

Detektion, molekulare und funktionale
Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen
von Patienten mit Prostata- oder
Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von

Andra Kuske

Hamburg, 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Pantel
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Julia Kehr

Datum der Disputation: 30.11.2016

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ZUSAMMENFASSUNG	IV
III.	ABSTRACT	VII
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	KREBS.....	1
1.1.1	<i>Metastasierung.....</i>	<i>2</i>
1.1.2	<i>Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)</i>	<i>4</i>
1.1.3	<i>Anreicherung und Detektion von CTCs.....</i>	<i>5</i>
1.1.4	<i>Identifikation und Charakterisierung von CTCs.....</i>	<i>8</i>
1.1.5	<i>Klinische Relevanz der CTCs.....</i>	<i>10</i>
1.1.6	<i>Aus CTCs generierte Zelllinien und CTC-Maus-Modelle.....</i>	<i>14</i>
1.2	FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT	16
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	MATERIAL.....	18
2.1.1	<i>Oligonukleotide (Primer).....</i>	<i>18</i>
2.1.2	<i>Antikörper</i>	<i>18</i>
2.1.3	<i>Kommerzielle Kits</i>	<i>19</i>
2.1.4	<i>Zelllinien und Zellmedien.....</i>	<i>20</i>
2.1.5	<i>Patientenmaterial</i>	<i>22</i>
2.2	METHODEN	23
2.2.1	<i>Zellkultur - Kultivierung und Lagerung der Zellkulturzellen.....</i>	<i>23</i>
2.2.1.1	<i>Kultivierung der Zelllinien</i>	<i>23</i>
2.2.1.2	<i>Lagerung der Zelllinien</i>	<i>23</i>
2.2.1.3	<i>Langzeitkultivierung von CTCs aus peripherem Blut</i>	<i>23</i>
2.2.2	<i>Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut</i>	<i>24</i>
2.2.2.1	<i>Detektion von CTCs mit dem CellSearch®-System</i>	<i>24</i>
2.2.2.2	<i>Anreicherung von CTCs über das Parsortix™ System</i>	<i>24</i>
2.2.2.3	<i>Anreicherung und Identifikation von CTCs mittels CellCollector Applikation.....</i>	<i>25</i>
2.2.2.4	<i>Detektion von CTCs über den Dual-Fluoreszenz PSA/FGF2 EPISPOT-Assay</i>	<i>28</i>
2.2.2.4.1	<i>CTC-Anreicherung mittels RosetteSep™</i>	<i>28</i>

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.4.2	Dual Fluoreszenz PSA/FGF2 EPISPOT	30
2.2.2.4.3	Konjugation des PSA-Sekundärantikörpers mit Alexa Fluor® 555.....	31
2.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	32
2.2.3.1	Isolation von genomischer DNA aus Zellkulturzellen	32
2.2.3.2	Isolation von genomischer DNA aus FFPE Material	32
2.2.3.3	Isolation von RNA aus Zellkulturzellen	32
2.2.3.4	cDNA-Synthese.....	32
2.2.3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) PCR	33
2.2.3.6	Quantitative und qualitative Messung von Nukleinsäuren.....	34
2.2.3.6.1	Nanodrop Spektrophotometer.....	34
2.2.3.6.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.3.7	DNA-Sequenzierung	34
2.2.4	<i>Analysen von Einzelzellen</i>	35
2.2.4.1	Isolation von Einzelzellen.....	35
2.2.4.2	RNA Isolation und cDNA-Synthese von Einzelzellen.....	36
2.2.4.3	Multi-Marker Transkriptions Analysen.....	36
2.2.4.3.1	<i>PreAmp and CTC GrandPerformance Assay</i> (TATAA Biocenter)	36
2.2.4.3.2	<i>RT² PreAMP and Profiler PCR Array</i> (Qiagen)	38
2.2.5	<i>Immunzytochemische Analysen (ICC)</i>	39
2.2.5.1	Herstellung von Zytospins.....	39
2.2.5.1.1	Immunfluoreszenz-Färbung auf Zytospins	40
2.2.5.1.2	Immunfluoreszenz-Färbung in Suspension für Einzelzellanalysen	41
2.2.5.1.3	H ₂ O ₂ Immunzytochemie (p53)	42
2.2.6	<i>Statistische Analysen</i>	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	VERGLEICH VERSCHIEDENER CTC-DETEKTIONSMETHODEN IN HOCHRISIKO- PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN.....	44
3.1.1	<i>Patienten-Charakteristika</i>	44
3.1.2	<i>Vergleich von CTC-Detektionsraten über verschiedene Nachweisverfahren</i>	46
3.1.2.1	Das CellSearch®-System	46
3.1.2.2	Der CellCollector	47
3.1.2.3	Der EPISPOT-Assay	50
3.1.2.4	Hohe CTC-Detektionsrate durch die kombinierte Anwendung des CellSearch®-Systems, des CellCollectors sowie des EPISPOT-Assays.....	52
3.1.2.5	Gepaarte-Analysen von CTC-Detektionsraten vor und nach radikaler Prostatektomie	55

Inhaltsverzeichnis

3.1.2.6	Korrelation von CTC-Inzidenzen zu klinischen Parametern	57
3.2	MULTIPLEX-RNA-ANALYSEN VON EINZELZELLEN.....	61
3.2.1	<i>Validierung von Einzelzell-RNA-Analysen.....</i>	<i>61</i>
3.2.2	<i>Multiplex-Transkriptom-Analysen von CTCs.....</i>	<i>67</i>
3.2.3	<i>Aktivierung von Inflammation und Immunität in CTC-Signalwegen.....</i>	<i>77</i>
3.3	ETABLIERUNG EINER CTC-ZELLINIE AUS DEM PERIPHEREN BLUT EINER BRUSTKREBSPATIENTIN	80
3.3.1	<i>Ex vivo Kultivierung von CTCs aus Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom.....</i>	<i>80</i>
3.3.2	<i>Klinisch-pathologische Charakteristika der Brustkrebs-patientin, aus dessen Blut die CTC-ITB-01-Zelllinie isoliert werden konnte</i>	<i>81</i>
3.3.3	<i>Charakterisierung der CTC-ITB-01-Zelllinie.....</i>	<i>83</i>
3.3.3.1	Zellmorphologie und Wachstum.....	83
3.3.3.2	CellSearch®-Analyse	86
3.3.3.3	Transkriptom-Analysen der CTC-ITB-01-Zelllinie.....	87
3.3.3.4	Proteom-Analysen der CTC-ITB-01-Zelllinie.....	90
3.3.3.5	Identifikation einer funktionell relevanten Mutation im Genom der CTC-ITB-01-Zelllinie 91	
3.3.3.5.1	<i>p53</i> -Mutationsanalyse der CTC-ITB-01-Zelllinie	91
4	DISKUSSION.....	94
4.1	CTC-DETEKTION IN HOCHRISIKO-PCA-PATIENTEN	94
4.2	RNA-MULTIPLEX-ANALYSEN VON CTCs.....	100
4.3	CTC-ZELLINIEN-MODELL.....	107
5	AUSBLICK.....	113
6	LITERATUR.....	115
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	132
8	ANHANG	138
9	DANKSAGUNG	154
10	LEBENS LAUF.....	156
11	PUBLIKATIONEN	158
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	159

II. Zusammenfassung

Der frühe Nachweis einer progredienten Tumorerkrankung sowie die gezielte Behandlung von metastasierten Krebspatienten stellen in der Onkologie nach wie vor große Herausforderungen dar. In den letzten Jahren haben sich zirkulierende Tumorzellen (CTCs) als Surrogat-Marker für die Prognose von Krebserkrankungen sowie als wertvoller Biomarker für die Überwachung von Krebstherapien erwiesen. Aufgrund der außerordentlich geringen Anzahl von CTCs im Blut besteht das Ziel gegenwärtiger Untersuchungen zunächst darin, neue hocheffiziente sensitive und spezifische Nachweismethoden für diese Zellen zu etablieren sowie weiterführende molekulare und funktionale Analysen zu ermöglichen.

Trotz großer Fortschritte in der Früherkennung von Prostatakarzinomen (PCa) repräsentiert der einzige standardmäßig verwendete Biomarker für diese Tumorentität das Prostata-spezifische Antigen (PSA) oftmals nicht den aktuellen Tumorstatus. Daher werden verlässliche Surrogat-Marker, die dazu beitragen, minimale Resterkrankungen (MRD) abzubilden und so Therapieentscheidungen lenken zu können, dringend benötigt. Die klinische Relevanz von CTCs bei Patienten mit nicht metastasierten PCa bleibt jedoch aufgrund von geringen CTC-Detektionsraten weitestgehend ungeklärt.

Im ersten Teilabschnitt dieser Doktorarbeit sollten verschiedene Methoden zur CTC-Detektion verglichen werden. Hierfür wurden (i) das CellSearch®-System als Referenzmethode, (ii) der *in vivo* GILUPI CellCollector (CellCollector) sowie (iii) der EPISPOT-Assay verwendet. Peripheres Blut von 84 Hochrisiko-PCa-Patienten wurde vor bzw. von 52 dieser Patienten erneut nach der radikalen Prostatektomie (RP) auf das Vorhandensein von CTCs untersucht. Abhängig von der verwendeten Methode konnten in 37 %, 54,9 % und 58,7 % der Proben (beide Zeitpunkte kombiniert) CTCs über das CellSearch®-System, den CellCollector bzw. den EPISPOT-Assay detektiert werden. Die kumulative Positivitätsrate, in der bei mindestens einer der Assays ≥ 1 CTC nachgewiesen wurde, betrug 81,3 % (87/107), wohingegen bei einem Schwellenwert von ≥ 5 CTCs die Positivitätsrate bei 21,5 % (23/107) lag. In nur 18,7 % (20/107) der Fälle konnten parallel in allen drei Assays CTCs detektiert werden. Bei einer gepaarten Analyse von den vor und nach der RP erzielten Ergebnissen zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme von CTC-Inzidenzen, die über den CellCollector detektiert wurden

(66 % auf 34 % ($p = 0,031$)). Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern konnten ausschließlich für CTC-Konzentrationen, die über den EPISPOT-Assay detektiert wurden, nachgewiesen werden. Dabei zeigte das Vorhandensein von CTCs vor der RP eine statistisch signifikante Korrelation zum PSA-Wert ($p < 0,0001$) sowie zum klinischen Tumorstadium ($p = 0,04$).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Komplementarität der angewandten Technologien, die erstmals zu hohen CTC-Detektionsraten in nicht-metastasierten PCa-Patienten führen konnten sowie eine mögliche Nutzung der CTCs als *Monitoring*-Biomarker für die Überwachung der Therapie. Die parallele Anwendung aller drei Methoden ist jedoch aus ökonomischen Gründen nur schwer standardisierbar. Daher soll über die Verlaufskontrolle die Technologien mit der höchsten klinischen Relevanz bestimmt werden, die in zukünftigen Studien zu einer Blut-basierten Beurteilung von MRD in nicht-metastasierten PCa-Patienten beitragen könnte.

Im zweiten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein reproduzierbarer Methodenablauf etabliert und validiert werden, der es ermöglicht, angereicherte CTCs nach der Identifikation zu isolieren und in weiterführenden Analysen Transkripte von ausgewählten Zielgenen zu untersuchen. Diese Analysen könnten Echtzeitinformationen über die Tumorerkrankung liefern sowie durch den Nachweis therapeutisch-relevanter Zielmoleküle zu einer verbesserten Therapieplanung beitragen.

CTCs wurden entweder über das EpCAM-abhängige CellSearch®-System oder über die neue Größen-basierte Parsortix™-Plattform angereichert, mit Hilfe einer EpCAM- und/oder pan-Keratin-Färbung identifiziert und für die RNA-Multiplex-Analyse isoliert. Durch die Einzelzellanalysen konnten wertvolle Informationen über die Heterogenität von CTCs innerhalb eines Patienten abgebildet werden, die anhand ihrer differentiellen Transkriptionsprofile in unterschiedliche Subgruppen unterteilt werden konnten. Dabei wurden CTCs durch die Detektion von Transkripten, die in EMT-assoziierte Prozesse (z.B. *VIM*, *JAG1*, *CDH2*, *MMPs*, *SOX10*, *SSP1*, *ZEB1/ZEB2*), Signalwege der Zellteilung (z.B. *PIK3CA*, *AKT1*, *mTOR*, *VEGFA*) oder in Mechanismen der Resistenzentwicklungen spezifischer Therapien (z.B. *AR*, *ARV7*, *HER2*, *EGFR*) involviert sind, eingehend charakterisiert. Darüber hinaus konnte in einigen CTC-

Subgruppen die Transkription von Krebsstammzell-assoziierten Genen (z.B. *CD24* und *CD44*), oder von Signalmolekülen, die in die Kommunikation zwischen Tumor- und Immunzellen involviert sind (z.B. *CCL4*, *CXCL2*, *CXCL9*, *IL15*, *IL8*), nachgewiesen werden. In zukünftigen Studien könnten folglich Transkriptionsprofile von CTCs eine Stratifizierung von Patienten in phänotypische Subgruppen ermöglichen und demnach zu einer Weiterentwicklung von personalisierten Therapiestrategien beitragen.

Im dritten Teilabschnitt dieser Doktorarbeit konnte erstmals eine permanente CTC-Zelllinie (CTC-ITB-01) aus dem peripheren Blut einer BCa-Patientin etabliert werden. Zellen der CTC-Zelllinie weisen eine Aneuploidie auf, bei der eine erhöhte Chromosomenanzahl (\emptyset 74 Chromosomen) nachgewiesen werden konnte. Im Genom der CTC-Zelllinie wurde eine „Hotspot“- Punktmutation (E285K) im *p53*-Gen detektiert. Mit Hilfe von Transkriptom- sowie Proteom-Analysen konnte die CTC-Zelllinie als epitheliale Zelllinie charakterisiert werden. Darüber hinaus stimmte der Estrogenrezeptor- (ER) Status zwischen der ER-positiven CTC-Zelllinie und den ER-positiven Primärtumoren sowie einer Metastase der BCa-Patientin überein. Des Weiteren erwies sich die CTC-Zelllinie in Nacktmäusen als tumorigen und Metastasen-initiierend. Folglich könnte in zukünftigen Studien die etablierte epitheliale CTC-Zelllinie als wertvolles Modellsystem eingesetzt werden, um den Prozess der Metastasenbildung näher zu charakterisieren und verschiedene Tumortherapien zu testen.

III. Abstract

Early detection of progressive tumor disease in metastatic cancer patients still represents a major challenge of oncology. In recent years, circulating tumor cells (CTCs) have become a surrogate marker for prognosis of cancer as well as a valuable biomarker for monitoring cancer treatments. Due to the extremely low concentration of CTCs in the bloodstream, major goals of current research are a) to establish new highly efficient, sensitive and specific CTC detection methods as well as b) to further molecular and functional characterize CTCs.

Despite many improvements in the early detection of prostate cancer (PCa), to date, prostate-specific antigen (PSA) is the only approved biomarker guiding treatment decisions in PCa. However, PSA values often do not represent the current tumor status potentially leading to misinformed therapeutic decisions. Thus, reliable surrogate markers that allow for the detection of minimal systemic disease and help guide treatment decisions are urgently required. However, the clinical relevance of CTCs in patients with non-metastatic PCa remains largely unknown due to low CTC detection rates and low CTC concentrations.

The aim of the first part of this doctoral thesis was to improve CTC detection in non-metastatic PCa patients by comparing three independent CTC assays: (i) the CellSearch® system as gold standard, (ii) the *in vivo* GILUPI CellCollector (CellCollector) and (iii) the EPISPOT assay. Peripheral blood samples from 84 high-risk PCa patients were screened for CTCs before, and from 52 of these patients again three months after radical prostatectomy (RP). Combining the results of both time points, CTCs were detected in 37%, 54.9% and 58.7% of patients using CellSearch®, CellCollector and EPISPOT, respectively. The cumulative positivity rate of the three CTC assays (at least in one method ≥ 1 CTC) was 81.3% (87/107) with 21.5% (23/107) of patients harboring ≥ 5 CTCs per 7.5 ml blood. Only in 18.7 % (20/107) of the samples CTCs could be detected in parallel with all three methods. Matched pair analysis of blood samples taken before and after surgery indicated a significant decrease in CTCs positivity obtained by the CellCollector from 66% before RP to 34% after therapy ($p=0.031$). CTC detection by EPISPOT before RP significantly correlated with PSA serum values ($p<0.0001$) and clinical tumor stages ($p=0.04$), while the other assays showed no significant correlations to clinic-pathological parameters.

To conclude, a combination of these complementary technologies for the first time revealed high CTC detection rates in non-metastatic PCa patients and suggests a potential use of CTCs as monitoring biomarkers during cancer treatment. However, the parallel application of all three methods is difficult to standardize for economic reasons. Therefore, follow-up data are required to select the most clinically relevant method which has the potential to monitor minimal residual disease (MRD) in patients with non-metastatic prostate cancer.

In the second part of the present study a reproducible workflow for CTC enrichment, identification, isolation and single cell RNA profiling of selected target genes was established and validated. These analyzes could provide real-time information about the expression of tumor-associated genes and could contribute to an improved treatment strategy by detecting therapeutically relevant targets.

CTCs were enriched based on their EpCAM expression (CellSearch®) or by size and deformability (Parsortix™), identified by EpCAM and/or pan-keratin specific antibodies, and isolated for single cell multiplex RNA profiling. By single cell analysis, valuable information about the intra-patient heterogeneity of CTCs could be demonstrated. According to their divergent transcription profiles CTCs could be divided in different subgroups. Analyzed CTCs were characterized by differential expression of genes involved in EMT (e.g. *VIM*, *JAG1*, *CDH2*, *MMPs*, *SOX10*, *SSP1*, *ZEB1/ZEB2*), activated signaling pathways involved in tumor progression (e.g. *PIK3CA*, *AKT1*, *mTOR*, *VEGFA*) or resistance to cancer therapy (e.g. *AR*, *ARV7*, *HER2*, *EGFR*). In addition, distinct CTC subsets expressed genes associated with cancer stemness (e.g. *CD24* and *CD44*) or cross talk between tumors and immune cells (e.g. *CCL4*, *CXCL2*, *CXCL9*, *IL15*, or *IL8*). In conclusion multi-marker RNA profiling of single CTCs could facilitate patient stratification in phenotypic subgroups and thus contribute to an improvement of personalized treatment decisions.

In the third part of this thesis the first permanent CTC cell line (CTC-ITB-01) was established from the peripheral blood of a BCa patient. Cells of the CTC cell line display aneuploidy as concluded from an increased number of chromosomes (≈ 74 chromosomes). A hotspot point mutation (E285K) in the p53 gene could be detected in the genome of the CTC cell line. Using transcriptome and proteome analyzes the CTC cell line could be characterized as breast cancer cell line with mainly epithelial cell features. In accordance with the estrogen receptor (ER)-status of the corresponding primary tumor and of the metastasis of the patient, the CTC cell line cells presented an ER-positive phenotype. Furthermore, cells of the CTC cell line injected into nude mice displayed a tumorigenic and metastases-initiating potential. In conclusion, the established epithelial CTC cell line could serve as a valuable model system to characterize the process of metastasis formation and for testing of tumor therapies in future studies.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Tochtergeschwülste von Primärtumoren (Metastasen) repräsentieren die häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle (90 %), was u.a. auf die bislang unzureichend verstandenen zugrundeliegenden Mechanismen zurückzuführen ist, die das Ausbilden von Metastasen begünstigen (Chaffer and Weinberg, 2011). Die Entstehung von Krebs wird von Hanahan und Weinberg durch zehn zelluläre Veränderungen als „*Hallmarks of Cancer*“ zusammengefasst. Die „*Hallmarks of Cancer*“ beinhalten das Potential unabhängig von Wachstumsfaktoren proliferieren (*self-sufficiency*) zu können sowie die uneingeschränkte Replikation des genomischen Materials. Als weitere Charakteristika können sich Tumorzellen der Wirkung von Wachstums-Suppressoren sowie Signalen, die die Apoptose einleiten, erfolgreich entziehen. Darüber hinaus haben sie die Fähigkeit erlangt, in fremde Gewebe oder Organe einzuwandern und die Angiogenese zu induzieren (Hanahan and Weinberg, 2000). Eigenschaften, die Tumorzellen auf molekularer Ebene charakterisieren, sind die genomische Instabilität und das Auftreten von Mutationen. Dabei können genetische Veränderungen z.B. die Transkription von Proto-Onkogenen induzieren sowie Tumor- oder Metastasen-Suppressorgene inhibieren, was zu einer Tumorentstehung und im weiteren Verlauf zur Metastasenbildung führen kann (Knudson, 1985, Weinberg, 1985, Bishop, 1987). Des Weiteren verändert sich der Zellmetabolismus von Tumorzellen, da, bedingt durch die erhöhte Proliferationsrate, mehr Energie für Zell-Wachstum und -Teilung bereitgestellt werden muss. Letztere „*Hallmarks of Cancer*“ beschreiben Veränderungen, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, wie die Fähigkeit sich den Angriffen der Zellen der Immunabwehr zu entziehen sowie die Induktion einer tumor-bedingten Entzündungsreaktion (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.1.1 Metastasierung

Zellen eines malignen Tumors mit epitheliale Ursprung (Karzinoms) liegen in einem Zellverband vor, der durch Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre-Matrix-(ECM) Kontakte über Adhäsionsmoleküle charakterisiert ist. Um diesen Zellverband zu verlassen und den Prozess der Metastasierung zu initiieren, sind Eigenschaften wie Mobilität und invasives Verhalten der Tumorzellen notwendig. Im Fall eines Karzinoms können sich individuelle Zellen oder Zellcluster von dem Primärtumor lösen, das umliegende Gewebe durchdringen und in das lymphatische und/oder Blutsystem einwandern (Invasion) (Abbildung 1.1). Zellen, die in das Blutgefäßsystem eingewandert sind, werden als zirkulierende Tumorzellen bezeichnet (*circulating tumor cells* (CTC)). In der Zirkulation sind die Zellen Scherbelastungen sowie Prozessen des programmierten Zelltods (Anoikis) und möglichen Angriffen von Immunzellen ausgesetzt. Die genaue Anzahl von Tumorzellen, die sich im Blut eines Krebspatienten befinden, ist schwierig zu determinieren, allerdings konnten Butler und Kollegen in einem Tierexperiment zeigen, dass bei 1 g Tumormasse mehrere Millionen Tumorzellen täglich in die Blutbahn abgegeben werden (Butler and Gullino, 1975). Jedoch scheinen lediglich sehr wenige dieser Zellen in der Lage zu sein, in der Zirkulation zu überleben und Metastasen induzieren zu können (Kang and Pantel, 2013).

Die molekularen Prozesse, die die Migration und Invasion der Zellen in die Blutbahn sowie umliegende Gewebe begünstigen, sind bisher weitestgehend unbekannt. Ein möglicher Prozess, der Tumorzellen bei der Invasion unterstützt und ihnen einen Überlebensvorteil im Blutsystem verschaffen könnte, ist die sogenannte Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) (Mitchell and King, 2013), die in Kapitel 1.1.2 dieser Arbeit noch ausführlich beschrieben wird.

Neben dem aktiven Prozess der Tumorzellinvasion können Zellen jedoch auch passiv in die Blutbahn gelangen. Tumoren sind in der Lage, durch die Sekretion des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) die Neubildung von Blutgefäßen zu induzieren, um eine ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung während des Wachstums zu gewährleisten (Ferrara, 2002). Diese Prozesse der Vakulo- und Angiogenese resultieren oftmals in durchlässigen Gefäßen, was auf unorganisierte Zellverbindungen zurückzuführen ist (Hashizume et al., 2000, Morikawa et al., 2002). Über diese Lücken können Tumorzellen möglicherweise durch Tumorwachstum oder mechanische Kräfte in das Gefäßsystem eingeschleust werden (Camara et al., 2006, Fornvik et al., 2013).

