Analyse einzelner, mit Hilfe des *CellSearch*-Systems detektierter CTCs könnten zukünftig vergleichende molekulare Analysen des Primärtumors, der CTCs und ggf. vorhandener Metastasen weitere wertvolle Informationen über die molekularen Grundlagen des Metastasierungsprozesses liefern sowie die Identifizierung eines Genotyps ermöglichen, der mit der Fähigkeit zur Disseminierung und Metastasierung assoziiert ist. Die Analyse des Primärtumors- und/oder der Metastase sollte hierbei aus mehreren verschiedenen Regionen der Tumormasse erfolgen, um die Wahrscheinlichkeit für die Detektion kleiner, zur Disseminierung befähigter Subpopulationen zu erhöhen sowie eine genauere Aussage über die Heterogenität des Tumors treffen zu können. Durch die Anwendung von sogenannten *Deep Sequencing*-Methoden könnte zudem ein breiteres Spektrum an Mutationen sowohl in einzelnen CTCs als auch in den dazugehörigen Tumorgeweben analysiert werden.

Durch weiterführende bioinformatische Analysen der erhaltenen aCGH-Daten einzelner CTCs könnten in den identifizierten CTC-typischen veränderten Chromosomenregionen spezifische Gene identifiziert werden, die eine Rolle im Disseminierungsvorgang spielen könnten und folglich als Zielgene für zukünftige gerichtete Therapieansätze in Erwägung gezogen werden.

Die Beseitigung bzw. die Minimierung der kritischen Faktoren der Einzelzell-Analyse von mit Hilfe des *CellSearch*-Systems detektierten CTCs mit dem Ziel, auch Analyse von CTCs aus Patienten mit geringer Anzahl detektierter CTCs zu ermöglichen und die

Einsetzbarkeit der WGA-Produkte für die verschiedenen Folgeapplikationen zu erhöhen, sollte im Mittelpunkt zukünftiger Forschungsansätze stehen. So sollten zum einen Optimierungsversuche des Zelltransfers aus der *CellSearch*-Kartusche auf den Objektträger sowie eine Austestung weiterer, neuentwickelter WGA-Kits zur Amplifikation der gesamtgenomischen DNA der Einzelzellen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte jedoch auch der Einsatz von alternativen Anreicherungs- und Detektionsmethoden, die eine höhere CTC-Detektionsrate als das *CellSearch*-System aufweisen oder die CTC-Anreicherung aus einem größeren Blutvolumen erlauben in Betracht gezogen werden um mehr CTCs für die Einzelzell-Analyse zugänglich zu machen.

Insgesamt könnte die Einzelzell-Analyse von CTCs mit weiter optimierten Techniken zur Entwicklung von patientenindividuellen Therapiemaßnahmen sowie der Identifikation neuer Zielmoleküle zur Behandlung von Krebserkrankungen beitragen.

Bezüglich des entwickelten Zytotoxizitätsassays muss zunächst eine Validierung dieser Methode mit Patientenmaterial erfolgen. Ein weiterer nächster Schritt könnte außerdem die Etablierung eines dualen EPISPOT-Assay mit CK19 und einem Apoptosemarker (z.B. M30) sein, um die Detektion der Wirksamkeit von Zytostatika erleichtern zu können. Mit Hilfe dieser Technik wäre es möglich die Abnahme der CK19-Sekretion und die Zunahme der Sekretion des Apoptosemarkers parallel in einer individuellen Zelle zu detektieren und folglich das Absterben dieser Zelle eindeutig nachzuweisen. Eine derartige Untersuchung der Wirksamkeit von Zytostatika auf lebensfähige CTCs, könnte zukünftig zur Einschätzung des Erfolges verschiedener Therapieansätze für Krebspatienten eingesetzt werden und folglich die Verabreichung von effizienteren, auf den individuellen Patienten abgestimmten Therapien unterstützen.

4. Literatur

1. Weinberg RA: The Biology of Cancer. *Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC* 2007, 1. Auflage.
2. Böcker W: Pathologie. *Elsevier Verlag* 2000, 2. Auflage.
3. Willms A: Früh- und Langzeitergebnisse nach Resektion von Lebermetastasen kolorektaler Tumoren. *Dissertation* 2011, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München.
4. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A, Group EGW: Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Ann Oncol* 2010, 21 Suppl 5:v93-97.
5. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF *et al*: Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005, 16(1):102-108.
6. Shankaran V, Obel J, Benson AB, 3rd: Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *Oncologist* 2010, 15(2):157-167.
7. Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, Akram M, Chung KY, Yao D, Paty PB *et al*: Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2005, 18(10):1350-1356.
8. Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y: Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2004, 17(8):895-904.
9. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Janne PA, Carnaghi C, Calandri C, Bencardino K, Ligorio C, Ciardiello F, Pressiani T *et al*: EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2008, 19(4):717-723.
10. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000, 19(13):3159-3167.
11. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2(2):127-137.
12. Lee J, Moon C: Current status of experimental therapeutics for head and neck cancer. *Exp Biol Med* 2011, 236: 375-389.
13. Samaga R, Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Sorger PK, Klamt S: The logic of EGFR/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data. *PLoS Comput Biol* 2009, 5(8):e1000438.
14. Ruschoff J, Roggendorf B, Brasch F, Mathiak M, Aust DE, Plaschke J, Mueller W, Poremba C, Kloor M, Keller G *et al*: [Molecular pathology in hereditary colorectal cancer. Recommendations of the Collaborative German Study Group on hereditary colorectal cancer funded by the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe)]. *Pathologe* 2004, 25(3):178-192.
15. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988, 319(9):525-532.
16. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C: The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(9):695-701.
17. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD: Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 1998, 185(2):130-138.
18. Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, Russo A, Bazan V, Tomasino RM, Colomba P, Tagliavia M, La Farina M: Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 325(3):784-791.
19. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J: Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001, 93(3):346-352.