Für die Ausbildung von Metastasen in distanten Nischen müssen die CTCs in der Lage sein, das Lymph- bzw. Blutgefäßsystem zu verlassen und in umliegende Organe oder Lymphknoten einzuwandern (Extravasation) (Abbildung 1.1). Wenn CTCs in engere Gefäße gelangen, fließen sie langsamer und können sich einfacher an das Endothel anlagern (Ito et al., 2001). Für den Prozess der Anlagerung spielen verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie N-Cadherin, E-Selektin und bestimmte Integrine ($\alpha V\beta 3$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 2\beta 1$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in Kombination mit verschiedenen α -Integrinen) eine wichtige Rolle (Reymond et al., 2013). Durch *in vitro* und *in vivo* Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion der Adhäsionsmoleküle mit CTCs, ihr Entlangrollen auf dem Endothel begünstigen und so eine Initiation zur Extravasation geschaffen werden könnte (Hazan et al., 2000, Felding-Habermann et al., 2001, Hult et al., 2007, Hiratsuka et al., 2011). Es wird diskutiert, dass Tumorzellen, die eine EMT durchlaufen haben, nach der Extravasation eine Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) durchlaufen und sich erneut als Zellverbände anlagern und mit der ECM verankern können (Tam and Weinberg, 2013). CTCs, die das Blutgefäßsystem verlassen haben und in einer neuen Nische angekommen sind, werden als disseminierte Tumorzellen (DTCs) bezeichnet. DTCs können in einen Ruhezustand verfallen (Tumorzell dormanz) oder proliferieren und zu Mikro- bzw. Makrometastasen heranwachsen (Kang and Pantel, 2013). Die Dormanz bzw. der Eintritt in die G^0/G^1 -Phase des Zellzyklus schützt Tumorzellen möglicherweise vor systemischen Therapien, wodurch sie bis zu einige Jahre im Knochenmarkt oder anderen Organen persistieren können. Prozesse, die den Austritt aus der Tumorzell dormanz begünstigen, sind weitestgehend unverstanden. Es ist allerdings bekannt, dass ruhende DTCs auch viele Jahre nach einer Erstdiagnose zu einem erneuten Rezidiv führen können (Freedland and Moul, 2007, Kennecke et al., 2010, Uhr and Pantel, 2011, Bragado et al., 2013). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass Metastasen-initiiierende Zelle viele Ähnlichkeiten zu Krebsstammzellen (*cancer stem cells* (CSC)) aufweisen und entsprechend reguliert werden können (Mani et al., 2008, Aktas et al., 2009, Giordano et al., 2012, Pirozzi et al., 2013). Dabei werden die Dormanz sowie die eventuelle Reaktivierung durch Nischen-spezifische Signale, die denen von adulten Stammzellen entsprechen, initiiert (Kobayashi et al., 2011, Giancotti, 2013). Zum Beispiel konnte für VEGFR1-positive hämatopoetische Vorläuferzellen des Knochenmarkts gezeigt werden, dass sie in den Bildungsprozess der prä-metastatische Nischen involviert sind (Kaplan et al., 2005).

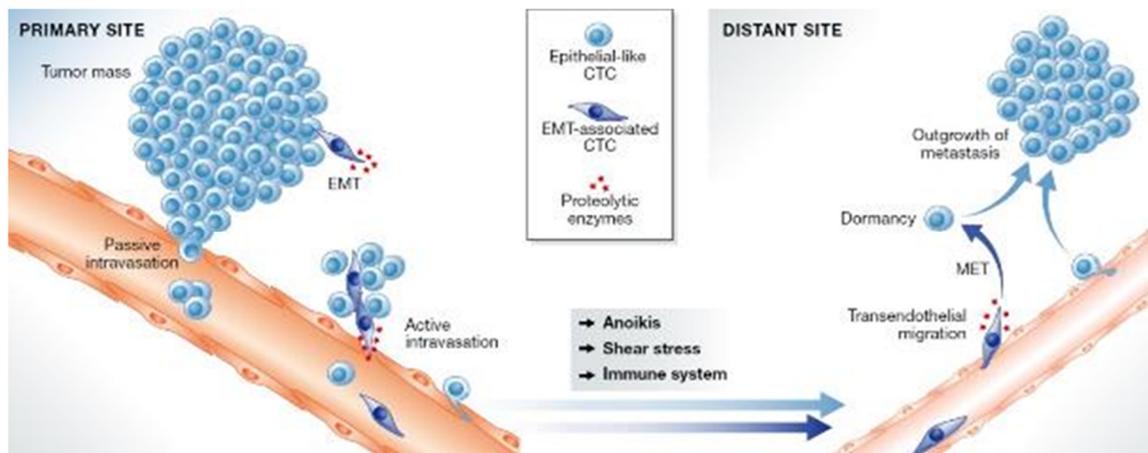


Abbildung 1.1 Metastatische Kaskade. Tumorzellen gelangen durch passive oder aktive Prozesse, wie die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) in den Blutstrom (Invasion), und sind Faktoren, wie Scherstress, den programmierten Zelltod (Anoikis) und der Immunabwehr ausgesetzt. Überlebende Zellen können in entfernte Gewebe einwandern, dort das Gefäßsystem verlassen (Extravasation), Metastasen bilden oder in einen Ruhezustand (Dormanz) verfallen (Joosse et al., 2015).

1.1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) ist ein grundlegender Prozess der Embryonalentwicklung und kann auch als physiologische Reaktion auf eine Verletzung ausgelöst werden. Die Prozesse der EMT und MET spielen möglicherweise wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben auch bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle und werden im Zusammenhang mit Krebsstammzellen diskutiert (Mitra et al., 2015).

EMT-assoziierte Prozesse können durch parakrine Signale, wie z.B. über TGF- β (*transforming growth factor- β*), WNT, Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), Interleukin-6 (IL6) aber auch durch Nikotin, Alkohol und Ultraviolettes Licht (UV-Licht) induziert werden (Thiery et al., 2009, Scheel et al., 2011, Kishi et al., 2015). Dabei werden Transkriptionsfaktoren wie SLUG, SNAIL, TWIST und ZEB aktiviert, die wiederum autokrin den EMT-Prozess aktivieren können (Savagner et al., 1997, Blanco et al., 2002, Yang et al., 2004, Peinado et al., 2007, Wellner et al., 2009). Während des EMT-Prozesses kann durch die Herabregulation der Expression von epithelialen Adhäsionsmolekülen und die damit verbundenen Zell-Zell- und Zell-EMC-Kontaktverluste, durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie durch die Sekretion von MMPs die

Invasion in umliegendes Gewebe erleichtert werden. Dabei können epitheliale Adhäsionsmoleküle wie z.B. E-Cadherin und insbesondere EpCAM herabreguliert werden, wohingegen mesenchymale Marker wie N-Cadherin und Vimentin heraufreguliert werden können (Thiery et al., 2009, Bonnomet et al., 2010, Gunasinghe et al., 2012). In BCa-Patienten wurde die reduzierte EpCAM-Expression sogar als Voraussetzung für die Zellinvasion beschrieben (Taube et al., 2010). Die Umstrukturierung des Zytoskeletts durch z.B. eine veränderte Keratin-Expression, resultiert in einem Polaritätsverlust der Zelle und einem damit einhergehenden Mobilitätsgewinn (Friedl and Wolf, 2009, Taube et al., 2010, Joosse et al., 2012). Neben der Umstrukturierung der Zell-Kontakte sowie -Struktur können proteolytisch wirkende Enzyme wie MMPs freigesetzt werden, die Teile der ECM und umliegendes Gewebe degradieren, was das Einwandern ebenfalls erleichtert (Egeblad and Werb, 2002, Friedl and Wolf, 2009, Wolf and Friedl, 2011).

1.1.3 Anreicherung und Detektion von CTCs

Untersuchungen von CTCs als blutbasierte, tumorspezifische Biomarker können wertvolle Informationen über die Krebserkrankung liefern und so zu einer verbesserten Krebstherapie führen. Um CTCs klinisch nutzen zu können, ist die größte Herausforderung die Anreicherung und die Detektion der Zellen, da einzelne CTCs in einem Hintergrund von bis zu 10^{6-7} peripheren mononuklearen Blutzellen isoliert werden müssen (Allard et al., 2004, Alix-Panabieres, 2012). Darüber hinaus hat sich die klare CTC-Definition als Zelle mit Zellkern, die sowohl EpCAM und also auch Keratine exprimiert und negativ für den Leukozytenmarker CD45 ist, in den letzten Jahren verändert. In der aktuellen Literatur werden gegenwärtig auch EpCAM- und/oder Keratin-negative CTCs beschrieben, die möglicherweise im Zusammenhang mit EMT-assoziierten Prozessen stehen (Mikolajczyk et al., 2011, Pecot et al., 2011, Marrinucci et al., 2012, Serrano et al., 2014, Schneck et al., 2015). Die klinische Relevanz dieser Zellen bleibt jedoch zu klären.

Folglich bleibt die Entwicklung von Anreicherungs-Technologien, die hoch sensitiv und spezifisch variierende CTC-Phänotypen detektieren können, eine komplexe und herausfordernde Aufgabe. Bis heute sind über 45 verschiedene CTC-Detektions-Technologien beschrieben, die in Marker-unabhängige oder

Marker-abhängige Anreicherungsstrategien, unterteilt werden können (Ferreira et al., 2016). Zu den Marker-unabhängigen Verfahren zählen z.B. Größen-abhängige Technologien, wie Parsortix™ (Hvichia et al., 2016a) oder ISET® (Hofman et al., 2011), Dichte-abhängige Anreicherungsstrategien über Ficoll-Paque® (Weitz et al., 1998) oder eine Depletion über den RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail (He et al., 2008) sowie die Anreicherung über die Invasivität von lebenden Zellen über den VitaAssay™ (Lu et al., 2010). Marker-abhängige Verfahren basieren hingegen auf der Anreicherung über zellspezifische Oberflächenproteine. Der wohl bedeutendste Oberflächenmarker für die positive Selektion von CTCs ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*)), das von einem Großteil der Karzinome exprimiert wird (Winter et al., 2003, Went et al., 2004).

Zu den Anreicherungsverfahren, die EpCAM als Zielmolekül nutzen, gehören z.B. das CellSearch®-System (Cristofanilli et al., 2004), der CTC-iChip (Ozkumur et al., 2013), der AdnaTest (Andreopoulou et al., 2012), das Isoflux™ System (Harb et al., 2013) und der GILUPI CellCollector® (Saucedo-Zeni et al., 2012, Gorges et al., 2015). Weiterhin können Antikörper-Cocktails für die gezielte Anreicherung von CTC-Subpopulationen verwendet werden, die neben EpCAM zusätzliche Oberflächenmarker, wie z.B. MUC1, EGFR oder HER2, einschließen (Tewes et al., 2009, Hanssen et al., 2016). Im Folgenden wird nur auf die für die Arbeit relevanten Technologien näher eingegangen.

Trotz der Vielzahl an verschiedenen CTC-Detektions-Technologien wurde bis heute lediglich das CellSearch®-System (Janssen Diagnostics) von der U.S. amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Die CellSearch®-Methode basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung von EpCAM-positiven Zellen über Antikörper, die mit Eisenpartikeln (Ferrofluiden) konjugiert sind (Cristofanilli et al., 2004). Dabei binden diese Antikörper-Komplexe mit hoher Sensitivität, aber geringer Spezifität epitheliale (EpCAM-positiv) Tumorzellen, die nachfolgend mit Hilfe von Magneten aus dem peripheren Blut (7,5 ml) von den übrigen Zellen separiert werden können.

Mit Hilfe dieser Methode konnten CTCs bereits vielfach als unabhängiger prognostischer Faktor für das progressionsfreie (*progression-free survival* (PFS)) und Gesamtüberleben (*overall survival* (OS)) beschreiben werden (Cristofanilli et al., 2004, de Bono et al., 2008, Cohen et al., 2009, Bidard et al., 2014, Scher et

al., 2015, Lorente et al., 2016). Durch die prognostische Relevanz und hohe Reproduzierbarkeit dieser Methode sowie durch die FDA-Zulassung gilt sie als Referenzsystem in der CTC-Forschung. Obwohl das CellSearch® System bereits in vielen Studien eine prognostische Relevanz der CTCs aufgezeigt hat, ist ein Nachteil dieser Methode, dass lediglich 7,5 ml Blut auf das Vorhandensein von CTCs untersucht werden können. Der Gilupi CellCollector® (CellCollector) hingegen ist eine *in vivo* Technologie, die direkt in die Vene eines Patienten eingeführt wird und somit die Untersuchung eines größeren Blutvolumens auf CTCs ermöglicht. Der CellCollector besitzt eine 2-4 cm lange funktionalisierte Spitze, an dessen Oberfläche EpCAM-Antikörper konjugiert sind (Saucedo-Zeni et al., 2012). Während einer Inkubationszeit von 30 min können Tumorzellen aus einem potentiell größeren Blutvolumen isoliert werden.

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, können EMT-assoziierte Veränderung zur Herabregulation der EpCAM-Expression führen. Aus diesem Grund sind neben EpCAM-abhängigen Anreicherungsverfahren, Marker-unabhängige Technologien ebenfalls in der Lage, EpCAM-negative CTCs zu detektieren (Armstrong et al., 2011, Gorges et al., 2012, Kasimir-Bauer et al., 2012). Das Parsortix™ System (ANGEL pIc) verwendet eine patentierte Mikrofluidik-Technologie, bei der eine spezielle Filter-Kassette für das Anreichern von CTCs aus peripherem Blut eingesetzt wird. Das Prinzip dieser Kassette basiert auf einer Größen-abhängigen Selektion, wobei kleinere von größeren Zellereignissen getrennt werden (Hvichia et al., 2016a). Ein weiteres Prinzip der Marker-unabhängigen Anreicherung beruht auf der Depletion z.B. durch *RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail* (STEMCELL Technologies). Dabei werden auszuschließende Zellen durch Tetramer-Antikörperkomplexe (z.B. anti-CD56 Leukozyten und Erythrozyten) gebunden und durch eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation von den CTCs getrennt (He et al., 2008).

1.1.4 Identifikation und Charakterisierung von CTCs

In verschiedenen CTC-Detektions-Assays werden unterschiedliche Strategien genutzt, um die Tumorzellen im Anschluss zu identifizieren. Eine Übersicht der unterschiedlichen Möglichkeiten ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

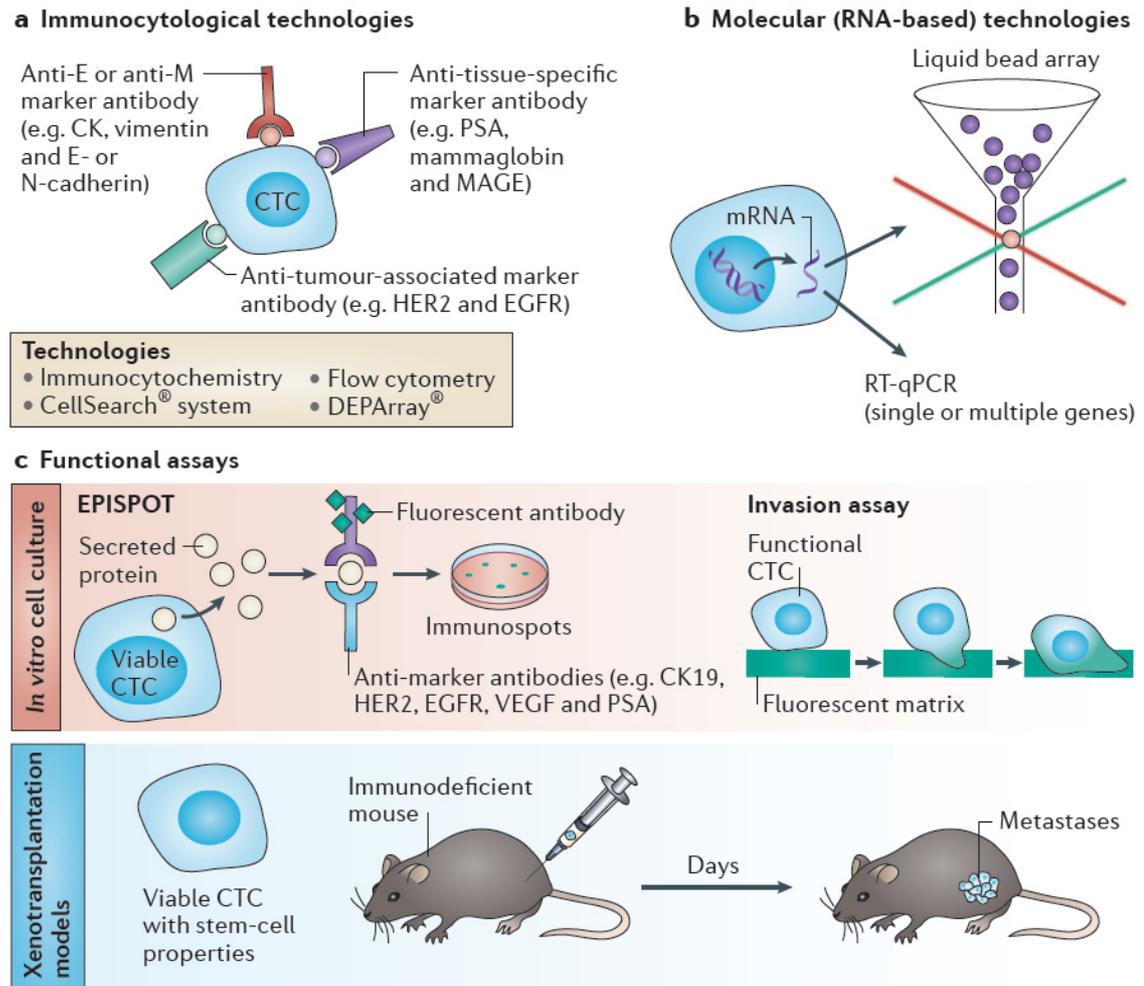


Abbildung 1.2 Technologien zur Identifikation und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs). a) Immunzytochemische Methoden. CTCs können über die Markierung von membranständigen und/oder intrazellulären anti-epithelialen (E), anti-mesenchymalen (M), Gewebe-spezifischen oder Tumor-assoziierten Markern detektiert werden. b) Molekulare Technologien. CTCs können über den Nachweis spezifischer Transkripte mit Hilfe von RNA-basierten Methoden (*multiplex reverse transkription-PCR* in Kombination mit *liquid bead arrays*) identifiziert werden. c) Funktionale Assays. *In vitro*: vitale CTC können über die EPISPOT-Technologie identifiziert und charakterisiert werden. *In vivo*: CTCs mit Stammzeleigenschaften können in immun-defizienten Mäusen das Wachstum von Tumoren oder Metastasen initiieren und so zu einer Charakterisierung dieser Prozesse beitragen (verändert nach (Alix-Panabieres and Pantel, 2014)).

Eine häufig verwendete Methode zur Identifikation der CTCs kombiniert die morphologische Untersuchung mit fluoreszenzbasierten immunzytochemischen Färbungen (ICC). Das CellSearch®-System klassifiziert CTCs als Zellen mit Zellkern (DAPI⁺), pan-Keratin⁺ und negativ für den Leukozytenmarker CD45⁻. Der vierte Fluoreszenz-Kanal kann zusätzlich für therapierelevante Marker, wie z.B. den Androgenrezeptor (AR), PSMA (*prostate-specific membrane antigen*), HER2 (*human epidermal growth factor receptor*), EGRF (*epidermal growth factor receptor*) (Riethdorf et al., 2007, Gasch et al., 2013, Gorges et al., 2016) oder EMT-assoziierte Marker wie N-Cadherin oder Vimentin (Armstrong et al., 2011), genutzt werden. Immunzytochemische Nachweisverfahren können auch in Kombination mit einer Vielzahl von anderen Anreicherungsverfahren wie Größenbasierte Technologien (z.B. ParsortixTM, ISET®), dem CellCollector oder nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation, eingesetzt werden (Babayyan et al., 2013, Gorges et al., 2015, Hvichia et al., 2016a).

Neben der ICC können CTCs ebenfalls über Tumor-assoziierte Transkripte mittels Multiplex-qPCR identifiziert werden. Aufgrund der geringen Anzahl an CTCs und der generellen Instabilität von mRNA sind diese Analysen jedoch eine große Herausforderung. Smirnov et al. konnten erstmals Gen-Expressionsprofile von tumor-assoziierten Genen in CTC-Pools von metastasierten Karzinompatienten nachweisen (Smirnov et al., 2005). Dabei konnten Patienten anhand ihrer Transkriptionsprofile von gesunden Spendern unterschieden sowie Tumorentitäten-spezifische Gen-Profile für die BCa, CRCa und PCa identifiziert werden. In weiteren Studien wurden Tumor-assoziierte Marker, wie z.B. *EpCAM*, *MUC1*, *HER2*, Stammzellmarker wie *ALDH1* (*aldehyde dehydrogenase 1*) oder EMT-assoziierte Transkripte wie *PI3K α* (*phosphatidylinositol 3-kinase alpha*), *Akt2* oder *TWIST1* (Kasimir-Bauer et al., 2012, Vaiopoulos et al., 2014, Barriere et al., 2012) für die Identifikation von CTCs verwendet. Zusätzliche Transkripte, die für die Identifikation von CTCs eingesetzt wurden, sind *Keratin-19* oder *PBGD* (*porphobilinogen deaminase*) (Strati et al., 2013). Bei diesen Studien lagen die CTCs allerdings in einem Zellgemisch vor und enthielten Leukozyten-Verunreinigungen. Multimarker-Transkriptomanalysen von einzelnen CTCs sind dagegen frei von Kontaminationen und könnten zusätzliche Informationen zur intra-individuellen Heterogenität von CTC-Subpopulationen aufzeigen und somit Rückschlüsse auf den Primärtumor oder Metstasen zulassen. RNA-Einzelzell-

Analysen von CTCs bleiben jedoch bis heute eine große Herausforderung, da (i) eine CTC in einem Hintergrund von Millionen von Blutzellen detektiert und isoliert werden muss, (ii) die Zelle in einem intakten Zustand vorliegen muss und (iii) sehr geringe Mengen von instabiler mRNA (10 pg) per Zelle sich nur schwer amplifizieren lassen. Transkriptionsprofile von epithelialen und mesenchymalen Markern einzelner CTCs konnten bislang mit Hilfe eines dual-kolorimetrischen RNA-*in situ* Hybridisierungs-Assays untersucht werden (Yu et al., 2013). Weitere heterogene RNA-Transkriptionsprofile konnten bei einzelnen CTCs, die über den CTC-iChip isoliert wurden, nachgewiesen werden (Ozkumur et al., 2013). Das Potential therapeutische Targets zu identifizieren und so zur personalisierten Therapie beizutragen, bleibt weiter zu analysieren.

Eine weitere Strategie, CTCs zu identifizieren, kann über die Detektion von Proteinen, die spezifisch von vitalen Tumorzellen sekretiert werden, erfolgen. Mit Hilfe der EPithelial Immuno SPOT Technologie (EPISPOT), können CTCs anhand von diesen aktiv sekretierten Proteinen, wie z.B. PSA (*prostate specific antigen*), FGF2 (*fibroblast growth factor 2*), Keratin-19, MUC1 identifiziert werden (Alix-Panabieres et al., 2007, Alix-Panabieres, 2012). Dabei werden CTCs auf einer mit Antikörpern beschichteten Membran kurzzeitkultiviert, sekretierte Proteine gebunden und durch Fluorophor-gekoppelte Antikörper markiert.

Zusammenfassend weist jede Methode einen Nutzen, jedoch auch Einschränkungen auf. Eine Kombination einzelner Technologien könnte dazu beitragen, die Heterogenität von CTCs besser abzubilden und ihre Rolle in der Metastasierung weiter zu charakterisieren.

1.1.5 Klinische Relevanz der CTCs

Bislang konnte in der metastasierten Situation die prognostische Relevanz von CTCs, die über das CellSearch®-System detektiert wurden, in Patienten mit unterschiedlichen Krebsentitäten, wie Mamma- (BCa) (Cristofanilli et al., 2004, Zhang et al., 2012), Prostata- (PCa) (de Bono et al., 2008, Scher et al., 2015, Lorente et al., 2016), Kolorektal- (CRCa) sowie Lungenkarzinomen (LCa), eindeutig belegt werden (Cohen et al., 2008, Krebs et al., 2011, Hou et al., 2012).

Dabei zeigte sich, dass ein Grenzwert von ≥ 5 CTCs (BCa, PCa und LCa) bzw. von ≥ 3 CTCs (CRCa) in 7,5 ml Blut mit einer statistisch signifikant schlechteren Prognose für das PFS und OS der Patienten assoziiert war. Aktuelle Studien zeigen, dass die Anzahl an CTCs während der Therapie schon als individueller Surrogat-Marker für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten eingesetzt werden konnte (Scher et al., 2015, Lorente et al., 2016). Bei metastasierten PCa-Patienten (mPCa) konnte die gemessene CTCs-Konzentration sogar eine bessere Prognose für das OS liefern als der standardmäßig verwendete Biomarker PSA (de Bono et al., 2008, Okegawa et al., 2014). Ergebnisse aus Studien in frühen Stadien von BCa (Lucci et al., 2012, Rack et al., 2014), Harnblasenkarzinom (HBCa) (Rink et al., 2011, Gazzaniga et al., 2014) sowie CRCa (Deneve et al., 2013) konnten bereits bei ≥ 1 CTC/7,5 ml Blut auf eine prognostische Relevanz hinweisen. Eine klinische Relevanz der Anzahl detektierter CTCs konnte auch durch weitere Technologien wie dem EPISPOT Assay oder dem CellCollector nachgewiesen werden. Dabei konnte in einer EPISPOT-Studie an Blutproben von mBCa-Patientinnen die prognostische Relevanz von Keratin-19 sekretierenden CTCs für das Gesamtüberleben der Patienten beobachtet werden (Ramirez et al., 2014). Darüber hinaus wurde der CellCollector für eine Pilot-Studie in PCa-Patienten angewendet, bei der ein Grenzwert von ≥ 5 CTCs mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Gesamtüberleben assoziiert war (Theil et al., 2016).

Neben der Prognose können CTCs auch für die Überwachung von Therapieverläufen eingesetzt werden. Dabei können Veränderungen in der Anzahl an CTCs während der Therapie Echtzeitinformationen über die Wirksamkeit einer Behandlung aufzeigen. In mBCa-Patienten konnte bereits gezeigt werden, dass die Messung von CTCs um den Krankheitsstatus abzubilden, eine frühere Prognose für das PFS und OS darstellt als radiologische Methoden (Budd et al., 2006). Zusätzlich konnte die Messung von CTCs während der Therapie eine Aussage über den Progressions-Verlauf in mBCa-Patienten wiedergeben (Hayes et al., 2006). In weiteren klinischen Studien, wie der adjuvanten SUCCESS oder neoadjuvanten GEPARQuattro und GEPARQuinto Studie, soll weiter aufgeschlüsselt werden, ob die Veränderung der Anzahl der gemessenen CTCs während der Therapie einen Nutzen für die individuelle Behandlungsstrategie aufzeigt (Rack et al., 2020). Die erste SUCCESS-Studie konnte die prognostische Relevanz von CTCs im Blut vor und nach adjuvanter Chemotherapie von

Hochrisiko-BCa-Patientinnen zeigen (Rack et al., 2010). In der neoadjuvanten GEPARQuattro-Studie nahmen die Anzahlen an CTCs nach erfolgreicher neoadjuvanter Chemotherapie statistisch signifikant ab ($p = 0,002$), jedoch konnten keine Korrelationen zu klinischen Parametern oder Veränderungen des Primärtumors der BCa-Patientinnen detektiert werden (Riethdorf et al., 2010). Die Anzahl an CTCs konnte auch in Kastrations-resistenten (CR) PCa-Patienten als Monitoring-Marker für den Therapieverlauf eingesetzt werden, und zeigte sogar eine frühere Antwort als der standardmäßig genutzte PSA-Test (Scher et al., 2011). In Lungenkarzinom Patienten konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl an CTCs, die über den CellCollector detektiert wurden, nach erfolgreicher Therapie, verringerte (Gorges et al., 2015). Diese Beobachtungen könnten in Zukunft, durch die Echtzeitinformationen der Tumorerkrankung, einen klaren Nutzen für die Therapieüberwachung bedeuten.

Für Therapieentscheidungen in der Onkologie wird in der Regel die Expression der entsprechenden therapeutischen Zielstrukturen am Primärtumorgewebe bestimmt. In der metastasierten Situation steht dagegen meistens keine Tumorbiopsie der Metastasen zur Verfügung. Da sich Primärtumor und Metastasen hinsichtlich der Expression therapeutisch relevanter Gene unterscheiden können, werden Biomarker benötigt, die den aktuellen Status der Erkrankung widerspiegeln. In diesem Kontext könnte die Analyse von CTCs aus dem peripheren Blut zusätzliche wertvolle Informationen zur Expression therapeutischer Zielmoleküle sowie zur Aufklärung der Tumorerheterogenität liefern (van de Stolpe et al., 2011, Heitzer et al., 2013). Darüber hinaus ist die „Flüssigbiopsie“ im Gegensatz zur standardisierten Gewebsbiopsie nicht invasiv und kann zur Verlaufskontrolle in bestimmten Abständen wiederholt werden (Pantel and Alix-Panabieres, 2013). In Studien an Blutproben von BCa- oder PCa-Patienten konnte die molekulare Charakterisierung von CTCs bereits dazu beitragen, Patienten zu identifizieren, die ein hohes Risiko aufwiesen, Metastasen zu bilden (Wulfing et al., 2006, Bednarz et al., 2010). Maheswaran et al. konnten mit Hilfe einer Chip-Technologie CTCs für molekulare Analysen isolieren und genomische Veränderungen wie die T790M *EGFR*-Genmutation während eines Therapieverlaufs identifizieren (Maheswaran et al., 2008). Mutationen in Genen wie T790M, die in den EGRF-Signalweg involviert sind, beeinflussen die Wirksamkeit von anti-EGRF Therapien (Cetuximab, Panitumab, Gefitinib) und

können in eine Resistenzentwicklung involviert sein (Karapetis et al., 2008, Fumagalli et al., 2010). Gasch et al. konnten durch Mutationsanalysen der entsprechenden Zielgene (*EGRF*, die GTPase *KRAS* sowie *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*)) in CTCs von CRCa-Patienten eine starke Heterogenität innerhalb eines sowie zwischen verschiedenen Patienten herausstellen, was folglich die unterschiedlichen Therapieerfolge von EGFR-Inhibitoren erklären könnte (Gasch et al., 2013).

Neben Mutationsanalysen könnten immunhistochemische sowie Immunfluoreszenz-Analysen von therapielevanten Targets zu einer besseren Stratifizierung der Patienten beitragen. So kann sich zum Beispiel die Expression von HER2 zwischen Primärtumor/Metastase und CTCs innerhalb eines Patienten unterscheiden (Riethdorf et al., 2010, Ignatiadis et al., 2011, Hartkopf et al., 2012). Folglich könnten Patienten mit HER2-negativen Tumoren, jedoch HER2-positiven CTCs, möglicherweise ebenfalls von einer anti-HER2-Therapie (Trastuzumab, Lapatinib) profitieren. In einigen klinischen Studien werden die Detektion sowie die Charakterisierung des HER2-Status der CTCs bereits zur klinischen Entscheidungsfindung herangezogen. So werden in der DETECT III-Studie Patientinnen mit primär HER2-negativen metastasierten Mammakarzinomen, aber HER2-positiven CTCs randomisiert mit dem gegen HER2-gerichteten Therapeutikum Lapatinib behandelt (Schramm et al., 2016). In die TREAT-CTC-Studie werden CTC-positive Patientinnen mit nicht metastasiertem Mammakarzinom eingeschlossen (Ignatiadis et al., 2016). Ein ähnliches Beispiel liefert der Estrogenrezeptor-Status von CTCs bei Brustkrebspatientinnen. Der ER, als häufigstes therapeutisches Target in BCa, wird von 70 % - 80 % der Primärtumoren exprimiert, jedoch verfehlen Hormontherapien in 20 % - 25 % der Fälle ihre Wirkung (Osborne and Schiff, 2011, Lonning and Eikesdal, 2013). Dies könnte möglicherweise u.a. auf das Vorhandensein von ER-negativen CTCs zurückzuführen sein, bei denen die Therapie nicht wirksam ist (Babayán et al., 2013).

Die Analyse von tumorrelevanten Transkripten in CTCs könnte zusätzliche Echtzeitinformationen über die Tumorerkrankung liefern. Trotz einer Vielzahl von Studien, die bereits Transkriptionsanalysen von CTCs durchführten, fehlt

bisher eine umfassende Validierung in großen klinischen Studien. Zum Beispiel konnte die Analyse von *Keratin-19* Transkripten in peripherem Blut von BCa-Patienten Echtzeit-Informationen über das Vorhandensein von zirkulierenden epithelialen Zellen wie CTCs, aufzeigen. Nachgewiesene Korrelationen zwischen detektierten *Keratin-19*-mRNA-positiven CTCs nach der Chemotherapie und einem erneuten Rezidiv bzw. vermehrt auftretende krebsbedingte Todesfälle, unterstreichen die klinische Relevanz (Stathopoulou et al., 2001, Stathopoulou et al., 2003, Daskalaki et al., 2009, Xenidis et al., 2013, Xenidis et al., 2009). Darüber hinaus können Transkript-Analysen aktive Signalwege und Splice-Varianten identifizieren, die für Prozesse der Krebsentstehung und Progression sowie Therapiewirksamkeit relevant sind (Kasimir-Bauer et al., 2012, Vaiopoulos et al., 2014). Die Androgenrezeptor-Variante7 (ARV7) ist eine konstitutiv aktive Splice-Variante des AR. In Patienten mit mCRPCa konnte eine Assoziation von Transkripten dieser Splice-Variante in CTC-Pools mit der Ausbildung einer Kastrationsresistenz sowie Resistenz gegen Enzalutamid und Abirateron-Acetat nachgewiesen werden (Antonarakis et al., 2014). In einer weiteren Studie von Welti et al. konnte sogar bei Hormon-sensitiven bis hin zu Kastrations-resistenten PCa-Patienten zusätzlich eine Korrelation zwischen dem ARV7-Nachweis in Tumorgewebe und der Resistenzentwicklung sowie einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Gesamtüberleben der Patienten herausgestellt werden (Welti et al., 2016).

1.1.6 Aus CTCs generierte Zelllinien und CTC-Maus-Modelle

Funktionale Analysen von aus CTCs generierten Zelllinien könnten dazu beitragen, die Komplexität der Tumorzell-Disseminierung und Metastasierung weiter aufzuschlüsseln sowie neue mögliche Targets für die personalisierte Therapie zu identifizieren. Dabei kann zwischen CTC-Zelllinien-Modellen (*in vitro*) und CTC-Maus-Modellen (*in vivo*) unterschieden werden. Für die Etablierung von CTC-Zelllinien müssen CTCs kultiviert werden. Kurzzeitkultivierungen über einen Zeitraum bis zu 48 h sind mehrfach beschrieben worden, wohingegen die Langzeitkultivierung von CTCs bisher nur in wenigen Fällen gelang (Yu et al., 2014, Zhang et al., 2013, Cayrefourcq et al., 2015). Die bisher einzige immortale CTC-Zelllinie aus dem Blut eines CRCa-Patienten konnte von unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Team von Dr. Catherine Alix-Panabieres etabliert werden. Dabei konnte durch die

Transplantation dieser Zelllinie in ein Xenograft-Modell *in vivo* ein Tumor-erzeugendes Potential nachgewiesen werden (Cayrefourcq et al., 2015).

Darüber hinaus gelang es kürzlich unserer und zwei anderen Arbeitsgruppen, durch direkte Transplantation von aus Blutproben angereicherten CTCs in immunsupprimierte Mäuse, PDX („patient-derived xenotransplants“)-Modelle zu erzeugen. Dabei konnte Tumorbildung und Metastasierung beobachtet werden (Bacelli et al., 2013, Rossi et al., 2014). Darüber hinaus scheint die Expression der aus Blutproben von mBCa-Patientinnen stammenden CTCs von EpCAM⁽⁺⁾/CD44⁽⁺⁾/CD47⁽⁺⁾/MET⁽⁺⁾ mit einer erhöhten Anzahl von Metastasen sowie einer schlechten Prognose assoziiert zu sein (Bacelli et al., 2013). Des Weiteren konnten PDX-CTC-Maus-Modelle aus Patienten mit kleinzelligem sowie nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC, NSCLC) etabliert werden (Hodgkinson et al., 2014, Morrow et al., 2016). Diese CTC-Maus-Modelle zeigten ähnliche Reaktion auf die Chemotherapie, wie die in den Patienten beobachtete (Hodgkinson et al., 2014, Morrow et al., 2016). Interessanterweise waren die CTCs des NSCLC-Patienten EpCAM-negativ und konnten deshalb nicht von dem standardmäßig verwendeten CellSearch®-System detektiert werden. Mit Hilfe der Negativ-Depletion über den *RosetteSepTM CTC Enrichment Cocktail* wurden diese CTCs, von denen 80 % den EMT-Marker Vimentin exprimierten, isoliert und in die Maus injiziert.

1.2 Fragestellungen der Arbeit

Die vorliegende Doktorarbeit gliedert sich in drei Teilprojekte:

Das erste Projekt beschäftigte sich mit der Detektion von CTCs in Hochrisiko-Prostatakarzinompatienten. Trotz großer Fortschritte in der Früherkennung von Tumoren repräsentiert der einzige standardmäßig verwendete Biomarker im PCa PSA oftmals nicht den aktuellen Tumorstatus, und seine Bestimmung kann zu falschen therapeutischen Entscheidungen führen (de Bono et al., 2008). Darüber hinaus weist der Biomarker für lokalisierte PCa-Patienten nur einen geringen prädiktiven Wert auf und kann keine Informationen über unterschiedliche pathologische Stadien liefern (Brawer et al., 1999, Davis, 2009). Daher werden verlässliche Surrogat-Marker, die auch dazu in der Lage sind, minimale Resterkrankungen (MRD) abzubilden und so Therapieentscheidungen lenken zu können, dringend benötigt. In der metastasierten Situation sind CTCs bereits als prognostischer Biomarker anerkannt und konnten im Vergleich zu PSA sogar zu einer genaueren Vorhersage des Gesamtüberlebens der Patienten beitragen (Danila et al., 2007, de Bono et al., 2008, Saad and Pantel, 2012). Die klinische Relevanz von CTCs in der nicht-metastasierten Situation ist jedoch immer noch unklar. Dabei bleibt zu untersuchen, ob die Limitation der CTC-Detektion auf eine geringe Sensitivität der bisher angewandten Technologien zurückzuführen ist oder ob diese Patienten eine zu geringe Anzahl an CTCs aufweisen und daher die „Flüssigbiopsie“ keine Aussage ermöglichen kann. Das Ziel dieses Projektes war zu untersuchen, ob durch eine Kombination von drei CTC-Detektions-Technologien ((i) das CellSearch®-System, (ii) der CellCollector sowie (iii) der EPISPOT Assay) die Sensitivität der CTC-Detektion erhöht werden kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der Nachweis von CTCs mit bereits etablierten klinischen Risikofaktoren korreliert. Darüber hinaus sollten CTCs vor und nach der Behandlung (Prostatektomie) detektiert werden, um zu untersuchen, ob eine MRD vorliegt.

Im zweiten Teilprojekt sollte eine Methode zur Multiplex-Transkriptom-Analyse von einzelnen CTCs etabliert werden. Diese Einzelzell-Transkriptom-Analysen sollen helfen, aktive Signalwege, therapeutisch relevante Targets oder Splice-Varianten zu identifizieren, die für die Therapieentscheidung sowie Aufdeckung von Resistenzmechanismen eine wichtige Rolle spielen könnten.

Ziel des dritten Teilprojektes bestand in der Langzeitkultivierung von CTCs aus Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom sowie die phänotypische, molekulare und funktionale *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung der kultivierten Zellen.

Das Ziel dieser drei Teilprojekte der Doktorarbeit ist einen Beitrag zu neuen Erkenntnissen grundlegender Fragestellungen im hoch relevanten Bereich der personalisierten Medizin zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide (Primer)

Verwendete Primer wurden mittels der Primer3 Software entworfen (Untergasser et al., 2012) und sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Auflistung verwendeter Primer für Mutations- und Transkriptionsanalysen der Tumorzellen

gDNA Primer für Mutationsanalysen von 5'-3'		Anlagerung [°C]
p53_8/9 Fwd	CCTGGAGCTGGAGCTTAG	59
p53_8/9 Rev	CCAAGACTTAGTACCTGAAGG	59
p53_5-6_Fwd	CACTTGTGCCCTGACTTTC	59
p53_5-6_Rev	ACTGACAACCACCCTTAACC	59
p53_7_Fwd	CTGCTTGCCACAGGTCTC	59
p53_7_Rev	TGGAAGAAATCGGTAAGAGG	59
cDNA Primer für Gen-Transkriptionsanalysen von 5'-3'		Anlagerung [°C]
EpCAM Fwd	GCTGGTGTGTGAACACTGCT	60
EpCAM Rev	ACGCGTTGTGATCTCCTTCT	60
EGFR Fwd	CAGCGCTACCTTGTCATTCA	60
EGFR Rev	TGCACTCAGAGAGCTCAGGA	60
HER2 Fwd	TGCCTGTCCCTACAACCTACC	60
HER2 Rev	CAGACCATAGACCACTCGG	60
Keratin19 Fwd	CAGCGCTACCTTGTCATTCA	60
Keratin19 Rev	GATCTGCATCTCCAGGTCGG	60
β-Actin Fwd	CCAACCGCGAGAAGATGA	60
β-Actin Rev	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	60

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2.2: Übersicht verwendeter Antikörper [CC: CellCollector®; ICC: Immunzytochemie; ES: EPISPOT].

Antikörper	Klon	Ursprungs-organismus	Firma	Verdünnung
Primärantikörper				
EpCAM (NCL-ESA)	VU1D9	Maus	NOVOCASTRA, Berlin, D	WB: 1:200, ICC: 1:100
CD45-A647	MEM-28	Maus	Exbio	CC: 1:25

Material und Methoden

pan-Keratin-A488 (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18)	C11	Maus	Exbio	CC: 1:50
pan-Keratin-A488 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 15, 16, 19)	AE1/AE3	Maus	eBioscience	CC: 1:50
PSA	H50	Maus	Kooperation Prof. Lilja	ES: 500 ng/well
CellSearch (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18) + K19	C11	Maus	Janssen Diagnostics	ICC 1:10
HER2	CB11	Maus	Abcam	ICC 1:50
EGFR	H11	Maus	Dako	ICC 1:50
ER	SP1	Kaninchen	Sigma-Aldrich	ICC 1:100
p53	OP43	Maus	Merck Millipore	ICC 1:100
Sekundärantikörper				
rabbit anti-mouse AlexaFluor®546	polyklonal	Kaninchen	ThermoFischer Scientific	ICC 1:150
Anti-FGF2-Biotin	polyklonal	Kaninchen	Peptotech	ES: 90 ng/well
PSA-A555	H117	Maus	Kooperation Prof. Lilja	ES: 500 ng/well CC: 1:80
Anti-Biotin-FITC			Miltenyi Biotech	ES: 50 µl/1 ml PBS

2.1.3 Kommerzielle Kits

Tabelle 2.3: Übersicht verwendeter kommerziell erwerblicher Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
First strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription	Thermo Scientific
CellSearch® Circulating Tumor Cell Kit	CTC-Detektion	Janssen Diagnostics
CellSearch® Epithelial Cell Profil Kit	CTC-Detektion	Janssen Diagnostics

Material und Methoden

RosetteSep™ Human Circulating Epithelial Tumor Cells Enrichment Cocktail	CTC-Anreicherung, Leukozyten und Erythrozyten Depletion	StemCell Technologies,
Alexa Fluor 555 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Antikörper-Fluoreszenzmarkierung	Invitrogen
NucleoSpin® Tissue Kit	gDNA Isolierung aus Zellkulturzellen	Macherey-Nagel
innuPREP DNA Micro Kit	gDNA Isolierung aus	
RNeasy Micro Kit	RNA Isolierung	Qiagen
MessageBOOSTER™ cDNA Synthesis from Cell Lysates Kit	RNA Isolierung cDNA Synthese	Epicentre
CelluLyser™ Micro Lysis and cDNA Synthesis Kit	RNA Isolierung und cDNA Synthese	TATAA Biocenter
TATAA preAmp and qPCR	Preamplifikation der cDNA und qPCR	TATAA Biocenter
peqGOLD Gel Extraction Kit	DNA Extraktion aus Agarosegelen	Peqlab
RT ² PreAMP and RT ² Profiler PCR Array	Preamplifikation der cDNA und qPCR	Qiagen

2.1.4 Zelllinien und Zellmedien

Eine Auflistung der verwendeten Zelllinien ist in Tabelle 2.4 dargestellt. Die zur Kultivierung der Zelllinien verwendeten Medien sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.4 Auflistung der verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Typ	Medium
PC3	Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms	RPMI
LNCaP	Lymphmetastase eines Prostatakarzinoms	RPMI
NBTII	Harnblasenkarzinom	RPMI

Material und Methoden

MCF7	duktales Mammakarzinom	DMEM
SKBR3	duktales Mammakarzinom	DMEM
MDA-MB-468	Adenokarzinom der Brust	DMEM
MDA-MB-231	duktales Mammakarzinom	DMEM
CTC-ITB-01	Mammakarzinom mit Fernmetastasierung	RPMI complete

Tabelle 2.5 Auflistung der verschiedenen Zellkulturmedien

Medium	Inhaltsstoffe
RPMI-Medium	RPMI 1640 Medium (Gibco) 10 % FCS, hitzeinaktiviert (Gibco) 1 % Penicillin-Streptomycin Mix (Gibco) 1 % L-Glutamin (Gibco)
RPMI-Medium complete	RPMI 1640 Medium (Gibco) 10 % FCS, hitzeinaktiviert (Gibco) 1 % Penicillin-Streptomycin Mix (Gibco) 1 % L-Glutamin (Gibco) 5 ml Insulin-Transferrin-Selenium-A Supplement (100X) liquid 10 ng/ml FGF2 50 ng/ml EGF 0,1 µg/ml Hydrocortison (Suda and Dexter, 1981) (Jung et al., 2012) 0,2 µg/ml Choleratoxin (Okada et al., 1982)
Neurobasal Medium	Neurobasal A Medium 10 % b27 supplement 1 % L-Glutamin 0,005 % Heparin 20 ng/ml FGF2 20 ng/ml EGF
DMEM-Medium	DMEM Medium (PAN Biotech) 10 % FCS, hitzeinaktiviert (Gibco) 1 % Penicillin-Streptomycin Mix (Gibco) 1 % L-Glutamin (Gibco)

2.1.5 Patientenmaterial

Für CTC Analysen wurde peripheres Blut von Patienten mit Brust- oder Prostatakarzinom gesammelt. Für verschiedene Folgeanalysen wurde das Blut entweder in EDTA- oder in CellSave® Röhrchen abgenommen oder Patientenblut *in vivo* mit Hilfe der CellCollector-Applikation auf CTCs untersucht. Kollaborierenden Institutionen, die das Patientenmaterial bereitgestellten haben, sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6 Auflistung der Institutionen die Patientenproben gesammelt haben

Thema	Institution	Art der Blutproben	Blutvolumen	Krebsentität
Projekt 1	Martini-Klinik Tochtergesellschaft des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf	EDTA CellSave® CellCollector	7,5 ml	Prostata- karzinom
Projekt 2	Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Verpoort - Gemeinschaftspraxis Hämatologie, Schwerpunkt Onkologie	EDTA CellSave®	7,5 ml	Mamma- karzinom
Projekt 3	Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf	EDTA CellSave®	7,5 ml	Mamma- karzinom

Eine Einwilligungserklärung aller Patienten für die Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken sowie eine entsprechende Genehmigung der jeweils zuständigen Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg liegt für die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, vor (Approval No. PVN-3779).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur - Kultivierung und Lagerung der Zellkulturzellen

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem CO²-Gehalt von 5 % (RPMI-Medium/RPMI-Medium complete) oder 10 % (DMEM-Medium). Alle Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (37 °C, GIBCO) gewaschen, mit Trypsin-EDTA (0.05 %/0.02 %) abgelöst und abzentrifugiert (3 min, 1200 x g). Das Zellpellet wurde in frischem Zellmedium aufgenommen und verdünnt ausgesät.

Einmal im Monat wurden die Überstände der Zellen unter Verwendung des *Venor® GeM Classic Kits* (Minerva-Biolabs) gemäß des Herstellerprotokolls auf Mykoplasmen getestet.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, D) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Lagerung der Zelllinien

Zur Langzeitlagerung von Zelllinien wurden die Zellen wie 2.2.1.1 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde abhängig von der Größe in 1 - 5 ml Einfriermedium (90 % Zellmedium, 10 % DMSO) resuspendiert und jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte über Nacht bei -80 °C unter Verwendung einer Einfrierbox (ThermoFischer Scientific), die für eine zellschonende, graduelle Abkühlung von -1 °C/min sorgte. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, in 5 ml Zellmedium aufgenommen und für 3 min bei 1200 x g zentrifugiert. Im Anschluss konnten die Zellen in frisches Medium aufgenommen und weiter kultiviert werden.

2.2.1.3 Langzeitkultivierung von CTCs aus peripherem Blut

Für die Langzeitkultivierung von CTCs aus einer Blutprobe wurde 7,5 ml EDTA Blut unter Verwendung des RosettSepTM Reagenz in einem ersten Schritt von den

übrigen Blutzellen separiert. (siehe Kapitel 2.2.2.4.1). Nachfolgend wurde das Zellpellet in 3 ml RPMI-Medium *complete* (siehe Kapitel 2.1.4) aufgenommen und in 30 Wells einer 96-Well Platte verteilt. Die so gewonnenen Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % Luftfeuchtigkeit über zwei Wochen kultiviert, und nach 14 Tagen wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden bei einer 90%igen Konfluenz trypsiniert und in eine 12-Well Platte passagiert. Überlebende Zellen wurden weiter expandiert und für eine Langzeitlagerung wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, eingefroren.

2.2.2 Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut

2.2.2.1 Detektion von CTCs mit dem CellSearch®-System

Um CTCs semi-automatisiert anzureichern und zu detektieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem das von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene CellSearch®-System angewandt (Siewerts et al., 2009). Hierfür wurden 7,5 ml Blut in CellSave® *Preservative Tubes* abgenommen und innerhalb von 96 h entsprechend der Herstellerangaben des Kits prozessiert. Beim CellSearch®-System werden Tumorzellen über mit Ferrofluiden gekoppelte anti-EpCAM Antikörper angereichert und mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) sowie fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen pan-Keratine angefärbt. Die zur Unterscheidung von CTCs und Blutzellen dienende Visualisierung des hämatopoetischen Oberflächenmarkers CD45 (Allophycocyanin-markiert Antikörper) und die angereicherten und angefärbten Ereignisse wurden nachfolgend mit Hilfe der automatisierten Mikroskopeinheit (*CellTracks® Analyzer II*) ausgewertet. Positive Ereignisse wurden durch PD Dr. Sabine Riethdorf im Institut für Tumorbiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) als CTCs identifiziert.