20. Karamitopoulou E, Zlobec I, Panayiotides I, Patsouris ES, Peros G, Rallis G, Lapas C, Karakitsos P, Terracciano LM, Lugli A: Systematic analysis of proteins from different signaling pathways in the tumor center and the invasive front of colorectal cancer. *Hum Pathol* 2011, 42(12):1888-1896.
21. Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, Kim SI, Choi HJ, Paik S, Pogue-Geile KL: A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC Cancer* 2010, 10:101.
22. Iacopetta B: TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 2003, 21(3):271-276.
23. Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP: APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(7):3352-3357.
24. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR: Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(14):9433-9438.
25. Lynch HT, de la Chapelle A: Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003, 348(10):919-932.
26. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, Group TCCS: The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005, 23(30):7518-7528.
27. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P *et al*: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010, 11(8):753-762.
28. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S *et al*: Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(35):5705-5712.
29. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S *et al*: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008, 359(17):1757-1765.
30. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R *et al*: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(10):1626-1634.
31. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A: Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009, 35(3):262-271.
32. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M *et al*: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006, 66(8):3992-3995.
33. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L *et al*: PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009, 69(5):1851-1857.
34. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A: Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005, 6(5):279-286.
35. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ: Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004, 22(7):1201-1208.
36. Katayama H, Sen S: Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1799(10-12):829-839.
37. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C *et al*: A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998, 17(11):3052-3065.
38. Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK: Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2006, 12(23):6869-6875.

39. Nishida N, Nagasaka T, Kashiwagi K, Boland CR, Goel A: High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers. *Cancer Biol Ther* 2007, 6(4):525-533.
40. Erisman MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM, Astrin SM: Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol Cell Biol* 1985, 5(8):1969-1976.
41. Rochlitz CF, Herrmann R, de Kant E: Overexpression and amplification of c-myc during progression of human colorectal cancer. *Oncology* 1996, 53(6):448-454.
42. Spencer CA, Groudine M: Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991, 56:1-48.
43. Tanese K, Fukuma M, Yamada T, Mori T, Yoshikawa T, Watanabe W, Ishiko A, Amagai M, Nishikawa T, Sakamoto M: G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation. *Am J Pathol* 2008, 173(3):835-843.
44. Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M: Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci* 2010, 101(7):1731-1737.
45. Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S: Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology* 2003, 37(3):528-533.
46. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ *et al*: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007, 449(7165):1003-1007.
47. Haegebarth A, Clevers H: Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol* 2009, 174(3):715-721.
48. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K: Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 2012.
49. Mehlen P, Puisieux A: Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(6):449-458.
50. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M: Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010, 101(2):293-299.
51. Dorudi S, Sheffield JP, Poulsom R, Northover JM, Hart IR: E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1993, 142(4):981-986.
52. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG: E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003, 5(6):R217-222.
53. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009, 139(5):871-890.
54. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J: Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008, 68(4):989-997.
55. Ahmad A, Hart IR: Biology of tumor micrometastasis. *J Hematother* 1996, 5(5):525-535.
56. Maheswaran S, Haber DA: Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev* 2010, 20(1):96-99.
57. Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(6):448-456.
58. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(8):563-572.
59. Fidler IJ: L-asparaginase and metastasis. *Lancet* 1970, 1(7650):777-778.
60. Liotta LA, Kohn E: Cancer invasion and metastases. *JAMA* 1990, 263(8):1123-1126.
61. Bernards R, Weinberg RA: A progression puzzle. *Nature* 2002, 418(6900):823.
62. Fidler IJ, Kripke ML: Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977, 197(4306):893-895.
63. Klein CA: Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(4):302-312.
64. Mathiesen RR, Fjellidal R, Liestol K, Due EU, Geigl JB, Riethdorf S, Borgen E, Rye IH, Schneider IJ, Obenauf AC *et al*: High-resolution analyses of copy number changes in disseminated tumor cells of patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2012, 131(4):E405-415.

65. Gubitosi A, Moccia G, Malinconico FA, Gilio F, Iside G, Califano UG, Foroni F, Ruggiero R, Docimo G, Parmeggiani D *et al*: Unusual metastasis of left colon cancer: considerations on two cases. *Acta Biomed* 2009, 80(1):80-82.
66. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B: Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008, 8(5):329-340.
67. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC *et al*: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(19):3213-3221.
68. Cristofanilli M: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2006, 33(3 Suppl 9):S9-14.
69. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14(19):6302-6309.
70. Rink M, Chun FK, Minner S, Friedrich M, Mauermann O, Heinzer H, Huland H, Fisch M, Pantel K, Riethdorf S: Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int* 2011, 107(10):1668-1675.
71. Vashist YK, Effenberger KE, Vettorazzi E, Riethdorf S, Yekebas EF, Izbicki JR, Pantel K: Disseminated tumor cells in bone marrow and the natural course of resected esophageal cancer. *Ann Surg* 2012, 255(6):1105-1112.
72. Vogel I, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Kremer B: Detection and prognostic impact of disseminated tumor cells in pancreatic carcinoma. *Pancreatology* 2002, 2(2):79-88.
73. Wolffe U, Muller V, Pantel K: Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance. *Future Oncol* 2006, 2(4):553-561.
74. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S: Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009, 6(6):339-351.
75. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-Salomon A, Marty M: Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res* 2008, 14(21):7004-7010.
76. Uen YH, Lin SR, Wu DC, Su YC, Wu JY, Cheng TL, Chi CW, Wang JY: Prognostic significance of multiple molecular markers for patients with stage II colorectal cancer undergoing curative resection. *Ann Surg* 2007, 246(6):1040-1046.
77. Sadahiro S, Suzuki T, Maeda Y, Yurimoto S, Yasuda S, Makuuchi H, Kamijo A, Murayama C: Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA-expressing cells in peripheral blood 7 days after curative surgery is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007, 14(3):1092-1098.
78. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, Adachi M, Mori M, Sasako M: Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 2006, 28(2):297-306.
79. Sadahiro S, Suzuki T, Ishikawa K, Saguchi T, Maeda Y, Yasuda S, Makuuchi H, Yurimoto S, Murayama C: Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA-expressing cells in portal and peripheral blood during surgery does not influence relapse in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2005, 12(12):988-994.
80. Kienle P, Koch M, Autschbach F, Benner A, Treiber M, Wannenmacher M, von Knebel Doeberitz M, Buchler M, Herfarth C, Weitz J: Decreased detection rate of disseminated tumor cells of rectal cancer patients after preoperative chemoradiation: a first step towards a molecular surrogate marker for neoadjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Surg* 2003, 238(3):324-330; discussion 330-321.
81. Sadahiro S, Suzuki T, Tokunaga N, Yurimoto S, Yasuda S, Tajima T, Makuuchi H, Murayama C, Matsuda K: Detection of tumor cells in the portal and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma using competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 2001, 92(5):1251-1258.
82. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA: Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 2011, 192(3):373-382.
83. Lianidou ES: Circulating tumor cells--new challenges ahead. *Clin Chem* 2012, 58(5):805-807.

84. Pantel K, Alix-Panabieres C: Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010, 16(9):398-406.
85. Alix-Panabieres C: EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012, 195:69-76.
86. Alix-Panabieres C, Rebillard X, Brouillet JP, Barbotte E, Iborra F, Segui B, Maudelonde T, Jolivet-Reynaud C, Vendrell JP: Detection of circulating prostate-specific antigen-secreting cells in prostate cancer patients. *Clin Chem* 2005, 51(8):1538-1541.
87. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V, Fabbro M, Pantel K: Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 2007, 53(3):537-539.
88. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F *et al*: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007, 13(3):920-928.
89. Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G: Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 2009, 10(3):233-239.
90. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, Garcia-Saenz JA, Vidaurreta M, Martin M, Arroyo M *et al*: Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol* 2008, 19(5):935-938.
91. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJ, Vos AH, Nagtegaal ID, Terstappen LW, Punt CJ: Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol* 2010, 21(5):1006-1012.
92. Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, Timens W, Boezen HM, Liesker JJ, Schouwink JH, Wijnands WJ, Kerner GS, Kruijt FA *et al*: Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol* 2012.
93. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S *et al*: Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008, 15(11):3092-3100.
94. Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, Veganzones SB, Vidaurreta M, Martin M, Olivier C, VB DELO, Garcia-Saenz JA, Alfonso R *et al*: Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Res* 2009, 29(11):4839-4843.
95. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I *et al*: Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010, 16(9):2634-2645.
96. Alix-Panabieres C, Brouillet JP, Fabbro M, Yssel H, Rousset T, Maudelonde T, Choquet-Kastylevsky G, Vendrell JP: Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J Immunol Methods* 2005, 299(1-2):177-188.
97. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Slijper M, Pelle 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.
98. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A: A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983, 65(1-2):109-121.
99. Islam S, Kjallquist U, Moliner A, Zajac P, Fan JB, Lonnerberg P, Linnarsson S: Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 2011, 21(7):1160-1167.
100. Moon S, Kim YG, Dong L, Lombardi M, Haeggstrom E, Jensen RV, Hsiao LL, Demirci U: Drop-on-demand single cell isolation and total RNA analysis. *PLoS One* 2011, 6(3):e17455.
101. Tang F, Barbacioru C, Nordman E, Li B, Xu N, Bashkirov VI, Lao K, Surani MA: RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc* 2010, 5(3):516-535.
102. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A *et al*: mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009, 6(5):377-382.
103. Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, Speicher MR: High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 2007, 35(3):e15.

104. Fuhrmann C, Schmidt-Kittler O, Stoecklein NH, Petat-Dutter K, Vay C, Bockler K, Reinhardt R, Ragg T, Klein CA: High-resolution array comparative genomic hybridization of single micrometastatic tumor cells. *Nucleic Acids Res* 2008, 36(7):e39.
105. Geigl JB, Speicher MR: Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis. *Nat Protoc* 2007, 2(12):3173-3184.
106. Imle A, Polzer B, Alexander S, Klein CA, Friedl P: Genomic instability of micronucleated cells revealed by single-cell comparative genomic hybridization. *Cytometry A* 2009, 75(7):562-568.
107. Langer S, Geigl JB, Gangnus R, Speicher MR: Sequential application of interphase-FISH and CGH to single cells. *Lab Invest* 2005, 85(4):582-592.
108. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA: Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 2005, 8(3):227-239.
109. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P *et al*: From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(13):7737-7742.
110. Hannemann J, Meyer-Staeckling S, Kemming D, Alpers I, Joosse SA, Pospisil H, Kurtz S, Gorndt J, Puschel K, Riethdorf S *et al*: Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells. *PLoS One* 2011, 6(11):e26362.
111. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992, 10(4):413-417.
112. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993, 11(9):1026-1030.
113. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74(12):5463-5467.
114. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992, 258(5083):818-821.
115. Urban AE, Korbel JO, Selzer R, Richmond T, Hacker A, Popescu GV, Cubells JF, Green R, Emanuel BS, Gerstein MB *et al*: High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(12):4534-4539.
116. Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, Hoffmann EM, Auer M, Hormann M, Fischer M, Trajanoski Z, Schenk MA, Baumbusch LO *et al*: Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(15):e105.
117. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
118. van Beers EH, Joosse SA, Ligtenberg MJ, Fles R, Hogervorst FB, Verhoef S, Nederlof PM: A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer* 2006, 94(2):333-337.
119. Meyer-Staekling S: Untersuchungen zur Struktur eines Amplikons im Intron 1 des humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors: Erstmutationen in der Mammakarzinom-Entstehung. *Dissertation im Department Biologie der Universität Hamburg* 2009.
120. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr.: Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 2001, 35:501-538.
121. Agelopoulos K, Schmidt H, Korsching E, Buerger H, Brandt B: [Different coexisting genotypes in the breast cancer cell line MDA-MB-468]. *Pathologie* 2008, 29 Suppl 2:333-337.
122. Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, Buick RN: MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 128(2):898-905.
123. Lebeau J, Goubin G: Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in the BT20 breast carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1987, 40(2):189-191.
124. Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY: Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncol Lett* 2011, 2(6):1131-1137.
125. Ignatiadis M, Rothe F, Chaboteaux C, Durbecq V, Rouas G, Criscitiello C, Metallo J, Kheddoumi N, Singhal SK, Michiels S *et al*: HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One* 2011, 6(1):e15624.
126. Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM: ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 1995, 55(22):5400-5407.

127. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW: ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(12):5321-5325.
128. 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, 15(2):261-273.
129. Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009, 119(6):1420-1428.
130. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF: Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007, 58:267-284.
131. Dean M, Fojo T, Bates S: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(4):275-284.
132. Wicha MS, Liu S, Dontu G: Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006, 66(4):1883-1890; discussion 1895-1886.
133. Rack B, Andergassen U, Neugebauer J, Salmen J, Hepp P, Sommer H, Lichtenegger W, Friese K, Beckmann MW, Hauner D *et al*: The German SUCCESS C Study - The First European Lifestyle Study on Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2010, 5(6):395-400.
134. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW: Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004, 10(20):6897-6904.
135. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, Allard WJ, Bilbee M, Cheng JD, Hoffman JP *et al*: Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006, 6(2):125-132.
136. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC *et al*: Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009, 20(7):1223-1229.
137. Thorsteinsson M, Soletormos G, Jess P: Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer. *Anticancer Res* 2011, 31(2):613-617.
138. Jiao LR, Apostolopoulos C, Jacob J, Szydlo R, Johnson N, Tsim N, Habib NA, Coombes RC, Stebbing J: Unique localization of circulating tumor cells in patients with hepatic metastases. *J Clin Oncol* 2009, 27(36):6160-6165.
139. Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA, Jr., Raben D: Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007, 6(6):1683-1691.
140. Mego M, De Giorgi U, Hsu L, Ueno NT, Valero V, Jackson S, Andreopoulou E, Kau SW, Reuben JM, Cristofanilli M: Circulating tumor cells in metastatic inflammatory breast cancer. *Ann Oncol* 2009, 20(11):1824-1828.
141. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA: Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 118(3):455-468.
142. Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, Bischoff FZ, Pircher TJ: Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol* 2011, 2011:252361.
143. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE: Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010, 16(3):790-799.
144. Vermaat JS, Nijman IJ, Koudijs MJ, Gerritse FL, Scherer SJ, Mokry M, Roessingh WM, Lansu N, de Bruijn E, van Hillegersberg R *et al*: Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res* 2012, 18(3):688-699.
145. Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT *et al*: Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 2008, 13(5):441-453.
146. Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, Sermon K: Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nat Protoc* 2006, 1(4):1965-1970.

147. Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S, Staessen C, Moreau Y, Fryns JP, Van Steirteghem A *et al*: Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006, 34(9):e68.
148. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G: Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002, 360(9334):683-689.
149. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G: Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(8):4494-4499.
150. Pantel K, Deneve E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-Panabieres C: Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012, 58(5):936-940.
151. Aragane H, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T, Inazawa J *et al*: Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 2001, 94(5):623-629.
152. Parada LA, Maranon A, Hallen M, Tranberg KG, Stenram U, Bardi G, Johansson B: Cytogenetic analyses of secondary liver tumors reveal significant differences in genomic imbalances between primary and metastatic colon carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 1999, 17(6):471-479.
153. Takanishi DM, Jr., Kim SY, Kelemen PR, Yaremko ML, Kim AH, Ramesar JE, Horrigan SK, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA: Chromosome 8 Losses in Colorectal Carcinoma: Localization and Correlation With Invasive Disease. *Mol Diagn* 1997, 2(1):3-10.
154. Bruin SC, Klijn C, Liefers GJ, Braaf LM, Joosse SA, van Beers EH, Verwaal VJ, Morreau H, Wessels LF, van Velthuisen ML *et al*: Specific genomic aberrations in primary colorectal cancer are associated with liver metastases. *BMC Cancer* 2010, 10:662.
155. Killian A, Di Fiore F, Le Pessot F, Blanchard F, Lamy A, Raux G, Flaman JM, Paillet B, Michel P, Sabourin JC *et al*: A simple method for the routine detection of somatic quantitative genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007, 132(2):645-653.
156. Cammareri P, Scopelliti A, Todaro M, Eterno V, Francescangeli F, Moyer MP, Agrusa A, Dieli F, Zeuner A, Stassi G: Aurora-a is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Cancer Res* 2010, 70(11):4655-4665.
157. Marumoto T, Zhang D, Saya H: Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(1):42-50.
158. Kruszewski W, Kowara R, Rzepko R, Warezak C, Zielinski J, Gryglewski G, Kopacz A, Jastrzebski T, Pawelczyk T: K-RAS point mutation, and amplification of C-MYC and C-ERBB2 in colon adenocarcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2004, 42(3):173-179.
159. Masramon L, Arribas R, Tortola S, Peruchio M, Peinado MA: Moderate amplifications of the c-myc gene correlate with molecular and clinicopathological parameters in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998, 77(12):2349-2356.
160. Kleivi K, Teixeira MR, Eknaes M, Diep CB, Jakobsen KS, Hamelin R, Lothe RA: Genome signatures of colon carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2004, 155(2):119-131.
161. Steiner MG, Harlow SP, Colombo E, Bauer KD: Chromosomes 8, 12, and 17 copy number in Astler-Coller stage C colon cancer in relation to proliferative activity and DNA ploidy. *Cancer Res* 1993, 53(3):681-686.
162. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmuller G *et al*: Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008, 13(1):58-68.
163. Link KH, Aigner KR, Peschau K, Warthona M, Schwemmle K, Danenberg PV: Concentration and time dependence of the toxicity of fluorinated pyrimidines to HT 29 colorectal carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988, 22(1):58-62.
164. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, Ellis LM: Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006, 12(14 Pt 1):4147-4153.
165. Hou F, Yuan W, Huang J, Qian L, Chen Z, Ge J, Wu S, Chen J, Wang J: Overexpression of EphA2 correlates with epithelial-mesenchymal transition-related proteins in gastric cancer and their prognostic importance for postoperative patients. *Med Oncol* 2011.
166. LaGamba D, Nawshad A, Hay ED: Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dyn* 2005, 234(1):132-142.

-
167. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F: Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011, 105(9):1338-1341.
 168. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH *et al*: Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2009, 69(7):2887-2895.
 169. Zeisberg M, Neilson EG: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009, 119(6):1429-1437.
 170. Singh A, Settleman J: EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010, 29(34):4741-4751.
 171. Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G, 2nd, Samuel S, Kim MP, Lim SJ, Ellis LM: Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* 2009, 69(5):1951-1957.
 172. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007, 1(3):313-323.
 173. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007, 445(7123):111-115.
 174. Shimada M, Sugimoto K, Iwahashi S, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T: CD133 expression is a potential prognostic indicator in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol* 2010, 45(8):896-902.
 175. Sun Y, Kong W, Falk A, Hu J, Zhou L, Pollard S, Smith A: CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PLoS One* 2009, 4(5):e5498.
 176. Navarro-Alvarez N, Kondo E, Kawamoto H, Hassan W, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Nakahara H, Hayashi T, Nishikawa Y *et al*: Isolation and propagation of a human CD133(-) colon tumor-derived cell line with tumorigenic and angiogenic properties. *Cell Transplant* 2010, 19(6):865-877.
 177. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L *et al*: CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 2008, 122(4):761-768.
 178. Wu Y, Wu PY: CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* 2009, 18(8):1127-1134.
 179. Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ, Silvany RE, Henkemeyer M, Frisen J: EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 2006, 125(6):1151-1163.
 180. Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Yokota H, Shiroy A, Nakase H, Hirabayashi H, Oujii Y, Birumachi J *et al*: Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Stem Cells* 2003, 21(2):171-180.
 181. Willis ND, Wilson RG, Hutchison CJ: Lamin A: a putative colonic epithelial stem cell biomarker which identifies colorectal tumours with a more aggressive phenotype. *Biochem Soc Trans* 2008, 36(Pt 6):1350-1353.
 182. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A: CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008, 99(8):1285-1289.
 183. William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G: Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res* 2006, 26(3A):2093-2099.