2.2.2.2 Anreicherung von CTCs über das Parsortix™ System

Das Parsortix™ System (ANGLE pIc) verwendet eine patentierte Mikrofluidik-Technologie, bei der eine spezielle Filter Kassette für das Anreichern von CTCs aus peripherem Blut eingesetzt wird. Das Prinzip dieses Systems basiert auf einer größenabhängigen Selektion, wobei die kleinere Zellen von den größeren Zellereignissen, wie z.B. Tumorzellen, (6,5 µm oder 10 µm) getrennt werden

(Hvichia et al., 2016b). Die angereicherten CTCs wurden nachfolgend aus der Kassette in ein Eppendorfgefäß eluiert und konnten so für molekulare Folgeanalysen verwendet werden.

2.2.2.3 Anreicherung und Identifikation von CTCs mittels CellCollector Applikation

Als erste *in vivo* CTC-Detektionsmethode bindet der CellCollector an seiner funktionalisierten Oberfläche EpCAM-positive Zellen. Die 2 cm lange goldbeschichtete Spitze des Drahtes trägt ein 1-5 μm hohes Hydrogel, an dessen Oberfläche EpCAM-Antikörper konjugiert sind (siehe Abbildung 2.1 A). Durch den Einsatz der Polymerfilamente wird die funktionalisierte Oberfläche des Drahtes vergrößert. Der CellCollector wird intravenös in den Arm des Patienten eingeführt (vergleiche Abbildung 2.1 B). Die Inkubationszeit des Drahtes in der Armvene beträgt 30 min. In dieser Zeit kann ein deutlich höheres Blutvolumen, abhängig von Gefäßdurchmesser und Fließgeschwindigkeit des Blutes, auf CTCs untersucht werden als bei standardisierten 7,5 ml Blutröhrchen. Zirkulierende EpCAM-positive CTCs können also nach Kontakt mit den EpCAM-Antikörpern des CellCollectors gebunden und isoliert werden.

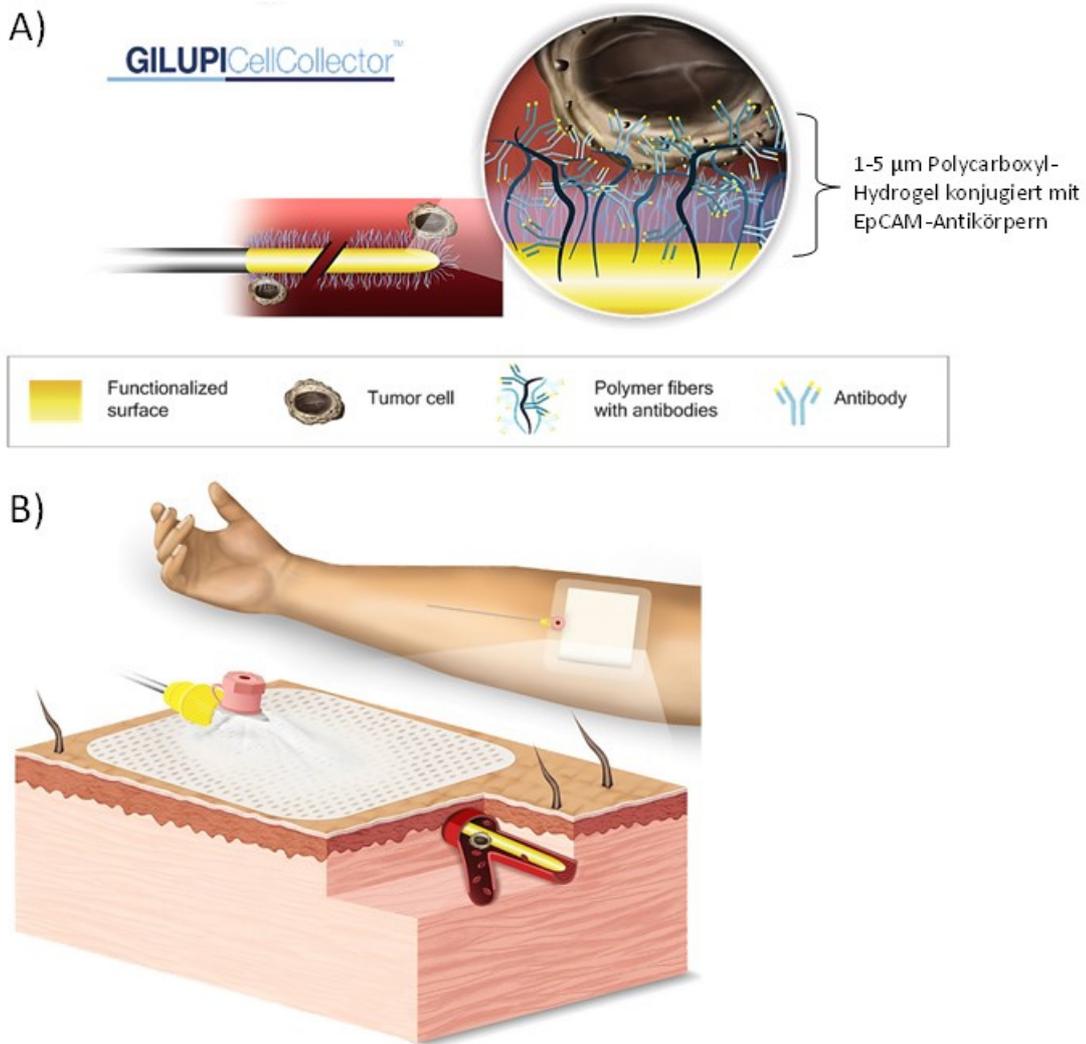


Abbildung 2.1 Der CellCollector. A) Schematischer Aufbau der Oberflächenstruktur des CellCollectors. B) Schaubild der CellCollector-Applikation in Vene eines Patienten.

(*In vitro*) Für die Evaluation des CellCollectors wurden Tumorzelllinienzellen in Blut von gesunden Probanden überführt und zusammen mit dem Draht für 30 min auf einem Rotator (Rotator Drive Star) inkubiert. Anschließend wurde der CellCollector 3 x mit PBS für je 10 Sek gewaschen und die Zellen wurden mit 100 % Aceton für 10 min fixiert. Die gebundenen Zellen wurden nachfolgend für 10 min permeabilisiert (0,1 % Triton X-100/PBS) und für 20 min blockiert (3 % BSA/PBS). Um die Tumorzellen identifizieren zu können, wurden pan-Keratine markiert (anti- pan-Keratin-A488, Klon C11, Exbio (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18), Verdünnung 1:50 in 3 % BSA/PBS; anti-pan-Keratin, Klon AE1/AE2, eBioscience (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 15, 16, 19) Verdünnung 1:50 in 3 % BSA/PBS), PSA mit Alexa Fluor® 555 konjugiert (siehe Kapitel 2.2.2.4.3) (anti

PSA-A555, Klon H117, Kooperation Prof. Lilia, Verdünnung 1:80 in 3 % BSA/PBS). Um unspezifisch gebundene Blutzellen von den Tumorzellen unterscheiden zu können, wurde der Leukozytenmarker CD45 verwendet (CD45-A47, clone MEM-28, Exbio, dilution 1:25 in 3 % BSA/PBS). Der Zellkern wurde mittels Hoechst angefärbt (Hoechst 33258, Sigma). Zellen, die als CTCs identifiziert wurden, mussten folgende Kriterien erfüllen: intakte Morphologie, positive Zellkernfärbung, pan-Keratin Signal, negativ für CD45, Zelldurchmesser 4 μm , und optional positiv für PSA. (*In vivo*) Für die *in vivo* Applikation wurde der CellCollector durch eine konventionelle Braunüle (32mm) gelegt und für 30 min in der Vene des Patienten inkubiert (Gorges et al., 2015). Nach dem Entfernen des Drahtes wurde er wie im oberen Absatz beschrieben prozessiert. Für die Auswertung wurde der CellCollector in eine spezifische Vorrichtung eingespannt und die Oberfläche wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) in 30°C-Schritten analysiert (vergleiche Abbildung 2.2).

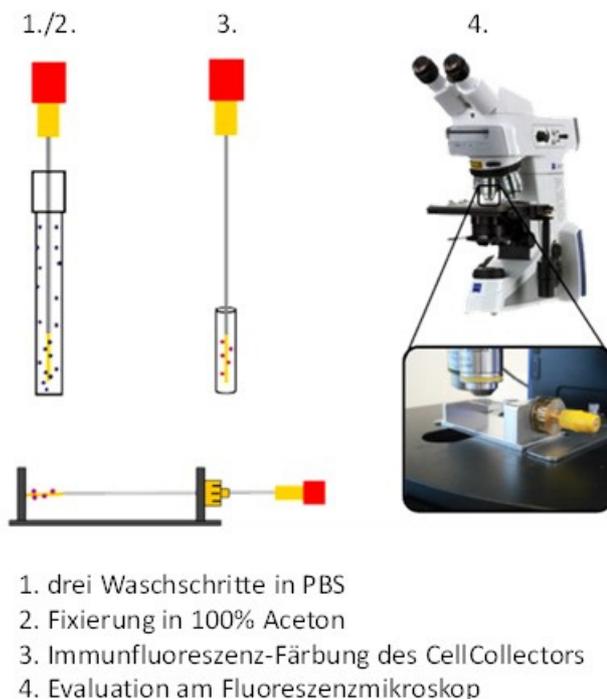


Abbildung 2.2 Prozess der CellCollector-Evaluation nach Draht-Entnahme aus der Vene des Patienten

2.2.2.4 Detektion von CTCs über den Dual-Fluoreszenz PSA/FGF2 EPISPOT-Assay

Der EPISPOT-Assay basiert auf einer EpCAM-unabhängigen Anreicherung der Tumorzellen (CD45-Depletion, siehe folgendes Kapitel). Im Verlauf der malignen Progression können einige Tumorzellsubpopulationen epitheliale Eigenschaften verlieren und mesenchymale Eigenschaften erwerben (epithelial-mesenchymale Transition (EMT)) (Thiery, 2002, Krantz et al., 2012, Schneck et al., 2015). Daher kann der alleinige Nachweis von CTCs über eine „epitheliale Selektion“ leicht zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Der Vorteil einer EpCAM-unabhängigen Anreicherung besteht nun darin, dass auch Tumorzellen, die durch die EMT ihr epitheliales Expressionsprofil reduzieren bzw. vollständig verlieren, trotzdem noch detektiert werden können. Darüber hinaus lässt sich mit Hilfe des EPISPOT-Assays ebenfalls eine Aussage über die Vitalität der isolierten Tumorzellen treffen. Das Verfahren basiert auf dem Nachweis von CTCs, die aktiv Proteine (in dieser Arbeit PSA und FGF2) sekretieren.

2.2.2.4.1 CTC-Anreicherung mittels RosetteSep™

Um Erythrozyten und Leukozyten von den potentiellen CTCs zu trennen wurde das RosetteSep™ Reagenz verwendet. Dabei binden Tetramer-Antikörperkomplexe an Oberflächenstrukturen von Erythrozyten und Leukozyten, wodurch sich sogenannte „Rosetten“ bilden, über die sich die Tumorzellen von den anderen Blutzellbestandteilen separieren lassen (siehe Abbildung 2.3). Für die Reaktion wurden 20 µl des Antikörperreagenzes pro Milliliter Blutvolumen zu einer EDTA-Probe gegeben und für mind. 20 min bei geringer Geschwindigkeit auf einem Rotator inkubiert. Die Probe wurde nachfolgend 1:1 mit PBS/2 % FCS verdünnt und vorsichtig auf ein definiertes Volumen Ficoll-Paque™ plus transferiert (Tabelle 2.7). Bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation (20 min, 1200 x g, Bremse: Stufe 1) wurden die schwereren „Rosetten“ von den CTCs separiert, so dass nur die Tumorzellen enthaltende Zwischenphase in ein neues 50 ml Falcon transferiert werden konnte. Die angereicherten Zellen wurden 2 x mit PBS/2 % FCS gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 1200 x g; Volumen siehe Tabelle 2.7) und entweder direkt auf die EPISPOT-Platte gegeben oder für einen späteren Gebrauch bei -80 °C gelagert. Zum Einfrieren wurde das Zellpellet mit 1,5 ml FCS/10 %

DMSO versetzt und in einer Einfrierbox (Thermo Scientific) zellschonende, graduell -1 °C/min runtergekühlt.

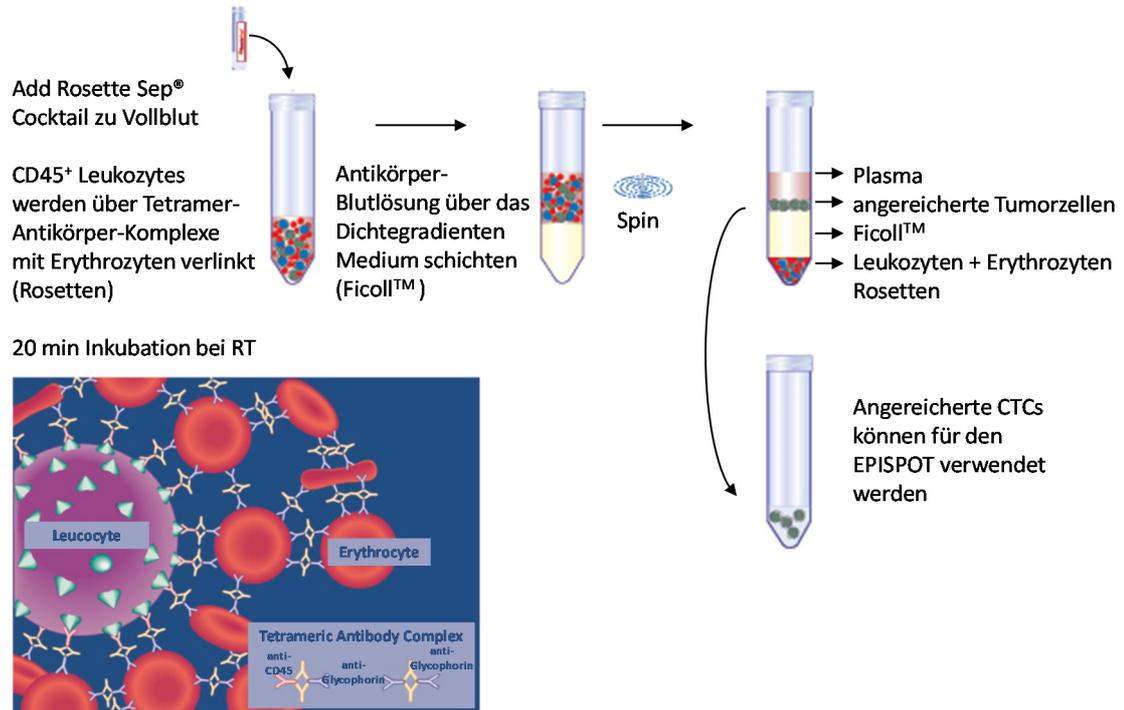


Abbildung 2.3 Anreicherung vom CTCs mittels Negativ-Depletion von CD45⁺ Leukozyten und Erythrozyten

Tabelle 2.7 Verwendetes Ficoll-Paques™ und Volumen in Abhängigkeit zum Blutvolumen

Blutvolumen [ml]	Ficoll-Paques [ml]	PBS/2 % FCS [ml]	Falcon-Reaktionsgefäß
2	3	2	15
4	4	4	15
5	15	5	50
8	15	8	50
10	15	10	50
15	15	15	50

2.2.2.4.2 Dual Fluoreszenz PSA/FGF2 EPISPOT

Abbildung 2.4 zeigt den detaillierten Ablauf des Dual Fluoreszenz PSA/FGF2 EPISPOT-Assays

Tag 1:

Am ersten Tag wurden die einzelnen Wells einer 96-Well-Platte (MultiScreen-IP, 0.45 m, steril, *High Protein Binding Immobilon-P Membrane*) mit 25 µl 70 % Ethanol aktiviert und über Nacht bei 4 °C mit Antikörpern gegen PSA und FGF2 beschichtet (anti-PSA, Klon H50 (5 ng/µl); anti FGF2, 500-M38 (10 ng/µl)).

Tag 2-3:

Die Membranen wurden 3 x mit 100 µl PBS gewaschen, für mind. 2 h mit PBS/5 % BSA bei 37 °C blockiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Als Positivkontrolle wurden Zellkulturzellen der Zelllinien LNCaP und NBTII verwendet, die PSA bzw. FGF2 sekretieren. Als Negativkontrolle dienten mit Medium gefüllte Wells ohne Zellen. Um die mit RosettSep™ angereicherten Tumorzellen auf die Membranen zu laden, wurden diese bei 37 °C aufgetaut, in 8 ml Medium (RPMI-Medium complete, siehe Kapitel 2.1.4) aufgenommen und 8 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,2 ml Medium resuspendiert, und es wurden je 100 µl der Zellsuspension/Well eingesetzt. Es folgte eine 48-stündige Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37 °C. Innerhalb dieser Zeit konnten lebende Tumorzellen Zielproteine sekretieren, die spezifisch durch die PSA bzw. FGF2-Antikörper gebunden wurden.

Tag 4:

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch neun Waschschrte (6 x PBS/0,1 % Tween und 3 x PBS) von den Membranen entfernt. Die gebundenen Proteine konnten mit Hilfe von Fluorophor-konjugierten Antikörpern als sogenannte „Spots“ visualisiert werden, wobei jeder „Spot“ eine lebende Tumorzelle repräsentierte. Für die Detektion von PSA wurde der entsprechende PSA-Antikörper mit AlexaFluor® 555 konjugiert (siehe Kapitel 2.2.2.4.3), und um FGF2 nachzuweisen wurde ein anti-FGF2-Biotin Antikörper mit einer anti-Biotin-FITC Kombination eingesetzt (anti-PSA Klon H117 (5 ng/µl); anti-FGF2 500-P18Bt (0,9 ng/µl)). Je 100 µl der anti-PSA und anti-FGF2-Biotin Antikörper-Lösung (in PBS/0,5 % BSA) wurden über Nacht bei 4 °C in den Wells inkubiert.

Tag 5:

Nach sechs Waschschritten (3 x PBS/0,1 % Tween, 3 x PBS) wurde der Biotin-FITC Antikörper (50µl/1ml PBS) für 2 h bei Raumtemperatur auf die Platte gegeben und anschließend durch 3 Waschrritte mit PBS entfernt. Die Unterseite der Platte wurde abgelöst und um das Auftreten von Antikörper-Artefakten zu vermeiden, wurde auf der Rückseite jede einzelne Membran mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurde die Platte bei 37 °C im Trockenschrank für ca. 30 min getrocknet.

Eine Re-Evaluierung der ausgezählten Ereignisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für die Erforschung von Biotherapien am Universitätsklinikum Montpellier durch die Institutsleiterin Dr. Catherine Alix-Panabières. Die standardisierte Auswertung wurde mit Hilfe eines mit einem KS ELISPOT-Axio Imager M1 ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Vision) durchgeführt.

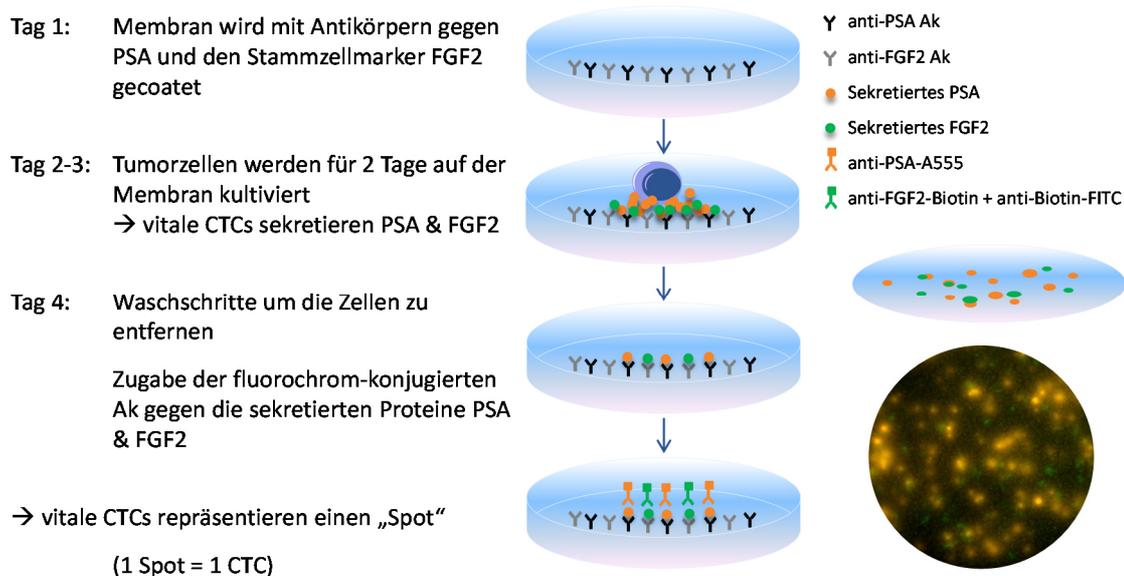


Abbildung 2.4 Detaillierter Methodenablauf des EPISPOT-Assays

2.2.2.4.3 Konjugation des PSA-Sekundärantikörpers mit Alexa Fluor® 555

Die Fluoreszenzmarkierung des PSA-Antikörpers (Klon H50) wurde mit dem *Alexa Fluor® 555 Monoclonal Antibody Labeling Kit* (Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 100 l des Antikörpers (1 mg/ml) mit 11 l 1 M Natriumbicarbonat-Puffer (Kit: Komponente C) versetzt und mit dem

Fluorochrom (Kit: Komponente A) vermischt. Die Antikörper-Lösung wurde für 1 h bei RT und über Nacht bei 4 °C langsam rotierend im Dunkeln inkubiert. Der nun markierte Antikörper wurde auf die im Kit enthaltenden Säulen (mit 2 ml Aufreinigungsgranulat) gegeben und für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der markierte Antikörper wurde in einem Auffanggefäß gesammelt und dessen Konzentration sowie Adsorption bei 550 nm mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrometers (Thermo Scientific) bestimmt. Die Lagerung des markierten Antikörpers erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolation von genomischer DNA aus Zellkulturzellen

Für die Isolation von gDNA aus Zellkulturzellen wurde das *NucleoSpin® Tissue Kit* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die gewonnene gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Isolation von genomischer DNA aus FFPE Material

Für die Isolation von gDNA aus FFPE Material wurde das *innuPREP DNA Micro Kit* (Analytik Jena) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um die Ausbeute der gDNA zu erhöhen, wurde der Lyseschritt, anders als im Protokoll beschrieben, über Nacht verlängert. Die gewonnene gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Isolation von RNA aus Zellkulturzellen

Die gesamt RNA wurde aus verschiedenen Zelllinien mittels dem *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (ThermoFischer Scientific) verwendet und die gewonnene cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*) PCR

Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes ist in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8 PCR Reaktionsmix

Volumen [μ l]	Substanz	Konzentration
2	10 x Gold Puffer	
2	MgCl ₂	25 mM
2	dNTPs	10 mM
0,5	Forward Primer	10 pmol/ μ l
0,5	Revers Primer	10 pmol/ μ l
0,2	Taq Gold Polymerase	5 u/ μ l
2	cDNA Template	5 ng/ μ l

add nukleasefreies H₂O zu 20 μ l Endvolumen

Die PCR wurde in einem peqStar Thermocycler (Peqlab) durchgeführt. Die einzelnen Schritte sowie die entsprechende Temperatur, Dauer und Zyklenzahl sind in Tabelle 2.9 aufgelistet. Wenn eine definierte DNA Konzentration (5 ng/ μ l) eingesetzt wurde, wurden 35 Zyklen gewählt, für die Einzelzell-Analysen (siehe Kapitel 2.2.4) betrug die Zyklenzahl 40.

Tabelle 2.9 Reaktionsbedingungen für die PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	94	0,5	35-40
Anlagerung der Primer	60	0,5	35-40
Amplifikation der DNA	72	0,5	35-40
Elongation	72	10	1

2.2.3.6 Quantitative und qualitative Messung von Nukleinsäuren

2.2.3.6.1 Nanodrop Spektrophotometer

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurden mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers bestimmt. Dazu wurde 1 µl der entsprechenden DNA- oder RNA-Lösung eingesetzt.

2.2.3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird die negativ geladene DNA nach dem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2%ige TAE Agarosegele (w/v) hergestellt, die mit GelRed (1:10 000) versetzt wurden. GelRed interkaliert in die DNA und kann durch UV-Stimulation bei 234 nm sichtbar gemacht und in einem Foto abgebildet werden.

Um die DNA Fragmente zu dokumentieren, wurde das „Gene Genius 2“ Geldokumentationssystem verwendet. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Isolation von DNA-Amplifikaten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des *peqGOLD Gel Extraction Kits* (Peqlab) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde basierend auf dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung des *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Für jede Sequenzierung wurden je 20 ng pro 1000 bp Länge des zu analysierenden DNA-Fragments eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 2.10 zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte über FinchTV (Version 1.4.0).