Anhang I

Geräte

Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage CPA224S-OCE
 Analysenwaage Satorius CP2245
 Electrophoresis Power Supply P53002
 Filmentwickler Model Hyperprocessor
 Geldokumentations-System GeneGenius 2
 Gelkammer ComPhor L Mini/Midi
 GeneAmp PCR System 9700
 Genetic Analyzer 3130 Hitachi
 Gießstand Hoefer
 Mastercycler ep gradient
 Mikroinjektor Cell Tram vario
 Nanodrop ND100 Spectrometer
 Neubauer-Zählkammer
 Photometer 6131
 Realplex⁴ Mastercycler epgradient S
 Rollmischer Stuart SRT1
 Schüttler Rotamax 120
 Semidry Blotapparatur
 Sonicator UP50H
 Sterilbank Herasafe HS12
 Thermomixer „kompakt“
 TransferMan NK2, Mikromanipulator
 Vortex Genie 2
 Wasserbad GFL-1002/03
 Zellkulturinkubator Hera cell 150

Sartorius AG, Göttingen, D
 MS Laborgeräte, Heidelberg, D
 Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
 Amersham Biosciences, Freiburg, D
 Syngene, Cambridge, UK
 Biozym Scientific; Oldendorf, D
 Applied Biosystems, California, CA, USA
 Applied Biosystems, Mannheim, D
 Hoefer Amersham Biosciences, Freiburg
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 PeqLab, Erlangen, D
 Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen, D
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
 Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, D
 Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
 Dr. Hielscher GmbH, Teltow, D
 Heraeus Kendro, Langenselbold, D
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 Scientific Industries, New York, NY, USA
 GmbH für Labortechnik, Burgwedel, D
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Zentrifugen

Biofuge pico Heraeus
 Heraeus Multifuge 3SR
 Kühlzentrifuge 5417R
 Tischzentrifuge Rotofix 32
 Zytozentrifuge

Heraeus Kendro, Langenselbold, D
 Heraeus Kendro, Langenselbold, D
 Eppendorf AG, Hamburg, D
 Hettich, Tutlingen, D
 Hettich, Tutlingen, D

Mikroskope

Axiovert 200 inverted microscope
 Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzkanal
 und Kamerasystem
 Durchlichtmikroskop, Wilovert S
 Durchlichtmikroskop (Zellkultur)

Carl Zeiss AG, Jena, D
 Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar, D
 Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
 Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D

Anhang II

Chemikalien und Reagenzien

Acrylamidlösung (30%)	Serva, Heidelberg, D
Aqua (ad injectibilia)	Baxter SA, Lessines, NL
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako, Glostrup, DK
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg, D
Desoxynucleoside Triphosphate Set (dNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dulbecco's PBS-Puffer (1 x)	Gibco, Eggenstein, D
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol absolut (zur Analyse)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycergel mounting medium	Dako, Glostrup, DK
Ficoll	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Glycergel Mounting Medium	Dako, Glostrup, DK
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Mannheim, D
Humane COT DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Mayers-Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D
N, N Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, D
Neufuchsin	Serva, Heidelberg, D
Nonidet P-40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, D
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt, D
Seakem LE Agarose	Lonza, Rockland, USA
TMAC (Tetraethylammoniumchlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton x 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (25%)	Gibco, Eggenstein, D
Tween-20	Merck, Darmstadt
Vectashield® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Anhang III

Primer

Primerbezeichnung	Sequenz	Amplifikatlänge	Annealing-Temperatur
Primer für 1CHR MPLX-PCR			
GAPDH_100_F	GTTCCAATATGATTCCACCC	100 bp	56 °C
GAPDH_100_R	CTCCTGGAAGATGGTGATGG		56 °C
GAPDH_200_F	AGGTGGAGCGAGGCTAGC	200 bp	56 °C
GAPDH_200_R	TTTTGCGGTGGAAATGTCCT		56 °C
GAPDH_300_F	AGGTGAGACATTCTTGCTGG	300 bp	56 °C
GAPDH_300_R	TCCACTAACCAGTCAGCGTC		56 °C
GAPDH_400_F	ACAGTCCATGCCATCACTGC	400 bp	56 °C
GAPDH_400_R	GCTTGACAAAGTGGTCGTTG		56 °C
Primer zur Detektion von Genamplifikationen (qPCR)			
Line1_F	AAAGCCGCTCAACTACATGG	149 bp	60 °C
Line1_R	TGCTTTGAATGCGTCCCAGAG		60 °C
EGFR_E8_F	CACCGTCATCACCTTCCTTTC	107 bp	60 °C
EGFR_E8_R	TCCTCCATCTCATAGCTGTCG		60 °C
Her2_E/I20_F	GAACTGGTGTATGCAGATTGC	97 bp	60 °C
Her2_E/I20_R	AGCAAGAGTCCCCATCCTA		60 °C
LGR5_E1_F	TCAGCGTCTTCACCTCCTACCTG	95 bp	60 °C
LGR5_E1_R	CTCCAGCCTCGCCTTGAC		60 °C
AURKA_I4_F	GTCCTTCTTTGTCGTCGTTG	130 bp	60 °C
AURKA_I4_R	GGCAGACACTGTTACTTCAAC		60 °C
C-MYC_E2_F	AGCTGCTGGGAGGAGACAT	103 bp	60 °C
C-MYC_E2_R	AAGCCGCTCCACATACAGTC		60 °C
Primer für 4CHR MPLX-PCR			
Her2_E27_F	CAGCCCAGCCTTCGACAAC	97 bp	56 °C
Her2_E27_R	GTTCTCTGCCGTAGGTGTC		56 °C
LGR5_E1_F	CTGTAATGTTCTACTGCAGAC	201 bp	56 °C
LGR_E1_R	GCTTAGGCAATTAACCAAAC		56 °C
EGFR_E8_MPLX_F	CACCTGTATTGTCCACATTG	318 bp	56 °C
EGFR_E8_MPLX_R	CTTCGCACTTCTTACACTTG		56 °C
AURKA_I4_MPLX_F	GTGACTCAGCAATTCCTTG	400 bp	56 °C
AURKA_I4_R	GGCAGACACTGTTACTTCAAC		56 °C

Primer zur Mutationsanalyse

P53_E5/6_F	CACTTGTGCCCTGACTTTC	477 bp	59 °C
P53_E5/6_R	ACTGACAACCACCCTTAACC		59 °C
P53_E7_F	CTGCTTGCCACAGGTCTC	267 bp	59 °C
P53_E7_R	TGGAAGAAATCGGTAAGAGG		59 °C
P53_E8/9_F	CCTGGAGCTGGAGCTTAG	448 bp	59 °C
P53_E8/9_R	CCAAGACTTAGTACCTGAAGG		59 °C
KRAS_C12/13_F	GTACTGGTGGAGTATTTGATAG	342 bp	56 °C
KRAS_C12/13_R	CAAGGTACATTTTCAGATAACTTAAC		56 °C
KRAS_C61_F	CACTGTAATAATCCAGACTGTG	255 bp	56 °C
KRAS_C61_R	CTCCTTAATGTCAGCTTATTATATTC		56 °C
BRAF_C600_F	TCCTTTACTTACTACACCTCA	206 bp	56 °C
BRAF_C600_R	CTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG		56 °C
PIK3CA_C542-546_F	GACTAGAGACAATGAATTAAGGG	192 bp	56 °C
PIK3CA_C542-546_R	TGAGATCAGCCAAATTCAG		56 °C
PIK3CA_C1047_F	CAGGAGATGTGTTACAAGGC	361 bp	56 °C
PIK3CA_C1047_R	GTGCAATTCCTATGCAATCG		56 °C

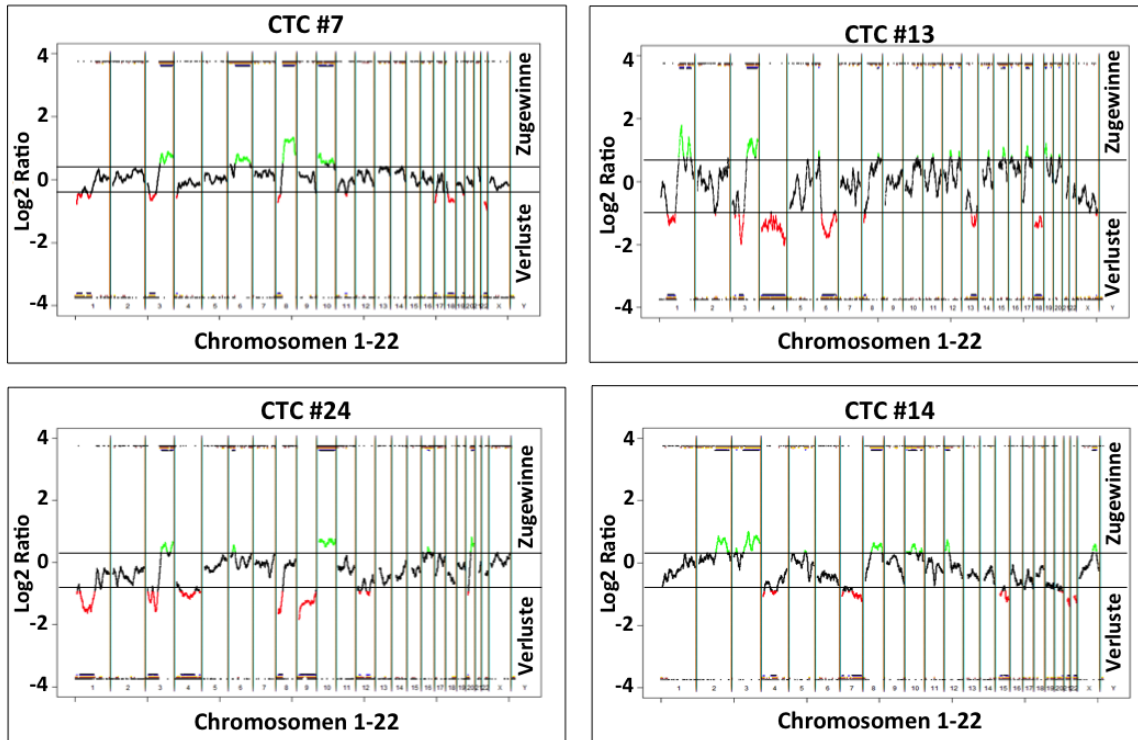
Primer zur Genexpressionsanalyse

B2M_F	GCATCTTCAAACCTCCATGATGCTG	102 bp	60 °C
B2M_R	GCATCTTCAAACCTCCATGATGCTG		60 °C
CD133_F	AGTCCATGGCAACAGCGATC	76 bp	60 °C
CD133_R	TGGTGCAAGCTCTTCAAGGTG		60 °C