Tabelle 2.10 Zusammensetzung eines Sequenzierungs-PCR-Ansatzes

Volumen [µl]	Substanz	Konzentration
x	DNA-Template	20 ng/1000 bp x µl
3	Sequenzierungspuffer (5x)	5x
1	Primer	10 µM
2	BigDye-Mix (Polymerase, dNTPs, ddNTPs, Puffer)	2,5x
x	H ₂ O	

Endvolumen 20 µl

Tabelle 2.11 PCR-Programm für die Sequenzierungsreaktion

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	10	1
Denaturierung	96	0,33	35
Anlagerung der Primer	59	0,33	35
Amplifikation der DNA	60	1	35

Im Anschluss an die PCR wurde das Reaktionsprodukt über eine Ethanol-Fällung aufgereinigt. Hierzu wurde jeder Ansatz mit je 1/10 Vol. (2 µl) 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. (50 µl) 100% Ethanol versetzt und die DNA wurde bei 4 °C über Nacht gefällt. Anschließend wurde die DNA für 20 min bei Maximalgeschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und das Pellet wurde mit je 50 L 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10 min, Maximalgeschwindigkeit, 4 °C) und für 15 min bei 37 °C getrocknet. Die Auftrennung der BigDye-markierten DNA-Fragmente wurde mit dem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Sequenzauswertung erfolgte mit der Sequenz Analysis Software V3.07 (Applied Biosystems) und FinchTV V1.4.

2.2.4 Analysen von Einzelzellen

2.2.4.1 Isolation von Einzelzellen

Angereicherte und gefärbte Tumorzellen wurden unter Verwendung eines Mikromanipulationssystems isoliert. Das System besteht aus einem inversen Fluoreszenz-Picking-Mikroskop (Axiovert 200), der Steuerungseinheit TransferMan® NK2 und dem Mikromanipulator CellTram® Vario. Einzelne Zellen wurden in 3-5 µl Lysepuffer in ein PCR-Reaktionsgefäß transferiert und bei -80°C weggefroren.

2.2.4.2 RNA Isolation und cDNA-Synthese von Einzelzellen

Für die Analyse von Einzelzellen wurden vier verschiedene Kits zur RNA-Isolation und cDNA-Synthese getestet: das *NucleoSpin RNA II Kit®* (Macherey-Nagel), das *Picopure RNA Isolation Kit®* (Life technologies), das *MessageBooster Kit™* (Epicentre), und das *CelluLyser™ Micro Lysis and cDNA Synthesis Kit* (TATAA Biocenter). Alle Kits wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Das *NucleoSpin RNA II Kit®* und das *Picopure RNA Isolation Kit®* basieren auf einer RNA-Aufreinigung über Silica-Säulen. Nach der RNA-Isolierung wurde für diese Kits das *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific) für die cDNA-Synthese verwendet. Das *MessageBooster Kit™* basiert auf vier Schritten, als erstes die Zellyse, gefolgt von einer cDNA-Synthese, der *in vitro* RNA-Transkription kombiniert mit der Aufreinigung durch das *RNeasy MinElute Cleanup Kit* (Qiagen) (nach Angaben des Herstellers) und einer erneuten cDNA-Synthese der amplifizierten und aufgereinigten RNA. Bei dem *CelluLyser™ Micro Lysis and cDNA Synthesis Kit* schließt sich die cDNA-Synthese direkt an die Zellyse an. Die generierten cDNAs wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Multi-Marker Transkriptions Analysen

2.2.4.3.1 *PreAmp and CTC GrandPerformance Assay* (TATAA Biocenter)

Um die Multi-Marker Profile der Einzelzellen analysieren zu können, wurde vor der quantitative PCR (qPCR) eine Präamplifikation der untersuchten Gene durchgeführt. Hierzu wurde der *PreAmp GrandMaster®* Mix verwendet. Die PCR-Reaktionszusammensetzung und das Reaktionsprofil der Präamplifikation sind in Tabelle 2.12 respektive Tabelle 2.13 aufgeführt.

Tabelle 2.12 Reaktionsmix für die TATAA Präamplifikation

Volumen [µl]	Substanz	Konzentration
25	TATAA PreAmp Grand Master Mix (2x)	(2x)
15	Nukleasefreies H ₂ O	
5	PreAmp Primermix (fwd, rev)	50 nM
5	cDNA	
Endvolumen 50 µl		

Tabelle 2.13 Reaktionsbedingungen für die TATAA Präamplifikation

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	0,25	17
Anlagerung der Primer	60	2	17
Amplifikation der DNA	72	1	17
Anschließend direktes Einfrieren der Proben auf Trockeneis			

Nach dem letzten Elongationsschritt wurde die DNA direkt auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Im Anschluss an die Präamplifikation wurde für die qPCR der *CTC GrandPerformance Assay* eingesetzt. Der Reaktionsmix und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.14 und Tabelle 2.15 aufgelistet.

Tabelle 2.14 Reaktionsmix für den CTC GrandPerformance Assay

Volumen [µl]	Substanz	Konzentration
10	TATAA Probe Grand Master Mix (2x)	(2x)
4,8	Nukleasefreies H ₂ O	
0,8	Primer (fwd, rev)	50 nM
0,4	primerspezifische Sonde	
4	cDNA PreAmp (1:40 verdünnt)	
Endvolumen 20 µl		

Tabelle 2.15 Reaktionsbedingungen für den CTC GrandPerformance Assay

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	1
FAST 2 step:			
Denaturierung	95	5	35
Anlagerung der Primer und Amplifikation der DNA	60	30	35

Der *CTC GrandPerformance Assay* wurde mit einem Realtime PCR Detektionssystem (Bio-Rad CFX96) durchgeführt.

2.2.4.3.2 *RT² PreAMP and Profiler PCR Array* (Qiagen)

Zusätzlich wurden für Einzelzell-RNA-Profilstudien eine RT² Präamplifikation in Kombination mit *RT² Profiler PCR Array* angewandt. Die PCR Reaktionszusammensetzung sowie das Reaktionsprofil der Präamplifikation sind in Tabelle 2.16 respektive Tabelle 2.17 aufgeführt.

Tabelle 2.16 Reaktionsmix für die RT² Präamplifikation

Volumen [µl]	Substanz
Schritt 1:	
12,5	RT ² PreAMP PCR Mastermix
7,5	<i>PreAMP Pathway Primer Mix</i>
6	cDNA
Endvolumen 26 µl	
Schritt 2:	
2	<i>Side Reaction Reducer</i>
Nach der Reaktion auf 102 µl mit nukleasefreiem H ₂ O auffüllen	

Tabelle 2.17 Reaktionsbedingungen für die RT² Präamplifikation

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Schritt 1:			
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	12
Anlagerung der Primer und Amplifikation der DNA	60	2	12
Schritt 2:			
Reduktion der Nebenreaktionen	37	15	
Inaktivierung des Enzyms	95	5	

Nach der Präamplifikation konnte die amplifizierte cDNA für die qPCR des RT²-Profiler-PCR Array eingesetzt werden. Die 96-Well Platten sind mit spezifischen Primer/Well beschichtet inklusive *Housekeeping*-Genen sowie Positiv- und Negativkontrollen. Der Reaktionsmix und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.18 und Tabelle 2.19 aufgelistet.

Tabelle 2.18 Reaktionsmix für den RT² Profiler PCR Array 96-Well

Volumen [μ l]	Substanz	Konzentration
1350	RT ² SYBR Green Mastermix (2x)	(2x)
100	cDNA PreAmp	
1250	Nukleasefreies H ₂ O	
Endvolumen 2700 μ l (25 μ l/Well)		

Tabelle 2.19 Reaktionsbedingungen für den RT² Profiler PCR Array 96-Well

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1	1
FAST 2 step:			
Denaturierung	95	0,25	40
Anlagerung der Primer und Amplifikation der DNA	60	1	40

Um die Spezifität der Primer zu testen, wurde im Anschluss an die PCR Reaktion der Schmelzkurvenverlauf untersucht. Der RT² Profiler PCR Array wurde mit einem Realtime PCR Detektionssystem (Bio-Rad CFX96) durchgeführt.

2.2.5 Immunzytochemische Analysen (ICC)

2.2.5.1 Herstellung von Zytospins

Für immunzytochemische Analysen wurden von den zu charakterisierenden Tumorzellen sogenannte Zytospins hergestellt. Hierzu wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben trypsiniert, gewaschen, und es wurde eine definierte Zellzahl in einen auf einem Objektträger befestigten Trichter gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Zytospinzentrifuge (Rotofix 32, Hettich) 3 min bei 300 x g

zentrifugiert und so auf einem Objektträger gebracht. Die Zytospin-Präparate wurden über Nacht bei RT getrocknet und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

2.2.5.1.1 Immunfluoreszenz-Färbung auf Zytospins

In Tabelle 2.20 und Tabelle 2.21 sind die verschiedenen Färbeprotokolle für die Oberflächenmarker EpCAM, EGFR und HER2, den kernständigen ER und die Pan-Keratine beschrieben.

Tabelle 2.20 Protokolle für die Immunfluoreszenz-Färbungen von EpCAM, EGFR, Her2, ER

Arbeitsschritt	EpCAM	EGFR	HER2	ER
Fixierung	-	10 min Fixierungs- lösung B	15 min PFA 4 %	10 min PFA 0,5 %
Permeabili- sierung	-	-	-	10 min PBS/0,1 % Triton-x
Waschen mit PBS		2 x 1 min	2 x 1 min	2 x 1 min
Blockieren	10 min 10 % AB Serum	10 min 10 % AB Serum	10 min 10 % AB Serum	20 min 10 % AB Serum
Primär- antikörper	45 min 1:100	30 min 1:50	30 min 1:50	über Nacht 4 °C 1:100 ER SP1
Waschen mit PBS	2 x 1 min	2 x 1 min	2 x 1 min	3 x 1 min
Sekundär- antikörper	30 min 1:200 AlexaFluor® 546 Kaninchen Anti-Maus	45 min 1:200 AlexaFluor® 488 Kaninchen Anti-Maus	45 min 1:200 AlexaFluor® 488 Kaninchen Anti-Maus	45 min 1:250 AlexaFluor® 488 Affe Anti- Kaninchen
Waschen mit PBS	3 x 1 min			
Kernfärbung	5 min Hoechst	5 min Hoechst	5 min Hoechst	5 min Hoechst
Waschen mit PBS	3 x 1 min			

Tabelle 2.21 Protokolle für die Immunfluoreszenz-Färbungen von Pan-Keratinen

Arbeitsschritt	Pan-Keratin (AE1/AE3 & C11)	Pan-Keratin (CellSearch®)
		alle Reagenzien zusammen für 20 min inkubieren
Fixierung	-	1:20
Permeabilisierung	-	1:10
Blockieren	10 min 10 % AB Serum	
Primärantikörper	45 min 1:200	1:10
Waschen mit PBS	3 x 1 min	
Kernfärbung	5 min Hoechst	1:10
Waschen mit PBS	3 x 1 min	3 x 1 min

2.2.5.1.2 Immunfluoreszenz-Färbung in Suspension für Einzelzellanalysen

Für Einzelzell-RNA-Analysen (siehe Kapitel 2.2.4) mussten die Zellen ohne Fixierung und Permeabilisierung in Suspension gefärbt werden. Die Immunfluoreszenzfärbungen von EpCAM und pan-Keratinen sind in Tabelle 2.22 beschrieben.

Tabelle 2.22 Protokolle für die Immunfluoreszenz-Färbungen von EpCAM und pan-Keratinen in Suspension

Arbeitsschritt	EpCAM	Keratin (CellSearch®)
		20 min auf einem Rotator
Primärantikörper	45 min auf einem Rotator 1:100 in 10 % AB-Serum (Volumen 200 µl)	1:10 in CellSearch® Dilution Buffer direktmarkierter Antikörper gegen Keratin 8, 18 und 19
Waschen mit PBS	1 ml PBS dazugeben 4 min bei 400 x g zentrifugieren Überstand verwerfen	1 ml PBS dazugeben 4 min bei 400 x g zentrifugieren Überstand verwerfen
Sekundärantikörper	30 min auf einem Rotator 1:150 AlexaFluor® 546	

Material und Methoden

	Kaninchen Anti-Maus (Volumen 200 µl)	
Waschen mit PBS	1 ml PBS dazugeben	
	4 min bei 400 x g zentrifugieren	
	Überstand verwerfen	
	Zellen in 200 µl PBS resuspendieren und auf einen Objektträger bringen	Zellen in 200 µl PBS resuspendieren und auf einen Objektträger bringen

2.2.5.1.3 H₂O₂ Immunzytochemie (p53)

Das Protokoll der H₂O₂ immunzytochemischen Färbung von p53 ist in Tabelle 2.23 aufgeführt.

Tabelle 2.23 Protokoll der H₂O₂ immunzytochemischen Färbung von p53

Arbeitsschritt	p53
Fixierung	10 min Fixierungslösung B
Permeabilisierung	10 min PBS/1 % Triton-x
Waschen mit PBS	1 x 3 min
Blockieren	5 min H ₂ O ₂ Blockieren
Waschen mit PBS	1 x 3 min
Primärantikörper	45 min 1:100 in 10 % AB-Serum
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Sekundärantikörper	15 min EnVision (Dako)
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Reagenz	10 min 1:50 DAB
Waschen mit Aqua dest.	20 Sek 1:5 Hämalaun Kurz Leitungswasser dann wieder Aqua dest.

	80 % 3 Sek
Entwässerung	90 % 3 Sek
EtOH-Xylol-Bad	100 % 2 min
	Xylol 2 min
Eindeckeln	Eukitt

2.2.6 Statistische Analysen

Folgende statistische Auswertungen wurden für das in Kapitel 2.2.2 beschriebene Projekt eingesetzt. Für die statistische Evaluation klinischer Parameter mit CTC-Inzidenzen, wurden Patienten mit einem *cut off* von ≥ 1 CTC oder einem *cut off* von ≥ 5 CTCs als CTC-positiv und CTC-negative stratifiziert. Um Signifikanzen zwischen den detektierten CTCs und klinischen Parametern bestimmen zu können, wurden der Wilcoxon-Test für kontinuierlich kodierte Variablen und der Chi-Square (*likelihood*) Test für kategoriale Variablen angewandt. Um die CTC-Positivität vor und drei Monate nach der RP zu bestimmen, wurde der McNemar's Test verwendet. Um das Risiko einer PSA Progression nach RP zu bewerten, wurden CTC-positive und -negative Patienten mittels Chi-Square (*likelihood*) Test untersucht. Bei allen eingesetzten Testverfahren handelt es sich um zweiseitige Analysen, bei denen ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant gilt. Für die Datenanalyse wurde RStudio® (Version 0.99.491), als Zusatzsoftware von R (3.2.2) genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich verschiedener CTC-Detektionsmethoden in Hochrisiko-Prostatakarzinom-Patienten

Im Rahmen der multizentrischen internationalen „TRANSCAN“-Studie sollten, im ersten Teilabschnitt dieser Doktorarbeit, CTCs über die Kombination von drei unterschiedlichen Detektionstechnologien bei Hochrisiko-Prostatakarzinom (PCa)-Patienten nachgewiesen und charakterisiert werden. Das Ziel dieses Teilprojektes bestand darin, die klinische Relevanz von CTCs in der nicht-metastasierten Situation zu analysieren.

Die Bestimmung der Anzahl an CTCs erfolgte über das CellSearch®-System, den CellCollector und den EPISPOT-Assay jeweils einen Tag vor und 3 Monate nach Radikaler Prostatektomie (RP).

3.1.1 Patienten-Charakteristika

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 86 Patienten vor der RP und 52 dieser Patienten erneut 3 Monate nach der RP rekrutiert werden. Die klinischen Parameter der Patienten vor RP sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Im Median waren die Patienten 67 Jahre alt, der Median des PSA-Wertes betrug 11,9 ng/ml und der Gleason Score lag im Median bei 8,2. Insgesamt konnte bei 84 der 86 Patienten eine RP durchgeführt werden. Acht dieser Patienten bekamen zusätzlich eine Hormontherapie. In einem der Patienten konnten Lymphknoten-Metastasen detektiert werden. Nach erfolgter RP sank der mediane PSA-Wert auf 0,04 ng/ml, der mediane Gleason Score lag bei 8, das Prostatavolumen betrug im Median 35 ml und das mediane Tumor Volumen lag bei 11,5 ml (Tabelle 3.1). Während der Operation wurden insgesamt bei 33 der 84 Patienten (39,3%) Lymphknoten-Metastasen diagnostiziert.

Tabelle 3.1: Klinische Parameter der Patienten-Kohorte

Vor radikaler Prostatektomie	
Parameter	gesamt
Patienten	86
Alter, Median (IQR), Min-Max	67 (60; 71)
BMI, Median (IQR), Min-Max	26,3 (24,6; 28,6)
PSA, Median (IQR), Min-Max	11,9 (6,3; 26,6)
Gleason Score	

Ergebnisse

3+3	0 (0)
3+4	9 (10,5)
4+3	5 (5,8)
4+4	72 (83,7)
Tumor Stadium	
T1c	37 (43)
T2a	20 (23,3)
T2b	20 (23,3)
T2c	5 (5,8)
T3a	4 (4,7)
N-Status	
N0	84 (98,8)
N1	1 (1,2)
M-Status	
Mx	54 (63,5)
M0	31 (36,5)
Hormonal therapy	
yes	8 (9,4)
no	77 (90,6)
Nach radikaler Prostatektomie	
Radikale Prostatektomie	84 (97,7)
1. PSA Wert nach Operation, Median (IQR, n=27)	0,04 (0,01-0,16)
Alter beim Zeitpunkt der Operation (Jahre), Median (IQR)	67 (60-71)
Prostatavolumen (ml), Median (IQR), Min-Max	35 (25-50)
Tumolvolumen (ml), Median (IQR), Min-Max	11,5 (4,3-17,9)
pN-Status	
Nx	1 (1,2)
N0	50 (59,5)
N1	33 (39,3)
pT-Stage	
pT2	22 (26,2)
pT3a	24 (28,6)
pT3b	38 (45,2)
pGleason Score	
3+3	0 (0)
3+4	17 (20,2)
4+3	36 (42,9)
4+4	31 (36,9)

3.1.2 Vergleich von CTC-Detektionsraten über verschiedene Nachweisverfahren

3.1.2.1 Das CellSearch®-System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene CellSearch®-System als Referenzmethode für die CTC-Detektion verwendet. Die CellSearch®-Methode basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung der EpCAM-positiven Zellen über anti-EpCAM-Antikörper, die mit Eisenpartikeln (Ferrofluiden) konjugiert sind (Cristofanilli et al., 2004). Dabei binden diese Antikörper-Komplexe mit hoher Sensitivität, aber geringer Spezifität epitheliale (EpCAM-positiv) Tumorzellen, die nachfolgend mit Hilfe von Magneten aus dem peripheren Blut von den übrigen Zellen separiert werden können. Die angereicherten Zellen werden fixiert, permeabilisiert und mit DAPI und fluoreszenzmarkierten pan-Keratin-Antikörpern gefärbt, so dass epitheliale Zellen als Surrogat für CTCs identifiziert werden können. Der Ausschluss falsch positiver Zellen erfolgt über eine zusätzliche Färbung der Blutzellen durch den Leukozytenmarker CD45. Repräsentative pan-Keratin-positiv und CD45-negativ Tumorzellen, die im Rahmen dieser Arbeit bei Hochrisiko-Prostatakarzinom-Patienten detektiert werden konnten, sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

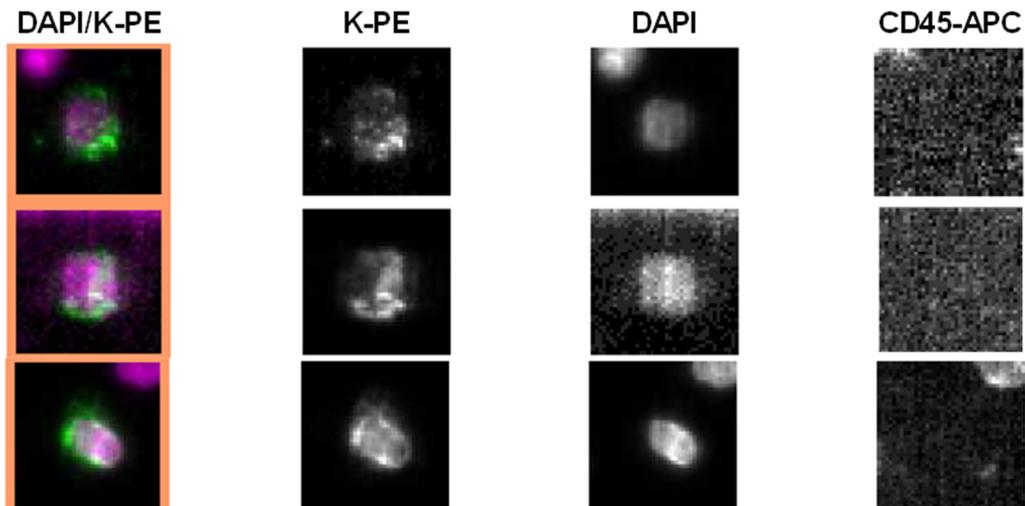


Abbildung 3.1 Repräsentative pan-Keratin-positiv (K-PE) und CD45-negativ CTCs, die aus Blutproben von Hochrisiko-PCa-Patienten über das CellSearch®-System detektiert wurden. DAPI wurde für die Zellkernfärbung eingesetzt.

3.1.2.2 Der CellCollector

Neben dem CellSearch®-System wurde erstmals der *in vivo* CellCollector für die Detektion von CTCs eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit musste zunächst ein standardisiertes Färbeprotokoll etabliert werden, das spezifisch Tumorzellen anfärbt, die vom CellCollector gebunden wurden. Hierfür wurden zunächst Tumorzellen aus der Zellkultur in Blut überführt und gemeinsam mit dem CellCollector für 30 min auf einem Rotator inkubiert. Um mögliche Blutrückstände vom Draht zu entfernen, wurde dieser nachfolgend gewaschen und gebundene Tumorzellen durch Aceton fixiert. Die isolierten Tumorzellen konnten über den Nachweis von pan-Keratinen und mittels Kernfärbung (Hoechst33342) identifiziert und ausgezählt werden. Unspezifisch gebundene Leukozyten wurden anhand einer CD45-Färbung ausgeschlossen. Nach der Validierung von verschiedenen Antikörpern in unterschiedlichen Konzentrationen (Daten nicht abgebildet) konnte nachgewiesen werden, dass eine Kombination von den pan-Keratin Antikörpern des Klons C11 und AE1/AE3 in einer Konzentration von 20 ng/µl die intensivsten und spezifischsten Färbesignale aufzeigte (Abbildung 3.2). Ergänzend wurde eine Färbung für das Prostata-spezifische Antigen (PSA) als zusätzlicher CTC-Marker durchgeführt. Um die Spezifität dieses Antikörpers zu testen wurde eine PSA-positive (LNCaP) sowie eine PSA-negative (PC3) Zelllinie untersucht. Repräsentative pan-Keratin-positive sowie PSA-positive/negative Tumorzellen, die vom CellCollector gebunden wurden, sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

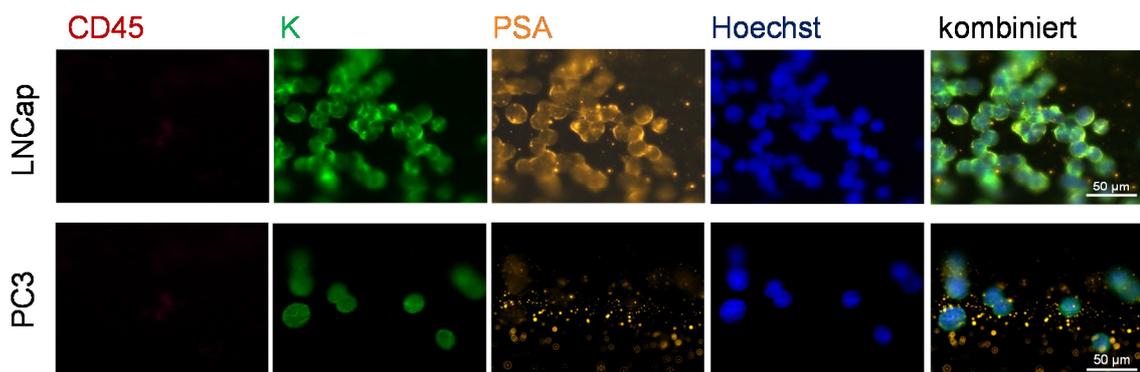


Abbildung 3.2 Repräsentative PCa-Zelllinien-Zellen, die über den CellCollector isoliert wurden. Für die *in vitro* Vorversuche wurden Zellkulturzellen (LNCaP und PC3) in Blut von gesunden Probanden überführt und zusammen mit dem CellCollector für 30 min auf einem Rotator inkubiert. Gebundene Tumorzellen wurden als pan-Keratin (K) positiv (grün) und PSA-positiv (orange) (LNCaP) oder PSA-negativ (PC3) und CD45-negativ identifiziert. Für die Zellkernfärbung wurde Hoechst33342 verwendet (Zeiss, Axiovision, 200 x Vergrößerung).