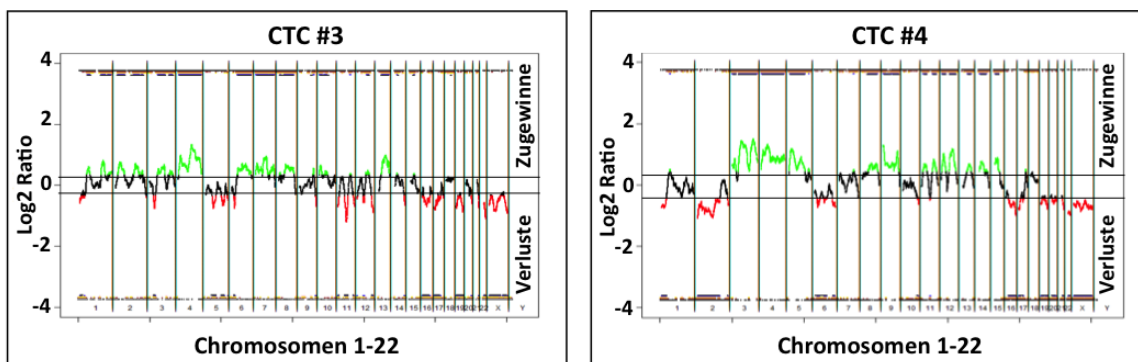
Anhang IV

Array-CGH-Profil von einzelnen Patienten-CTCs

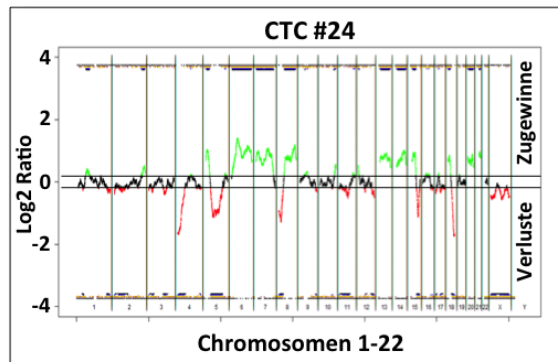
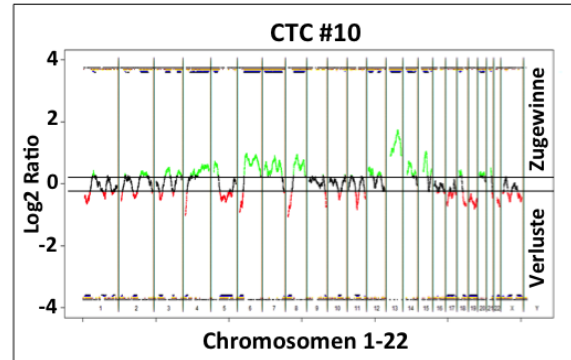
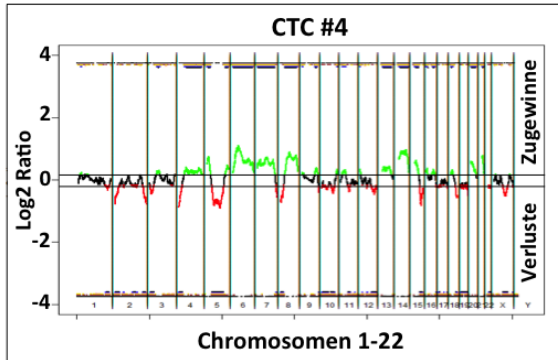
CTC des Patienten B#6



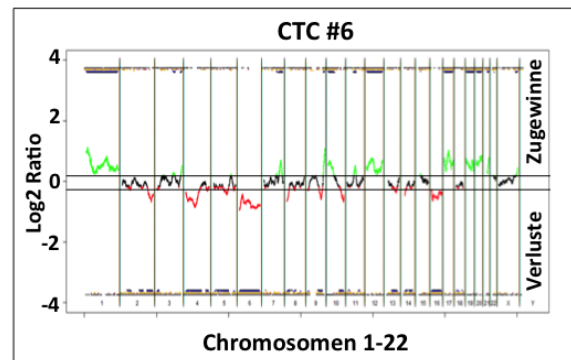
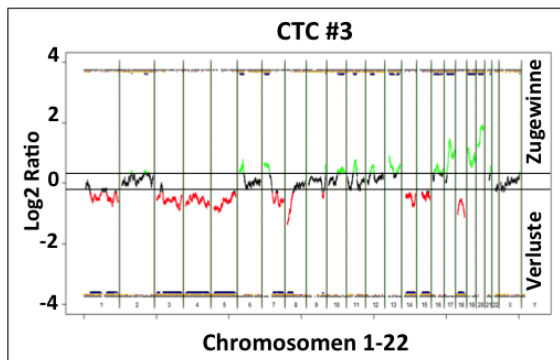
CTC des Patienten B#18



CTC des Patienten B#9



CTC des Patienten B#22



Anhang V

Detaillierte Übersichten der Ergebnisse der Mutationsanalyse von einzelnen Patienten-CTCs

Patient B#9 Teil I												Patient B#10											
CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen	CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Voramplifikate	Sequenzen
1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	6/8	6/6	6/6	1*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	2/8	2/2
2	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	6/7		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	0/8	-		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	7/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
7	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
8	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	5/5		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
9	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	0/8	-		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
10	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	4/8	4/4		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
11	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	1/8	1/1		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
12	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	0/8	-		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
13	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	6/8	6/6		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
14	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	6/8	6/6		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8

Patient B#18												Patient B#22											
CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen	CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen
1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	6/7	1*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	6/7
2	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	2/8	2/2		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	2/8	2/2
3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	7/7		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	7/7
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	5/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	5/8
5*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	5/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	5/8
6*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	5/5		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	5/5

Patient B#22												Patient B#22											
CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen	CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen
1*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	3/8	3/3	1*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	3/8	3/3
2*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	3/8	2/3		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	3/8	2/3
3*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	3/8	3/3		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	3/8	3/3
4*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	6/7		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	6/7
5*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	4/8	4/4		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	4/8	4/4
6*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	4/8	4/4		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	4/8	4/4
7*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	2/8	1/2		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	2/8	1/2
8*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	5/8	1/5	1/1		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	5/8	1/5	1/1
9*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	6/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	6/8
10*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	4/8		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	4/8
11*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	4/5		WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	5/8	4/5

Patient B#26 Teil II

CTC	P53_1	P53_2	P53_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Pä-Amplifkate	Sequenzen
20	WT	WT	WT	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
21		WT	282 R→W		WT	WT	545 E→A		8/8	5/8	5/5
22	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
23	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
24	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
25	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	545 E→A	WT	8/8	8/8	8/8
26	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
27	WT	WT						WT	8/8	5/8	3/5
28	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8

Patient B#26 Teil I

CTC	P53_1	P53_2	P53_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Pä-Amplifkate	Sequenzen
1									8/8	0/8	-
2									8/8	0/8	-
3							545 E→A	WT	8/8	2/8	2/2
4		WT							8/8	1/8	1/1
5	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
6	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
7		WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	7/8	7/7
8				WT	WT		WT	WT	8/8	4/8	4/4
9	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
10	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT		8/8	8/8	7/8
11									8/8	0/8	-
12									8/8	0/8	-
13	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
14	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
15	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
16	WT	WT	WT	WT	WT	WT		WT	8/8	8/8	7/8
17	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
18	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
19	WT	WT	282 R→W	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8