Betrachtet man die in Abbildung 3.2 gezeigte Färbung, kann ein starkes, spezifisches Signal für pan-Keratin-positive LNCaP- sowie PC3-Zellen abgebildet werden. Darüber hinaus zeigten PSA-positive LNCaP-Zellen eine spezifische Färbung des PSA-Proteins, wohingegen die PC3 als PSA-negative Zellen, nicht angefärbt wurden. Es konnten keine Signale des Leukozytenmarkers CD45 auf den Prostatakrebszelllinien nachgewiesen werden.

Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung eines spezifischen Färbeprotokolls, konnte der CellCollector für die CTC-Detektion in den ersten PCa-Patienten eingesetzt werden. Dabei wurde der CellCollector für 30 min in der Vene des Patienten inkubiert und im Anschluss wie zuvor beschrieben prozessiert. Beispiele von CTCs, die über den CellCollector isoliert werden konnten, sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

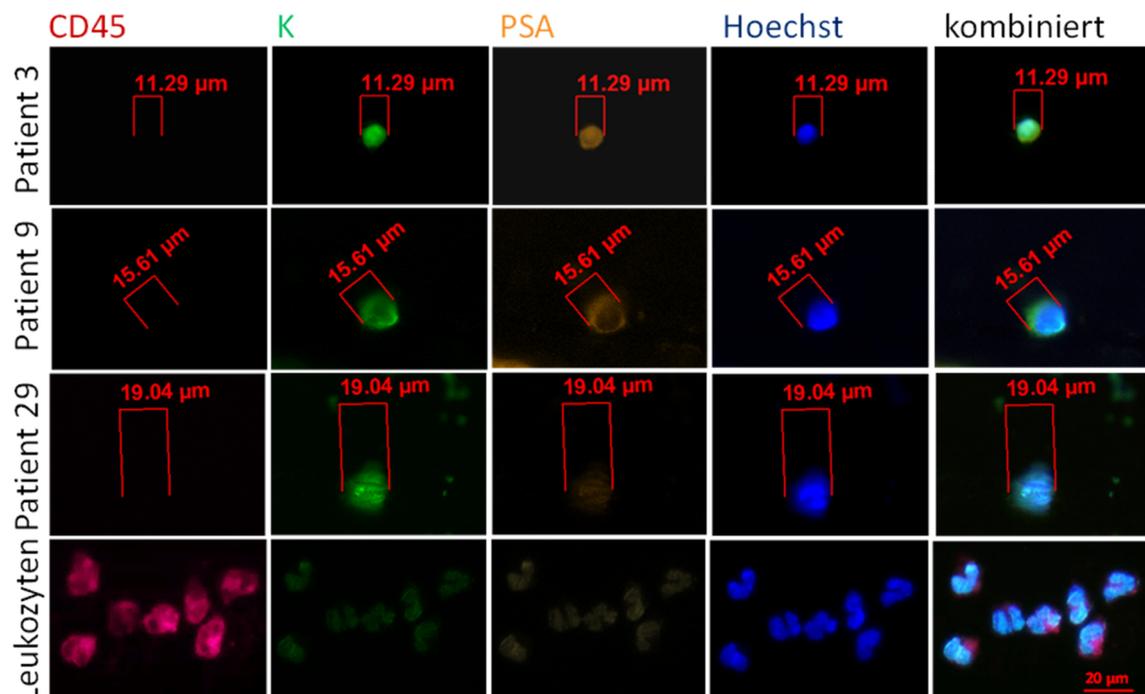


Abbildung 3.3 Repräsentative CTCs, die über den CellCollector isoliert wurden sowie unspezifisch gebundenen Leukozyten. Detektierte CTCs sind positiv für pan-Keratin (K) (grün), optional positiv für PSA (orange) und negativ für den Leukozytenmarker CD45. Für die Zellkernfärbung wurde Hoechst33342 verwendet. (Zeiss, Axiovision, 200 x Vergrößerung).

Auch in der *in vivo* Anwendung des CellCollectors ließen sich nach der Färbung des Drahtes eindeutig pan-Keratin-positive Zellen von den unspezifisch gebundenen CD45-positiven Leukozyten unterscheiden. Darüber hinaus konnte ein klares PSA-Signal bei einem Großteil der über die Keratin-Färbung

Ergebnisse

nachgewiesenen CTCs detektiert werden. Insgesamt waren 71 % (110/155) der durch die Keratin-Färbung identifizierten CTCs auch PSA-positiv.

Um eine standardisierte Auswertung der über den CellCollector detektierten CTCs zu gewährleisten, wurden in einer Online-Galerie 138 Bilder von CTCs hochgeladen. Einzelne Bilder konnten von allen an der Studie beteiligten Partnern, evaluiert und kommentiert werden. Im Anschluss an den Evaluationsprozess wurde die Übereinstimmung der einzelnen Zentren mittels Kappa Statistik analysiert (vergleiche Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 CellCollector - Übereinstimmung der Zentren bei der Identifikation von CTCs (Kappa Statistik)

x	C1	C2	C4	C5	C6	Kappa κ Statistik Klassifikation	
C1	x	0,62	0,48	0,68	0,5	0,81-1	sehr gut
C2	0,62	x	0,44	0,47	0,39	0,61-0,8	gut
C4	0,48	0,44	x	0,54	0,55	0,41-0,6	mittelmäßig
C5	0,68	0,47	0,54	x	0,52	0,21-0,4	leicht
C6	0,5	0,39	0,55	0,52	x	0-0,2	schwach
Gesamtübereinstimmung für alle Center: 0,62							

Die Gesamtübereinstimmung von allen Partnern lag bei 0,62. Dieser Wert spiegelt bei 5 Teilnehmern eine sehr gute Übereinstimmung (s. Klassifikation) wider und garantiert einen standardisierten und zuverlässigen Auswertungsprozess.

3.1.2.3 Der EPISPOT-Assay

Der EPISPOT-Assay basiert auf einer EpCAM-unabhängigen Anreicherung der Tumorzellen (CD56-Depletion, siehe Kapitel 2.2.2.4.1). Im Verlauf der malignen Progression können einige Tumorzellsubpopulationen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und mesenchymale Zellphänotypen hervorbringen (epithelial-mesenchymale Transition (EMT)) (Thiery, 2002, Krantz et al., 2012, Schneck et al., 2015). Daher kann der alleinige Nachweis von CTCs über die „epitheliale Selektion“ leicht zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Der Vorteil einer EpCAM-unabhängigen Anreicherung besteht also darin, dass verschiedene CTC-Phänotypen (epitheliale und mesenchymale) detektiert werden können. Darüber hinaus lässt sich mit Hilfe des EPISPOT-Assays eine Aussage über die Vitalität der isolierten Tumorzellen treffen. Dabei können vitale Tumorzellen über die aktive Sekretion von Proteinen identifiziert werden.

Die Technologie des Dual-PSA/FGF2-EPISPOTs (Alix-Panabieres et al., 2007), sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ebenfalls etabliert werden. Dazu sollte in einem Vorversuch mit Tumorzelllinien getestet werden, ob sezerniertes PSA sowie FGF2 mit Hilfe des EPISPOT-Assays nachgewiesen werden kann. Dafür wurde eine Nitrozellulose-Membran mit Antikörpern gegen die Zielproteine PSA und FGF2 beschichtet und anschließend wurden PSA-sekretierende Zellen (LNCaP) sowie FGF2-sekretierende Zellen (NBTII) für 48 h auf der Membran kultiviert. In einem letzten Schritt sollte gebundenes PSA bzw. FGF2 durch die Zugabe von Fluorophor-konjugierten Antikörpern markiert werden. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden die fluoreszierenden PSA- respektive FGF2 Signale als sogenannte „Immunospots“ sichtbar, bei denen ein Spot eine PSA bzw. FGF2 sekretierende Zelle repräsentiert (Abbildung 3.4).

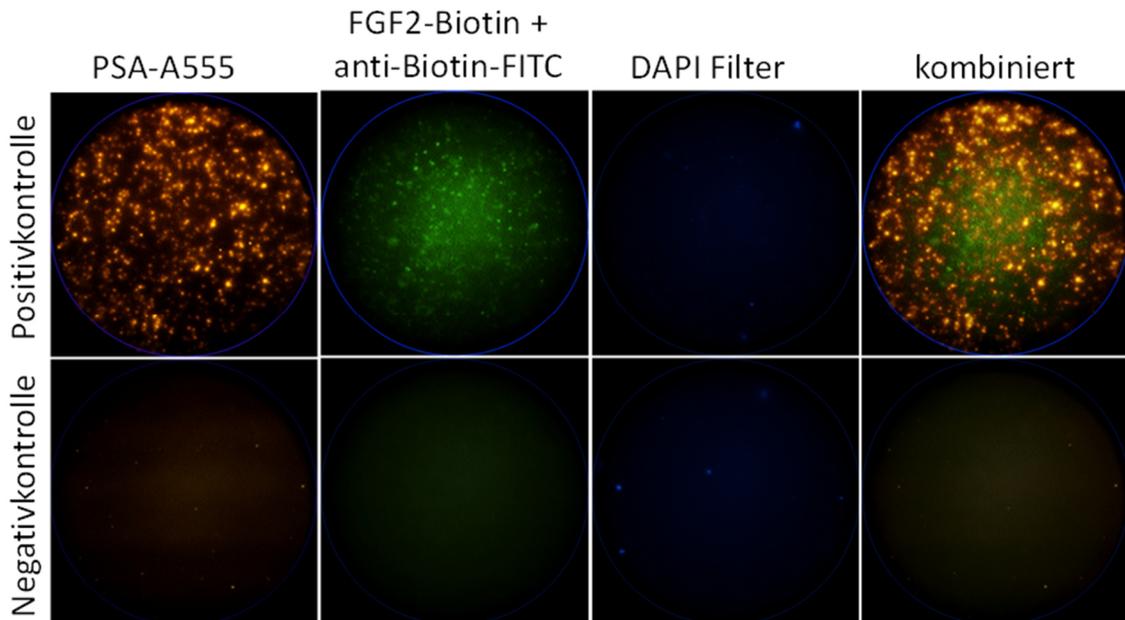


Abbildung 3.4 Repräsentative PSA- (orange) und FGF2- (grün) Immunospots, die mittels EPISPOT-Assay detektiert wurden. Zellen der LNCaP (PSA-sekretierend) und NBTII (FGF2-sekretierend) Zelllinien wurden als Positivkontrolle verwendet (Positivkontrolle: 2000 Zellen/Zelllinie, Negativkontrolle: keine Zellen). Die Zellen wurden für 48 h auf der Membran kultiviert und sekretierte Proteine durch Fluorophor-konjugierte Antikörper gegen PSA respektive FGF2 markiert. Der DAPI Filter fungierte als zusätzliche Kontrolle, um Artefakte von Immunospots unterscheiden zu können (Zeiss, KS ELISPOT-Axio Imager M1, 50 x Vergrößerung).

Über die EPISPOT-Technologie konnten nach 48-stündiger Kultivierung spezifische Signale für sekretiertes PSA sowie FGF2 nachgewiesen werden, wohingegen die Negativkontrolle ohne Zellen keine Signale erkennen ließ.

Nachfolgend konnte die EPISPOT-Technologie für die Analyse von CTCs aus Patientenblut eingesetzt werden (Abbildung 3.5).

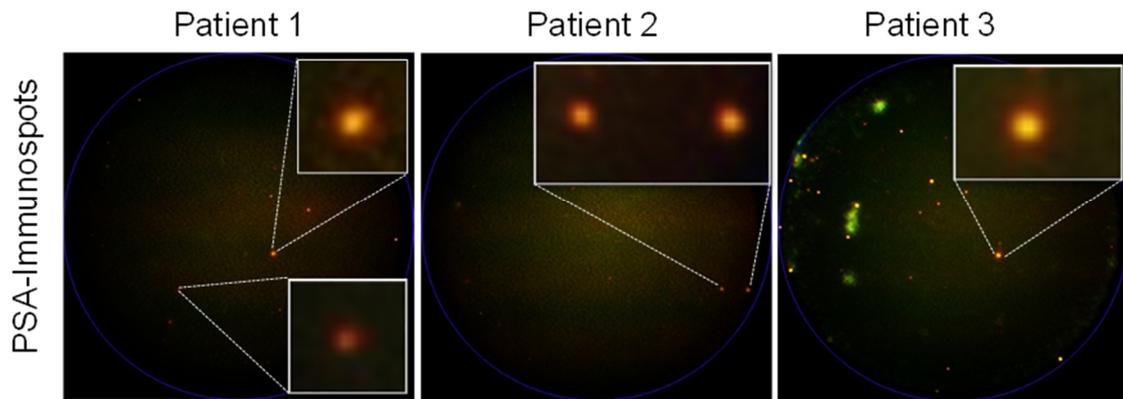


Abbildung 3.5 Repräsentative PSA-Immunospots der angereicherten CTCs, die mittels EPISPOT-Assay detektiert wurden. Die durch eine Negativ-Depletion von Blutzellen (CD56 Leukozyten und Erythrozyten) angereicherten CTCs wurden für 48 h kultiviert und sekretiertes PSA durch fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert. (Zeiss, KS ELISPOT-Axio Imager M1, 50 x Vergrößerung).

Betrachtet man Abbildung 3.5 sind starke Signale der PSA-positiven Immunospots von drei unterschiedlichen Patienten zu sehen. Jeder detektierte PSA-Spot wurde zusätzlich auf FGF2-Positivität untersucht. In der gesamten Studie konnte jedoch kein Signal für FGF2-positive Immunospots in Patientenproben detektiert werden (0/276).

3.1.2.4 Hohe CTC-Detektionsrate durch die kombinierte Anwendung des CellSearch®-Systems, des CellCollectors sowie des EPISPOT-Assays

Nach den erfolgreichen Etablierungsarbeiten der drei verschiedenen Assays wurden klinische Proben parallel auf das Vorhandensein von CTCs untersucht. In der Literatur sind über das CellSearch®-System bei hoch-risiko PCa Patienten bisher lediglich CTC-Positivitätsraten zwischen 5 % und 27 % beschrieben worden (Davis et al., 2008, Resel Folkersma et al., 2012, Thalgott et al., 2013, Thalgott et al., 2015, Loh et al., 2014). In dieser Arbeit konnte über die Kombination von drei verschiedenen CTC-Nachweisstrategien jedoch eine deutlich höhere CTC-Positivitätsrate aufgezeigt werden (Abbildung 3.6).

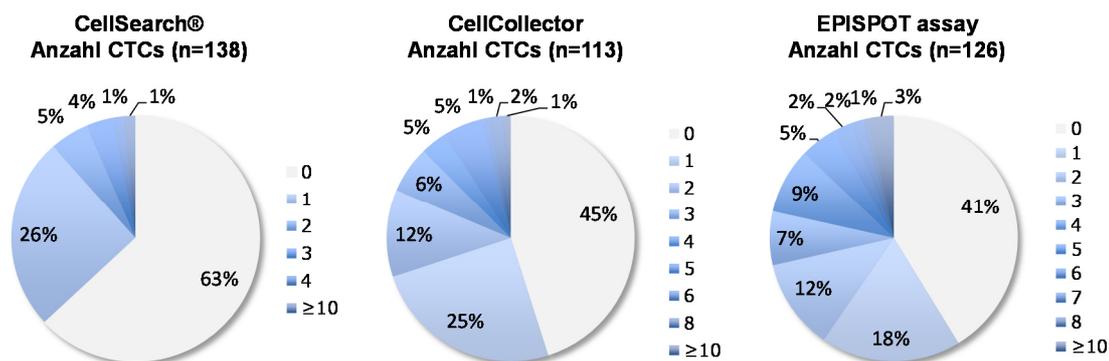


Abbildung 3.6 Häufigkeitsverteilung der detektierten CTCs nach Anwendung (i) des CellSearch®-Systems (ii) des CellCollectors oder (iii) des EPISPOT-Assays. Die analysierten Proben repräsentieren die Kombination von beiden Sammelzeitpunkten (einen Tag vor und drei Monate nach RP).

Betrachtet man beide Zeitpunkte (vor und drei Monate nach RP) kombiniert, wurden abhängig von der Methode ≥ 1 CTC bei 37 % - 59 % der Fälle detektiert (CellSearch®: 37% (51/138, Größenordnung 1-10, Median 1,8); CellCollector: 54,9% (62/113, Größenordnung 1-12, Median 2,4), und EPISPOT: 58,7% (74/126, Größenordnung 1-13, Median 3)). Die kumulative Positivitätsrate (mind. in einem der Assays Signale für ≥ 1 CTC) betrug 81,3 % (87/107) während lediglich bei 18,7 % der Patienten in allen drei Verfahren CTCs gleichzeitig detektiert werden konnten (20/107) (siehe Tabelle 3.3). Die Konkordanz zwischen allen drei Methoden betrug 37,4 %. Die Konkordanz zwischen jeweils zwei der Assays variierte zwischen 56 % - 60 % (siehe Abbildung 3.7).

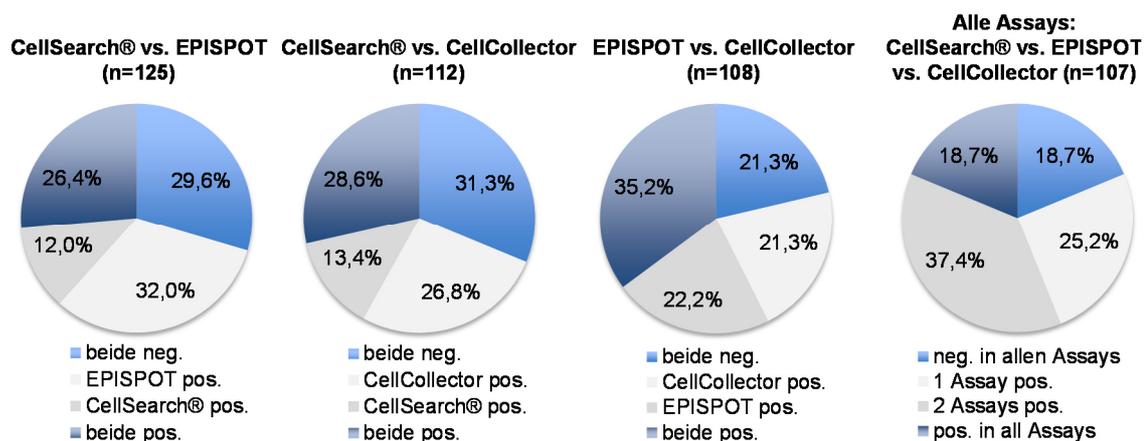


Abbildung 3.7 Konkordanz zwischen den unterschiedlichen CTC-Detektionsmethoden. Wenn in beiden oder allen Fällen die Testergebnisse übereinstimmen (beide/alle Gruppen positiv bzw. negativ) sind sie konkordant (blau), andernfalls sind sie nicht konkordant (grau).

Da bei metastasiertem PCa ein Grenzwert von ≥ 5 CTCs mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (de Bono et al., 2008), wurde dieser Grenzwert auch in dieser Studie als weiterer Parameter für die Auswertung der Daten eingesetzt. Bei einem Grenzwert von ≥ 5 CTCs sind gemessen über das CellSearch®-System 1,4 % (2/138) der Patienten positiv, durch den CellCollector wurden bei 8,8 % (10/113) der Patienten ≥ 5 CTCs detektiert und mittels EPISPOT-Assay lag die Positivitätsrate bei 12,7 % (16/126). Betrachtet man die kumulative CTC-Verteilung von allen drei Methoden waren bei 21,5 % der Patienten in mindestens einer der Assay ≥ 5 CTCs zu detektieren.

Tabelle 3.3 CTC-Positivitätsraten der verschiedenen Methoden bei einem Grenzwert von ≥ 1 CTC respektive ≥ 5 CTCs (vor und nach Operation kombiniert)

positiv für ≥ 1 CTCs	
51/138 CellSearch®	37 % (1-10 CTCs, median 1,8)
62/113 CellCollector	54,9 % (1-12 CTCs, median 2,4)
74/126 EPISPOT	58,7 % (1-18 CTCs, median 2)
20/107 in allen drei Methoden pos.	18,7 % (1-10 CTCs, median 1,5)
87/107 Kumulativ pos. (in mind. einer der Assays pos.)	81,3 % (1-18 CTCs, median 2)
positiv für ≥ 5 CTCs	
2/138 CellSearch®	1,4 %
10/113 CellCollector	8,8 %
16/126 EPISPOT	12,7 %
41/107 Kumulativ pos. (in mind. einer der Assays pos.)	21,5 %

3.1.2.5 Gepaarte-Analysen von CTC-Detektionsraten vor und nach radikaler Prostatektomie

Neben der Betrachtung der CTC-Positivitätsraten, war ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt zu untersuchen, ob sich die CTC-Inzidenzen vor und drei Monate nach der RP unterschieden. Dabei könnten CTCs als mögliche Surrogat-Marker für die Therapieüberwachung eingesetzt werden und dazu beitragen minimale Resterkrankungen MRD (*minimal residual disease*) zu erkennen. Aktuell werden CTCs in der metastasierten Situation in PCa bereits als zusätzlicher Marker für Therapieentscheidungen einbezogen (Scher et al., 2015, Lorente et al., 2016).

Für unsere Untersuchung wurden gepaarte Analysen von CTC-Ergebnissen der jeweiligen Patienten zu beiden Zeitpunkten durchgeführt. Die entsprechende CTC-Häufigkeitsverteilung ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

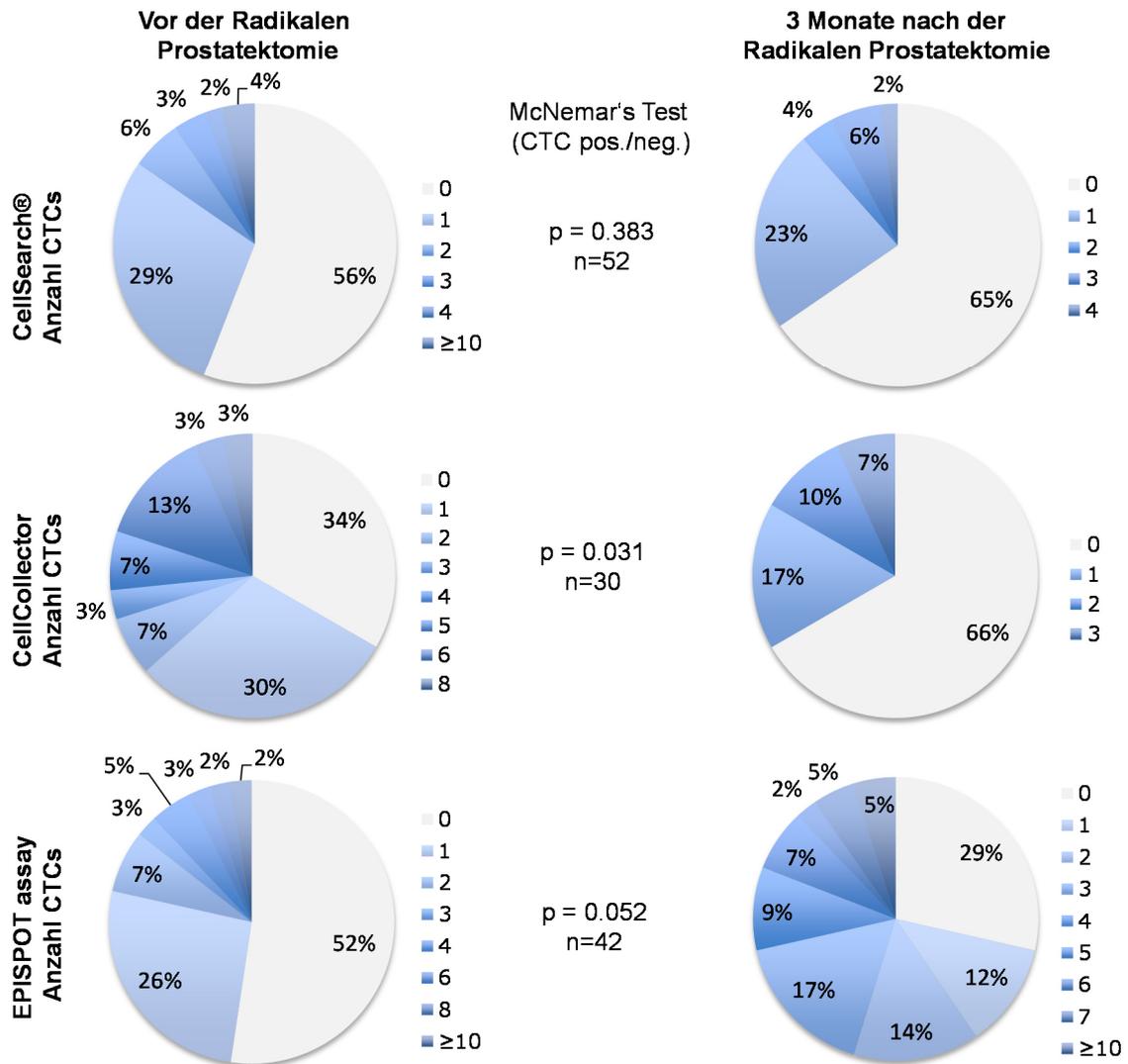


Abbildung 3.8 Gepaarte-Analysen von CTC-Detektionsraten nach Anwendung (i) des CellSearch®-Systems (ii) des CellCollectors oder (iii) des EPISPOT-Assays, einen Tag vor und drei Monate nach der Radikalen Prostatektomie. Für die statistischen Analysen wurde der McNemar's Test verwendet ($p < 0,05$) (pos. = positiv, neg. = negativ).

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CTC-Inzidenzen vor und nach der Therapie konnte lediglich unter Verwendung des CellCollectors aufgezeigt werden (McNemar's Test (pos./neg.) $p=0,031$). Die Positivitätsrate nahm nach RP von 66 % (Größenordnung 1-8 CTCs, Median 3,0) auf 34 % (Größenordnung 1-3 CTCs, Median 1,7) ab. Obwohl über das CellSearch®-System auch eine Abnahme der Positivitätsrate nach der Therapie beobachtet werden konnte, wurde kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.383$) (vor Therapie von 44 % auf 35 % nach Therapie). CTC-Inzidenzen vor und nach RP die mittels EPISPOT-Assay ermittelt wurden, zeigten hingegen einen Trend

zu einer erhöhten Anzahl an CTCs nach der RP ($p=0.052$, von 48 % auf 71 % pos.).

3.1.2.6 Korrelation von CTC-Inzidenzen zu klinischen Parametern

Um die klinische Relevanz unserer Ergebnisse einordnen zu können wurden diese zu etablierten klinisch-pathologischen Parametern der Patienten korreliert. Vor der RP konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem PSA-Wert bzw. dem klinischen Tumorstadium und den CTCs, die über den EPISPOT-Assay gemessen wurden, nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.4). Patienten, bei denen vor der Operation keine CTCs nachgewiesen werden konnten, zeigten im Vergleich zu CTC-positiven Patienten, einen statistisch signifikant niedrigeren PSA-Wert ($p<0.0001$) (CTC-neg.: Median 7,7 ng/ml (IQR: 5,0-15,3); CTC-pos.: Median 16,4 ng/ml, (IQR: 8,3-40,4)). Zusätzlich wiesen CTC-positive Patienten ein statistisch signifikant stärker fortgeschrittenes klinisches Tumorstadium auf ($p = 0.04$). Im Gegensatz dazu, zeigten CTC-Inzidenzen, die mittels CellSearch® oder CellCollector bestimmt wurden, keine Korrelationen zu diesen klinisch relevanten Parametern (PSA-CellSearch® $p=0.16$; PSA-CellCollector $p=0.62$; Tumor Stadium-CellSearch® $p=0.24$; Tumor Stadium-CellCollector $p=0.55$) (siehe Tabelle 3.4). Eine weitere statistisch signifikante Korrelation konnte zwischen dem Alter der Patienten und der CTC-Positivität detektiert werden. Über den CellCollector nachgewiesenen CTC-positive Patienten waren im Median jünger als die CTC-negativen Patienten ($p = 0,017$) (CTC-pos.: Median 65 (IQR: 44-75); CTC-neg.: Median 68 (IQR: 50-76)). Korrelationen zwischen CTC-Inzidenzen und Parametern direkt nach der RP konnten nicht beobachtet werden (siehe Tabelle 3.5). Jedoch ist durch die Kombination der drei Technologien ein Trend bezüglich der CTC-Positivität und dem pathologischen Gleason Score zu sehen ($p = 0,065$). CTC-positive Patienten (detektiert in mindestens einer der Assays) wiesen häufiger einen höheren Gleason Score und damit einen stärker differenzierten Tumor auf, als CTC-negative Patienten.

Ergebnisse

Tabelle 3.4: Klinische Patientenparameter sowie Korrelationen zu CTC-Anzahlen vor der radikalen Prostatektomie

Parameter	gesamt	CellSearch®			CellCollector			EPISPOT			Kombiniert		
		negativ	CTC-positiv	p-Wert	negativ	CTC-positiv	p-Wert	negativ	CTC-positiv	p-Wert	negativ	CTC-positiv	p-Wert
Patienten	86	53 (61,6)	33 (38,4)		31 (37,3)	52 (62,7)		40 (47,1)	45 (52,9)		17 (19,8)	69 (80,2)	
Alter, Median (IQR), Min-Max	67 (60; 71)	67 (60;71), 47-76	67 (60;72), 44-75	0,88	68 (64; 73), 50-76	65 (58; 70), 44-75	0,017	67 (60;71), 50-76	67 (59;71), 44-76	0,8	67 (61; 73), 50-76	67 (60; 71), 44-76	0,65
BMI, Median (IQR), Min-Max	26,3 (24,6; 28,6)	26,2 (24,3;28,2); 18,1-38,1	26,5 (24,7;30,6); 18,9-42,6	0,27	25,5 (23,9; 28,4), 22,2-38,1	26,5 (24,9; 28,4), 18,1-42,6	0,21	26,4 (24,7; 28,4), 22,5-42,6	26,2 (24,3; 29,0), 18,1-33,5	0,62	25,6 (23,9; 30,0), 22,4-38,1	26,4 (24,6; 28,4), 18,1-42,6	0,74
PSA Median (IQR), Min-Max	11,9 (6,3; 26,6)	14,6 (7,5; 27,5), 0,39-98,5	8,3 (5,1; 23,8), 0,14-146,4	0,16	10,5 (5,9; 26,2), 0,14-74,0	11,9 (6,4; 26,8), 1,6-146,4	0,62	7,7 (5,0; 15,3), 0,14-61,8	16,4 (8,3; 40,4), 3,3-146,4	<0,0001	7,8 (3,4; 15,6), 0,4-28,6	14,2 (6,5; 31,8), 0,2-146,4	0,03
Gleason Score													
3+3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,55	0 (0)	0 (0)	0,89	0 (0)	0 (0)	0,42	0 (0)	0 (0)	0,21
3+4	9 (10,5)	7 (13,2)	2 (6,1)		4 (12,9)	5 (9,6)		4 (10)	5 (11,1)		3 (17,6)	6 (8,7)	
4+3	5 (5,8)	3 (5,7)	2 (6,1)		2 (6,5)	3 (5,8)		1 (2,5)	4 (8,9)		0 (0)	5 (7,2)	
≥4+4	72 (83,7)	43 (81,1)	29 (87,9)		25 (80,6)	44 (84,6)		35 (87,5)	36 (80)		14 (82,4)	58 (84,1)	
Tumorstadium													
T1c	37 (43)	23 (43,4)	14 (42,4)	0,24	11 (35,5)	25 (48,1)	0,55	19 (47,5)	18 (40)	0,04	6 (35,3)	31 (44,9)	0,25
T2a	20 (23,3)	12 (22,6)	8 (24,2)		10 (32,3)	10 (19,2)		11 (27,5)	8 (17,8)		7 (41,2)	13 (18,8)	
T2b	20 (23,3)	15 (28,3)	5 (15,2)		7 (22,6)	11 (21,2)		7 (17,5)	13 (28,9)		3 (17,6)	17 (24,6)	
T2c	5 (5,8)	1 (1,9)	4 (12,1)		1 (3,2)	4 (7,7)		0 (0)	5 (11,1)		0 (0)	5 (7,2)	
T3a	4 (4,7)	2 (3,8)	2 (6,1)		2 (6,5)	2 (3,8)		3 (7,5)	1 (2,2)		1 (5,9)	3 (4,3)	
N-Status													
N0	84 (98,8)	52 (98,1)	33 (100)	0,32	30 (96,8)	52 (100)	0,16	39 (97,5)	45 (100)	0,22	16 (94,1)	69 (100)	0,07
N1	1 (1,2)	1 (1,9)	0 (0)		1 (3,2)	0 (0)		1 (2,5)	0 (0)		1 (5,9)	0 (0)	
M-Status													
Mx	54 (63,5)												
M0	31 (36,5)												
Hormontherapie													
ja	8 (9,4)												
nein	77 (90,6)												

Ergebnisse

Tabelle 3.5 Klinische Patientenparameter mit Korrelationen zu CTC-Anzahlen nach der radikalen Prostatektomie

Parameter	gesamt	CellSearch®			CellCollector			EPISPOT			Kombiniert		
		negativ	CTC positiv	p-Wert	negativ	CTC positiv	p-Wert	negativ	CTC positiv	p-Wert	negativ	CTC positiv	p-Wert
Radikale Prostatektomie	84 (97,7)												
1. PSA-Wert nach Operation, Median (IQR, n=27)	0,04 (0,01-0,16)	0,07 (0,03-0,68)	0,05 (0,01-0,32)	0,34	0,06 (0,03-0,13)	0,06 (0,01-0,79)	0,64	0,2 (0,04-0,46)	0,04 (0,01-0,16)	0,29			
Alter beim Zeitpunkt der Operation (Jahre), Median (IQR)	67 (60-71)												
Prostatavolumen (ml), Median (IQR), Min-Max	35 (25-50)	36 (25; 50), 8-120	32 (24; 48), 15-70	0,07	35 (20;45), 8-100	39 (25; 59), 11-120	0,12	35 (25; 51), 8-100	35 (25; 45), 11-120	0,55	35 (20; 50), 8-100	35 (25; 50); 11-120	0,73
Tumorzvolumen (ml), Median (IQR), Min-Max	11,5 (4,3-17,9)	12,0 (4,8; 19,5), 1,5-81,0	9,2 (3,3; 16,4), 0,4-47,7	0,21	12 (4,8; 17,5), 0,5-43,2	11,4 (3,9; 20,7), 0,4-81,0	0,72	12,9 (4,0; 19,1), 1,5-81,0	9,6 (4,1; 18,0), 0,4-58,6	0,78	12,4 (4,4; 17,6), 1,5-43,2	11,4 (4,2; 17,9), 0,4-81	0,95
pN-Status													
Nx	1 (1,2)	1 (1,9)	0 (0)	0,28	0 (0)	1 (2,3)	0,45	1 (3,3)	0 (0)	0,27	0 (0)	1 (1,5)	0,76
N0	50 (59,5)	28 (53,8)	22 (68,8)		25 (64,1)	25 (56,8)		19 (63,3)	29 (56,9)		9 (56,3)	41 (60,3)	
N1	33 (39,3)	23 (44,2)	10 (31,3)		14 (35,9)	18 (40,9)		10 (33,3)	22 (43,1)		7 (43,8)	26 (38,2)	
pT-Stadium													
pT2	22 (26,2)	12 (23,1)	10 (31,3)	0,52	9 (23,1)	12 (27,3)	0,89	7 (23,3)	15 (29,4)	0,3	4 (25)	18 (26,5)	0,54
pT3a	24 (28,6)	14 (26,9)	10 (31,3)		12 (30,8)	12 (27,3)		6 (20)	16 (31,4)		3 (18,8)	21 (30,9)	
≥pT3b	38 (45,2)	26 (50)	12 (37,5)		18 (46,2)	20 (45,5)		17 (56,7)	20 (39,2)		9 (56,3)	29 (42,6)	
pGleason Score													
3+3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,44	0 (0)	0 (0)	0,5	0 (0)	0 (0)	0,89	0 (0)	0 (0)	0,065
3+4	17 (20,2)	9 (17,3)	8 (25)		9 (23,1)	8 (18,2)		6 (20)	11 (21,6)		2 (12,5)	15 (22,1)	
4+3	36 (42,9)	25 (48,1)	11 (34,4)		18 (46,2)	17 (38,6)		14 (46,7)	21 (41,2)		11 (68,8)	25 (36,8)	
≥4+4	31 (36,9)	18 (34,6)	13 (40,6)		12 (30,8)	19 (43,2)		10 (33,3)	19 (37,3)		3 (18,8)	28 (41,2)	

Zusammenfassend konnte im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Kombination des CellSearch®-Systems, des CellCollectors sowie des EPISPOT-Assays erstmalig, im Vergleich zu bisher publizierten Daten (5 % - 27 %), deutlich höhere CTC-Inzidenzen bei nicht-metastasierten PCa Patienten nachgewiesen werden konnten (CellSearch®: 37%, CellCollector: 54,9%, EPISPOT: 58,7%). Die kumulative Positivitätsrate, bei der in mindestens einer der Methoden eine CTC nachgewiesen werden konnte, lag bei 81,3 %, was die Komplementarität unserer Methoden herausstellt. Darüber hinaus konnte bei einer gepaarten Analyse von CTC-Messungen, über den CellCollector, ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl der detektierten CTCs beobachtet werden ($p=0,031$), wobei die CTC-Positivitätsraten nach Entfernung der Prostata von 66 % auf 34 % abnahmen. Ergänzend dazu konnte erstmals eine statistisch signifikante Korrelation zwischen CTCs, die über den EPISPOT-Assay detektiert wurden, und dem PSA-Wert sowie dem klinischen Tumorstadium bei Hochrisiko-PCa-Patienten aufgezeigt werden.

3.2 Multiplex-RNA-Analysen von Einzelzellen

In der Krebsforschung besteht ein großes Interesse darin, isolierte CTCs mit Hilfe von Transkriptionsanalysen eingehend zu charakterisieren. Dabei könnten Multimarker-Transkriptomanalysen von einzelnen CTCs Informationen zur intra-individuellen Heterogenität von CTC-Subpopulationen aufzeigen und somit Rückschlüsse auf den Primärtumor oder Metastasen zulassen. RNA-Einzelzell-Analysen von CTCs bleiben jedoch bis heute eine große Herausforderung, da (i) eine CTC in einem Hintergrund von Millionen von Blutzellen detektiert und isoliert werden muss (ii) die Zelle in einem intakten Zustand vorliegen muss und (iii) sehr geringe Mengen von instabiler mRNA (10 pg) per Zelle sich nur schwer zu amplifizieren lassen.

3.2.1 Validierung von Einzelzell-RNA-Analysen

Für die molekulare Analyse von Einzelzellen wurden in einem ersten Vorversuch vier unterschiedliche kommerziell erhältliche Kits vergleichend getestet. (*NucleoSpin RNA II Kit*[®], (Macherey-Nagel); *Picopure RNA Isolation Kit*[®], (Lifetechnologies); *MessageBooster Kit*TM, (Epicentre); und *CelluLyser*TM *Micro and cDNA Synthesis Kit* (TATAA Biocenter)). Für den Vergleich wurden 1, 5, 10, und 50 Brustkrebs (BCa)-Zellen (MDA-468 oder SKBR3) direkt in Lysepuffer überführt, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurden die generierten cDNAs für eine qualitative PCR eingesetzt und *EpCAM*-, *EGFR*-, *HER2*-, *K19*- und β -Actin-Transkripte amplifiziert (siehe Abbildung 3.9). *EpCAM* und *K19*, als epitheliale Marker, sollten in beiden untersuchten Zelllinien transkribiert werden, wohingegen *EGFR* bzw. *HER2* nur spezifisch in Zellen der MDA-468- respektive SKBR3-Zelllinie zu erwarten waren (Kao et al., 2009).

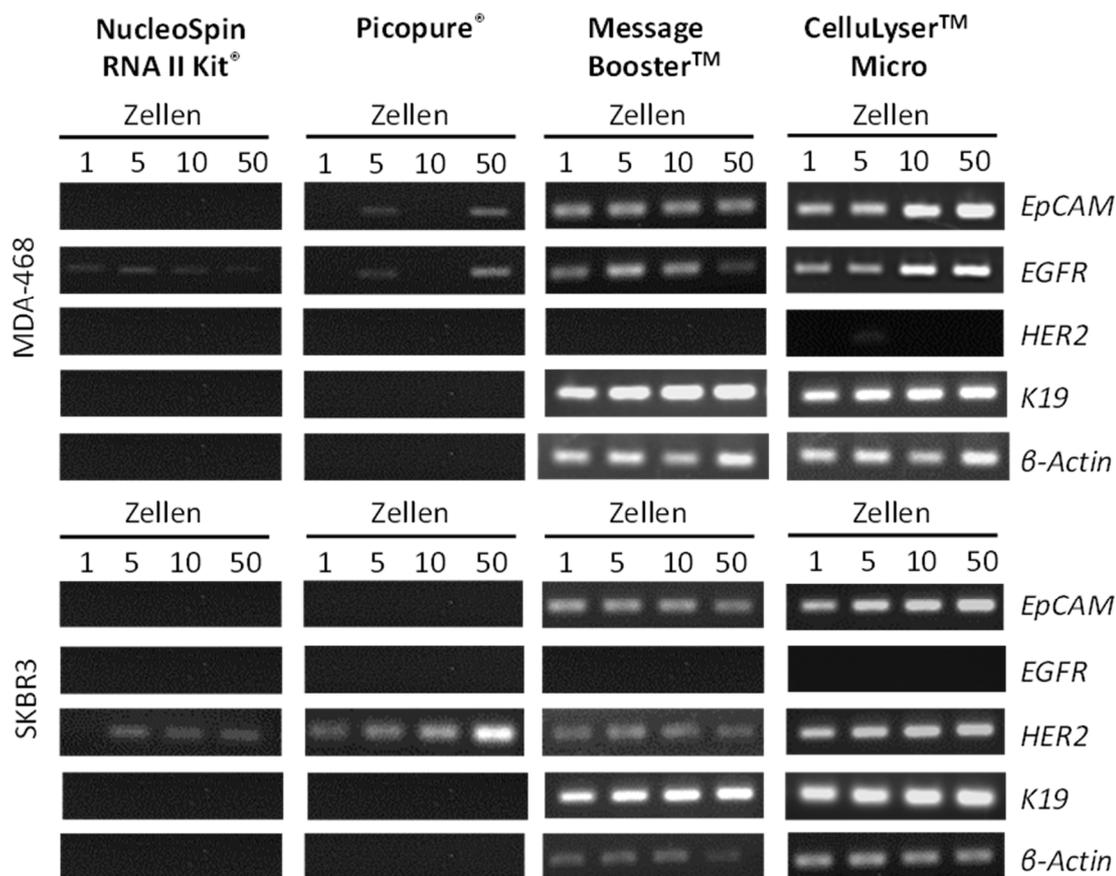


Abbildung 3.9 Qualitative PCR. 1, 5, 10 oder 50 Zellen der Linie MDA-468 oder SKBR3 wurden in Lysepuffer überführt und über das *NucleoSpin RNA II Kit*[®], das *Picopure RNA Isolation Kit*[®], das *MessageBooster Kit*TM oder das *CelluLyser*TM *Micro and cDNA Synthesis Kit* prozessiert und die RNA der Zellen in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Spezifische Transkripte für Tumorzellen (*EpCAM*, *EGFR*, *HER2*, und *K19*) sowie das Referenz-Gen *β-Actin* wurden mittels qualitativer PCR amplifiziert. Die PCR Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels GelStar unter UV-Licht visualisiert.

Nur unter Verwendung des *MessageBooster Kits*TM und des *CelluLyser*TM *Micro and cDNA Synthesis Kits* konnten konsistente und zu erwartende RNA-Profile bis hin zur Einzelzell-Ebene generiert werden. (MDA-468: *EpCAM*-positiv, *K19*-positiv, *EGFR*-positiv, *HER2*-negativ; SKBR3: *EpCAM*-positiv, *K19*-positiv, *EGFR*-negativ, *HER2*-positiv) (Kao et al., 2009). Folglich wurden nur diese Kits für Folgeanalysen auf Einzelzellebene weiter validiert.

Als nächster Schritt musste ein Färbeprotokoll etabliert werden, das eine Unterscheidung von CTCs aus klinischen Proben und Leukozyten ermöglicht. Darüber hinaus durften die Zellen nicht fixiert oder permeabilisiert werden, da sonst die instabile mRNA angegriffen oder abgebaut bzw. aus der Zelle austreten

könnte und für Folgeanalysen nicht mehr zugänglich wäre. Als Zielproteine für die Färbung wurden das Zelloberflächenmolekül EpCAM und pan-Keratine ausgewählt. Um die Zellen möglichst geringen Belastungen auszusetzen, wurde die Färbung in Suspension durchgeführt. Für die *in vitro*-Testung wurden in einem Vorversuch zunächst Tumorzellen aus der Zellkultur verwendet und in Blut von gesunden Spendern überführt. Die Tumorzellen konnten über das CellSearch®- oder Parsortix™-System angereichert und anschließend gegen EpCAM und/oder pan-Keratin gefärbt werden (siehe Kapitel 2.2.5.1.2). Abbildung 3.10 zeigt repräsentative Zellen der Zelllinie MDA-468, die über das CellSearch®- oder Parsortix™-System angereichert und gegen EpCAM und/oder pan-Keratin gefärbt wurden.

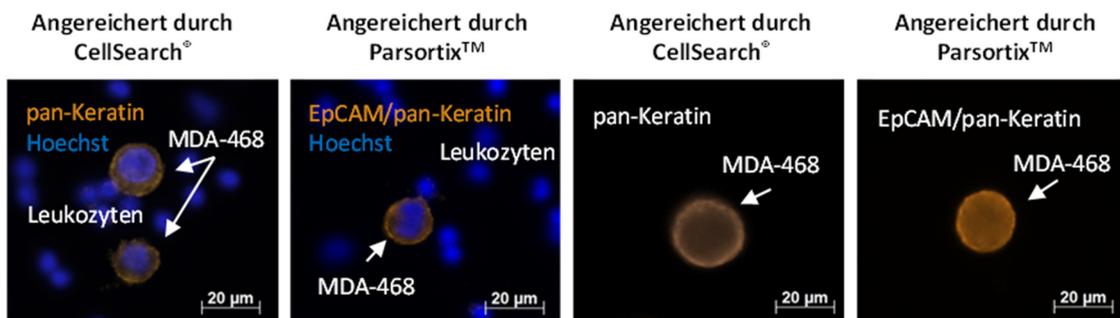


Abbildung 3.10 Spezifische EpCAM und/oder pan-Keratin Färbung von MDA-468-Zelllinienzellen. Die Zellen wurden vor der Färbung in Blut überführt und mittels CellSearch® oder Parsortix™ angereichert. Anschließend wurden die Zellen ohne Fixierung oder Permeabilisierung in Suspension gefärbt (Zeiss, Axiovision, 400 x Vergrößerung)

Abbildung 3.10 zeigt eine spezifische EpCAM / pan-Keratin Färbung von Zellen der MDA-468-Zelllinie. Die Leukozyten wiesen wie zu erwarten kein Signal auf.

Nach der erfolgreichen Etablierung des spezifischen Färbeprotokolls musste in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob sich das Transkriptionsprofil von ungefärbten bzw. gefärbten Tumorzellen beeinflusst lässt. Hierfür wurden Expressionsprofile von einzelnen ungefärbten und angefärbten Tumorzellen vergleichend analysiert. Zusätzlich wurden Expressionsprofile von einzelnen angefärbten Tumorzellen im Vergleich zu Leukozyten durchgeführt. Mit dem Ziel im weiteren Verlauf der Analysen das Transkriptionsprofil von CTCs aus BCa- und PCa-Patienten zu untersuchen, wurden für die Vorversuche Zelllinienzellen dieser beiden Entitäten ausgewählt. BCa-Zelllinien (MDA-468 und SKBR3; n = 3) oder PCa-Zelllinien (LNCaP und PC3; n = 3) wurden in 7,5 ml EDTA

Blut von gesunden Spendern (n = 2) überführt und über das CellSearch®- oder Parsortix™-System angereichert. Isolierte und angefärbte Einzelzellen sowie Leukozyten wurden mittels Mikromanipulation isoliert und die cDNA durch das *MessageBooster Kit™* oder das *CelluLyser™ Micro and cDNA Synthesis Kit* synthetisiert und wie in Abbildung 3.11 ((1) blaue Pfeile und (4) grüne Pfeile)) beschrieben, weiter prozessiert.