Patient B#38									
CTC	P53_1	P53_2	P53_3	P53_1	P53_2	P53_3	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Sequenzen
1							WT		3/8
2									0/8
3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8
4			WT	WT			545 E→A		8/8
5	WT	WT			WT		545 E→A		3/8
6	WT	WT			WT		545 E→A		8/8
7	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	6/6
8							WT	WT	6/6
9									8/8
10								WT	4/8
									0/1
									8/8
									6/8
Patient C#1									
CTC	P53_1	P53_2	P53_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Sequenzen
1						600 V→E	545 E→A		2/2
2					WT		545 E→A		2/2
3							WT		1/1
4							WT		0/8
Patient D#1									
CTC	P53_1	P53_2	P53_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Sequenzen
1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8
2	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8
3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8
Patient D#2									
CTC	P53_1	P53_2	P53_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Sequenzen
1	WT	WT		WT	WT	WT		WT	6/7
2	WT	WT	WT	WT	WT	WT		WT	8/8
									7/8
Patient D#3									
CTC	P53_1	P53_2	P53_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Sequenzen
1				WT	WT				2/2
2			WT	WT					3/8
3	WT	WT		12 G→V	WT	WT	545 E→A	WT	7/8

Patient D#4											
CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen
1									8/8	0/8	-
2				WT	WT	WT			8/8	4/8	4/4
3									8/8	0/8	-
4			289 R→K	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	6/8	6/6
5	WT	WT	273 R→C	WT		WT	WT	WT	8/8	7/8	7/7
6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
7									8/8	0/8	-
8	WT	WT	273 R→C	WT	WT	WT	WT		8/8	8/8	7/8
9		WT		WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	6/8
10	WT	WT	273 R→C	WT	WT	WT	WT	WT	8/8	8/8	8/8
11									8/8	1/8	0/1
12									8/8	0/8	-
13									8/8	1/8	0/1

Patient D#5											
CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen
1									8/8	0/8	-
2									8/8	0/8	-
3	WT	WT		WT	WT	WT	545 E→A		8/8	7/8	6/7
4	WT		WT	WT		WT		WT	8/8	7/8	5/7
5		WT	WT		WT		WT	WT	8/8	8/8	5/8

Patient D#6											
CTC	PS3_1	PS3_2	PS3_3	KRAS_1	KRAS_2	BRAF	PIK3CA_1	PIK3CA_2	Analysierte Zielregionen	Prä-Amplifikate	Sequenzen
1	WT	WT	WT	WT		WT		WT	8/8	8/8	6/8
2	WT	WT	WT		WT	WT	WT		8/8	8/8	6/8
3									8/8	0/8	-

Mutationsanalyse von Patientenzellen - Zusammenfassung

Patient	P53			KRAS			BRAF			PIK3CA		
	WT	MUT	n.a.	WT	MUT	n.a.	WT	MUT	n.a.	WT	MUT	n.a.
Graz #6 (38 CTC)	18	2	18	13	7	18	14	-	24	8	9	21
Graz #9 (14 CTC)	10	-	4	9	-	5	9	-	5	6	1	7
Graz #18 (6 CTC)	5	-	1	5	-	1	1	-	5	4	1	1
Graz #22 (11 CTC)	9	2	-	7	-	4	2	-	9	4	-	7
Graz #26 (28 CTC)	7	15	6	21	-	7	20	-	8	20	3	5
Graz #38 (10 CTC)	6	-	4	5	-	5	4	-	6	5	3	2
Chem #1 (4 CTC)	-	-	4	1	-	3	-	1	3	1	2	1
AI #1 (4 CTC)	4	-	-	4	-	-	4	-	-	4	-	-
AI #2 (2 CTC)	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
AI #3 (3 CTC)	2	-	1	2	1	-	1	-	2	-	1	2
AI #4 (13 CTC)	2	4	7	7	-	6	7	-	6	6	-	7
AI #5 (5 CTC)	3	-	2	3	-	2	2	-	3	2	1	2
AI #6 (3 CTC)	2	-	1	2	-	1	2	-	1	2	-	1

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen in netten Gesprächen danken.

Frau PD Dr. Sabine Riethdorf gilt ein besonderer Dank für die engagierte, vertrauensvolle Betreuung meiner Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich vor allem für die vielen schönen Zeiten bedanken, die wir in den letzten Jahren miteinander erlebt haben.

Herrn PD Dr. René Lorbiecke möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei unseren zahlreichen Kooperationspartnern: Herrn Prof. Dr. Emre Yekebas, Prof. Jakob Izbicki, Dr. Adrian Seifert sowie Dr. Matthias Reeh der Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des UKEs, Prof. Dr. Thomas Bauernhofer der Medizinischen Universität Graz, sowie PD Dr. S. Kaul des Klinikum Chemnitz für die Bereitstellung von Patientenproben und –daten.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Michael Speicher und Martina Auer danke ich für die Durchführung und Auswertung der Array-CGH-Analysen. Bei Frau Dr. Catherine Alix-Panabières möchte ich mich für die sehr nette Einführung in die EPISPOT-Technik und die Unterstützung bei der Datenauswertung bedanken. Frau Dr. Sabine Langer danke ich für die nette Zusammenarbeit und die Durchführung der Metaphasen-CGHs.

Conny Coith, Malgorzata Stoupiec, Antje Andreas und Oliver Mauermann danke ich für ihre engagierte Unterstützung im Labor.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere bei meinen Lieben Caro, Conny, Antje und Malgorzata bedanke ich mich für die vielen schönen und lustigen Momente, die mir den Arbeitsalltag immer wieder versüßt haben. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt hierbei meiner Caro, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich hatte und die komplette Bandbreite meiner Launen so eisern ertragen hat.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Freunden, meiner Familie und meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter, die mich auf meinem Weg immer bedingungslos unterstützt hat. Du bist einfach die Beste!

Von ganzem Herzen danke ich meinem lieben Mann Dennis, dessen Unterstützung und Zuneigung mir immer wieder neue Kraft gegeben hat.