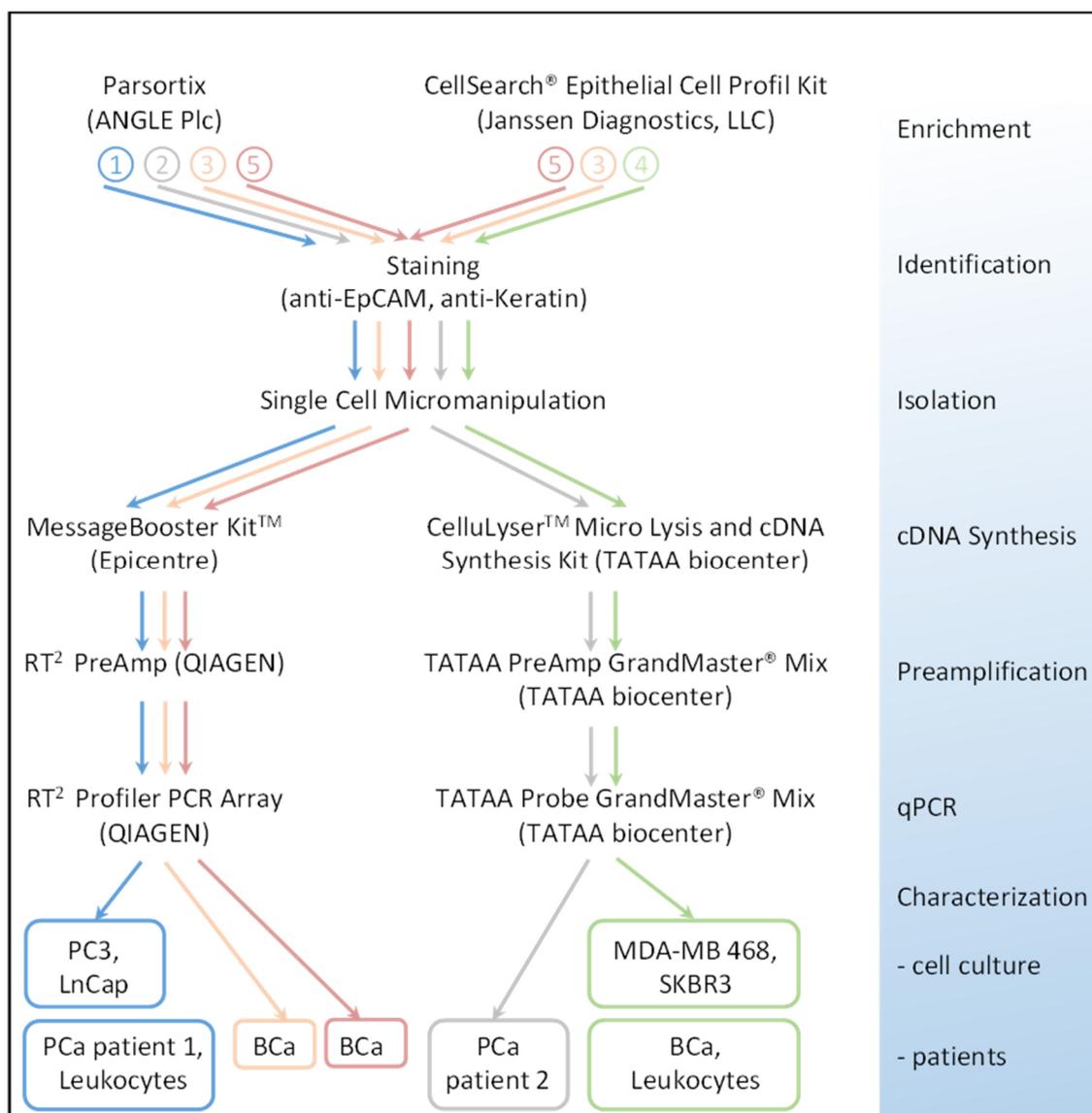


Abbildung 3.11 Methodischer Arbeitsablauf der Einzelzell-RNA-Analysen. Zelllinienzellen, die in Blut überführt wurden oder CTCs aus klinischen Proben wurden entweder über das *CellSearch® Epithelial Cell Profile Kit* (Janssen Diagnostics) oder das Parsortix™-System (ANGLE Plc) angereichert. Anschließend wurden Tumorzellen mittels EpCAM und/oder pan-Keratin Färbung identifiziert und mittels Mikromanipulation isoliert. Es folgte die Synthese der cDNA, die Preamplifikation spezifischer Gene sowie abschließend die qPCR. Die verschiedenen Nummern und Farben illustrieren unterschiedliche Methodenkombinationen.

Expressionsprofile einzelner BCa- (MDA-468 und SKBR3) und PCa-Zelllinien (PC3 und LNCaP) sowie die der Leukozyten sind als Dendrogramm und Heatmap in Abbildung 3.12 dargestellt.

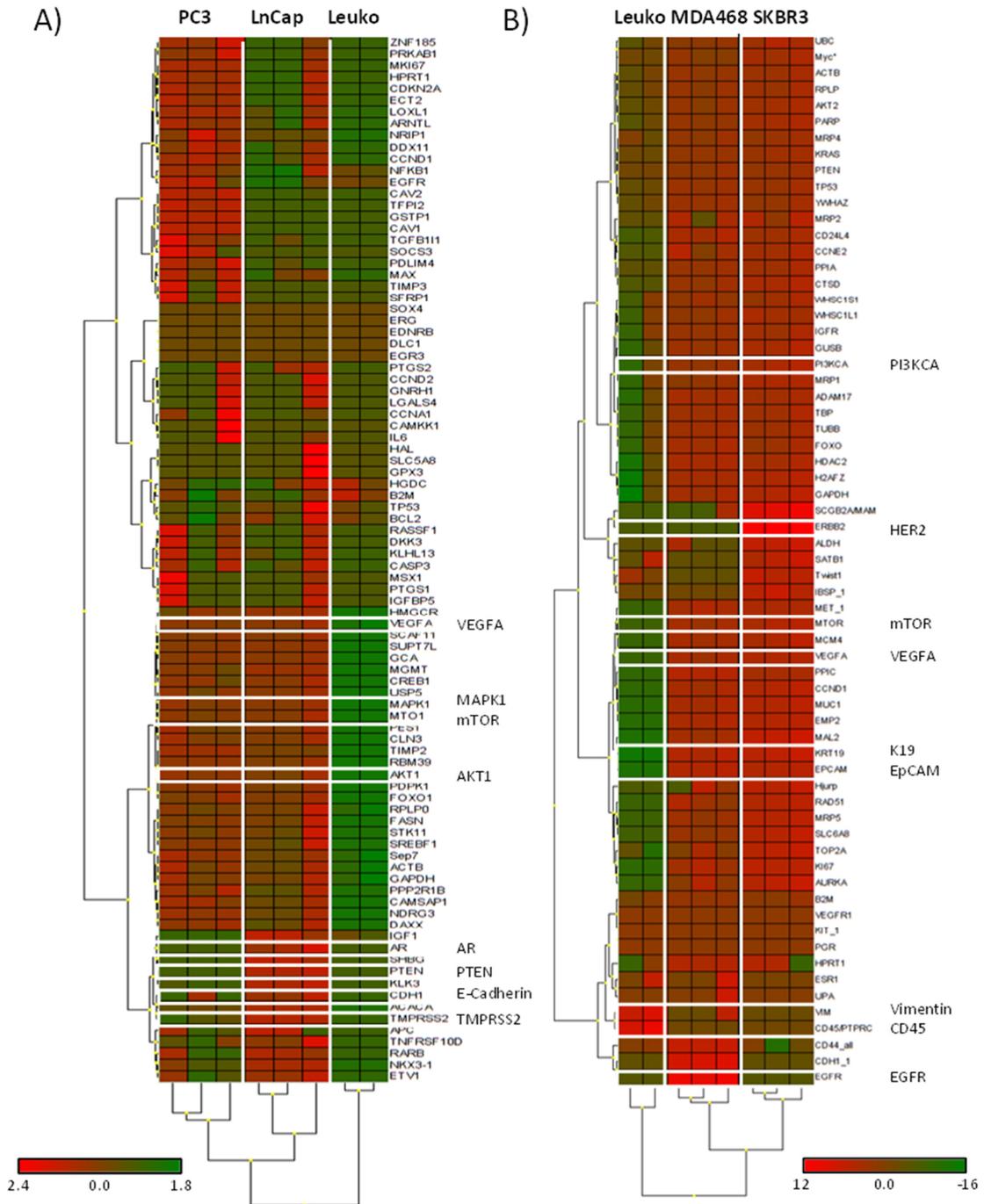


Abbildung 3.12 Einzelzell-RNA-Analysen von Zellkulturzellen sowie Leukozyten. Die Zellen wurden entweder über das CellSearch®- oder Parsortix™-System angereichert und wie in Abbildung 3.11 beschrieben prozessiert. A) Dendrogramm- und Heatmap-Analysen von PCa- und BCa-Zelllinien (LNCaP, PC3, MDA-468, and SKBR3 (n = 3 pro Zelllinie)) sowie einzelne Leukozyten von gesunden Spendern (n = 2). Die Daten sind auf den Mittelwert zentriert, die

durchschnittliche Expression entspricht 0. Rot oder grüne Felder repräsentieren eine Herauf- bzw. Herabregulation der Transkripte (siehe Skala), relativ zum Mittelwert des Pools.

Betrachtet man die Transkriptionsprofile der BCa- und PCa-Zelllinien, lässt sich anhand des Dendrogramms wie auch durch die Heatmap-Analyse eine deutliche Abgrenzung zu den Leukozyten erkennen (Abbildung 3.12 A-B). So wurden zu erwartenden epitheliale Marker wie *K19* und *EpCAM* ausschließlich in Tumorzellen nachgewiesen (van Leenders et al., 2001, Kao et al., 2009).

Gene, die in Prozesse des Zellwachstums, oder -Proliferation involviert sind, wie *PI3KCA*, *AKT1*, *mTOR* (*phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase-B/mammalian target of rapamycin PI3K/AKT/mTOR*-Signalweg) oder der damit eng verbundene *MAPK*-Signalweg (*mitogen-activated protein kinases*), wurden ebenfalls ausschließlich in den Tumorzelllinien transkribiert. Ein weiteres Gen, was in CTCs heraufreguliert vorlag, codierte den der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (*VEGFA*) (*vascular endothelial growth factor*), ein Molekül, das in die Vaskulo- und Angiogenese involviert ist und darüber hinaus als therapeutisches Target in der Krebstherapie eingesetzt wird (Welti et al., 2013). Der Leukozytenmarker CD45 sowie Vimentin wurden wiederum ausschließlich in Leukozyten transkribiert.

Neben den Unterschieden zwischen Tumorzelllinien und Leukozyten konnten anhand des Transkriptionsprofils Zelllinien-spezifische Charakteristika ebenfalls abgebildet werden. So zeigten LNCaP-Zellen zum Beispiel ein starkes Transkriptionssignal des *ARs* sowie der *Transmembran Protease Serin 2* (*TMPRSS2*) wohingegen Zellen der PC3-Linie keine Transkription dieser Gene aufwiesen (Sobel and Sadar, 2005). Weitere bereits beschriebene Charakteristika wie der Expressionsverlust von E-Cadherin der PC3-Zellen im Vergleich zu den E-Cadherin-positiven LNCap-Zellen, konnte ebenfalls abgebildet werden (Sobel and Sadar, 2005). Ein zusätzlicher Unterschied besteht in der Transkription des Tumorsuppressor-Gens *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*), der als negativer Regulator des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs fungiert (Pourmand et al., 2007). Für Zellen der PC3-Linie ist eine homozygote Deletion von Exon 3-9 des *PTEN*-Gens beschrieben (Vlietstra et al., 1998). In unseren Einzelzell-Analysen der PC3-Zellen kann ebenfalls kein Signal für die Transkription von PTEN beobachtet werden, wohingegen die LNCaP-Zellen *PTEN* stark transkribieren. Auch die Transkriptionsprofile der BCa-Zelllinien lassen sich getreu den

publizierten Daten nach abbilden. Zellen der SKBR3-Linie zeigten ein stark amplifiziertes Signal für *HER2*, wohingegen in MDA-468-Zellen keine Transkription detektiert werden konnte (Kao et al., 2009). Die Transkription von *EGFR* dagegen konnte nur in Zellen der MDA-468-Linie nachgewiesen werden (Kao et al., 2009). Eine detaillierte Auflistung der Genexpression (Cq-Werte) sind in Supplement Tabelle 8.1 und Supplement Tabelle 8.2 zu finden.

3.2.2 Multiplex-Transkriptom-Analysen von CTCs

Für die folgenden Analysen von CTCs aus Patienten konnten insgesamt 55 einzelne CTCs isoliert werden, von denen 39 für Folgeanalysen prozessiert werden konnten. Kriterien, welche die CTCs erfüllen mussten, um für die Multi-Marker-Analysen eingesetzt werden zu können, waren: eine intakte Morphologie (Durchlicht-Mikroskopie), Zelldurchmesser größer als 4 μm und positiv für EpCAM und/oder pan-Keratin (Abbildung 3.13 A). Neben diesen Kriterien haben wir als zusätzliche Qualitätskontrolle der CTCs die Transkription von *K19* integriert, welches auch in der Literatur standardmäßig als CTC-Marker eingesetzt wird (Stathopoulou et al., 2001, Stathopoulou et al., 2003, Daskalaki et al., 2009, Xenidis et al., 2013, Xenidis et al., 2009). Als Voraussetzung für die Durchführbarkeit der Multi-Marker-Analysen, musste in der qualitativen PCR ein ausreichend, starkes Signal des *K19*-Transkriptes gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.13 B).

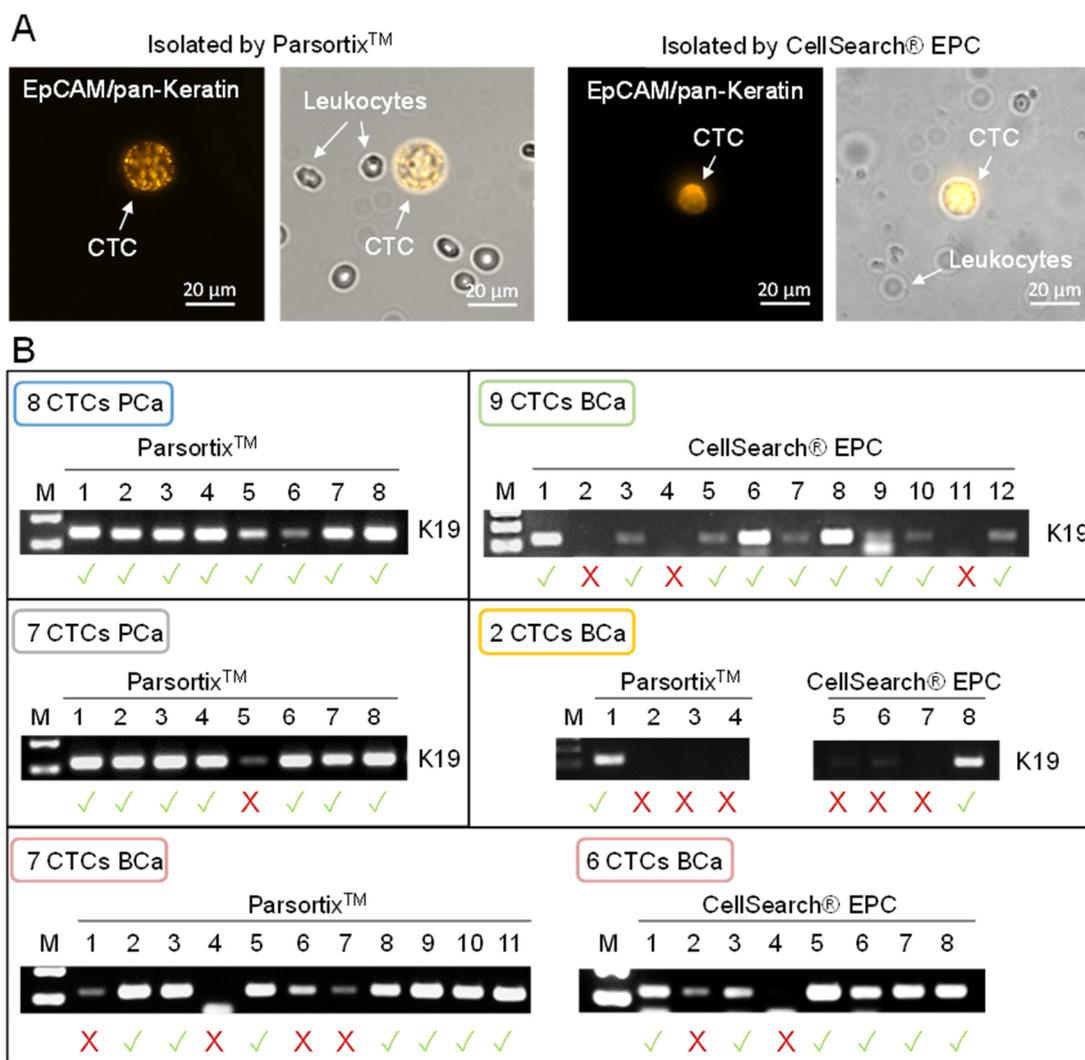


Abbildung 3.13 Qualitative PCR des *K19*-Transkriptes von CTCs. A) Mittels Parsortix™ angereicherte EpCAM/pan-Keratin positive CTCs. B) Über CellSearch® Epithelial Cell Profil (ECP) angereicherte pan-Keratin positive CTCs. C) *K19*-Expressionsprofil der CTCs nach Isolation mittels Mikromanipulation. CTCs, die ein intensives *K19*-Signal aufwiesen, konnten für folgende Multimarker-Analysen verwendet werden (markiert mit einem grünen Haken ✓).

Nachfolgend konnten die ersten Transkriptions-Profile von CTCs aus dem Blut einer Brustkrebspatientin, im Vergleich zu den Leukozyten-Profilen derselben Patientin, untersucht werden. Die detaillierte Abfolge der Analyseschritte ist in Abbildung 3.11 durch die Nummer (4) grüne Pfeile gekennzeichnet. Eingehende Analysen zeigten, dass sich die RNA-Transkriptions-Profile der CTCs deutlich von denen der Leukozyten unterscheiden ließen (vergleiche Abbildung 3.14 A-C). Dies konnte durch die Hauptkomponenten-Analysen (*principal component*

analysis (PCA)) besonders deutlich herausgestellt werden, wodurch anhand von Transkriptions-Profilen der CTCs sowie der Leukozyten eine klare Aufteilung in unterschiedliche Zelltypen möglich war (Abbildung 3.14 C). Epitheliale Marker wie *EpCAM*, *E-Cadherin (CDH1_1)*, das *Epitheliale Membranprotein-2 (EMP2)*, und *K19* wurden ausschließlich in CTCs transkribiert. *Mamaglobin-A (SCGB2A/MAM)*, was spezifisch im Brustgewebe exprimiert wird, konnte ebenfalls nur in CTCs nachgewiesen werden. Der Estrogenrezeptor (ER) spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung und malignen Progression von BCa (Hayashi et al., 2003). Dieser Marker wird in ca. 60 % - 70 % aller Brustkrebsfälle überexprimiert und kann als therapeutisches Target eingesetzt werden. Auch in unseren Einzelzellanalysen konnte ein starkes Signal des *ESR1*-Gens in acht von neun CTCs detektiert werden. Gene wie der Leukozytenmarker *CD45* und *Vimentin (VIM)* wurden überwiegend in Leukozyten nachgewiesen. Lediglich in zwei der analysierten CTCs (CTC 3 und CTC 8) konnten neben der Transkription von epithelialen Markern (*EpCAM* und *K19*) zusätzlich auch Signale für *CD45* und *VIM* nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 3.14 A-C).

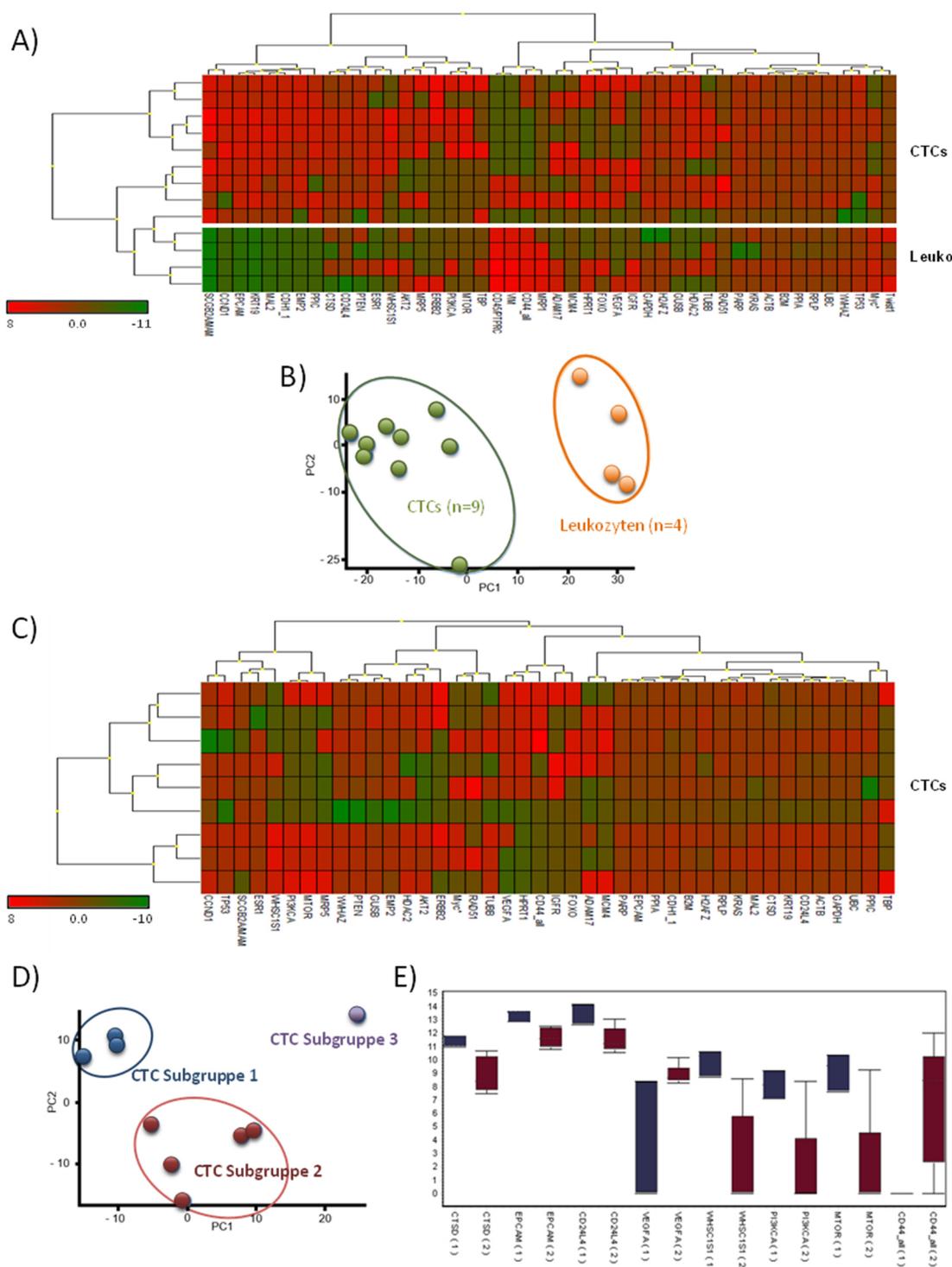


Abbildung 3.14 Molekulare Signatur von CTCs und Leukozyten einer BCa-Patientin. Gentranskriptionsprofile von CTCs (n = 9) und Leukozyten (n = 2), welche über das CellSearch®-System angereichert und mittels *CelluLyser™ Micro and cDNA Synthesis* Kit in Kombination mit dem *GrandPerformance Panel* analysiert wurden. A) Dendrogramm und Heatmap zeigen eine hierarchische Clusteranalyse von CTCs und Leukozyten. B) PCA gruppiert CTCs und Leukozyten in zwei Subgruppen. C) Dendrogramm und Heatmap der analysierten CTCs. D) PCA und hierarchische Clusteranalyse von CTC-Subgruppen. E) Boxplot-Analyse zeigt statistisch signifikante Transkriptionsunterschiede ausgewählter Gene zwischen den CTC-Subgruppen 1 und 2 (p < 0,05).

Durch die Transkriptionsanalysen einzelner CTCs konnte eine intraindividuelle Heterogenität von Zellen innerhalb einer Patientin dargestellt werden. Die PCA zeigte eine Gruppierung in zwei Cluster, was auf unterschiedliche Subtypen der CTCs hindeutete (Abbildung 3.14 D). CTC 9, die im Gegensatz zu den anderen Zellen eine sehr niedrige Transkriptionsintensitäten aufwies, wurde bei der PCA getrennt von den anderen CTCs abgebildet. Im Rahmen der Analysen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich ausgewählte Gene statistisch signifikant zwischen den beiden CTC-Subgruppen unterschieden ($p < 0,05$) (Abbildung 3.14 E). Dabei zeigten CTCs aus der ersten Subgruppe eine erhöhte Transkription von Genen, die in Prozesse der Zellteilung und -Proliferation involviert sind, wie *PIK3CA* und *mTOR* (Wu et al., 2009). Das Gen *Whsc1*, was die Histon-Methyltransferase NSD2 codiert, die eine wichtige Rolle in Prozessen der Zellproliferation, Tumorwachstum und bei Überlebens-mechanismen spielt (Yang et al., 2012), wird ebenfalls von CTCs der ersten Subgruppe stärker amplifiziert. Zellen der zweiten Subpopulation zeigten dagegen eine stärkere Transkription des Stammzellmarkers *CD44* sowie des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (*VEGFA*). Eine detaillierte Auflistung der Genexpression (Cq-Werte) sind in Supplement Tabelle 8.3 zu finden.

Zusätzlich konnten 13 weitere CTCs einer BCa-Patientin parallel über das ParsortixTM- (n = 7) oder das CellSearch®-System (n = 6) angereichert und prozessiert werden. Dabei wurden EMT-assoziierte Transkripte analysiert. Die genaue Abfolge der Methodenschritte ist in Abbildung 3.11 durch die Nummer (5) rote Pfeile gekennzeichnet.

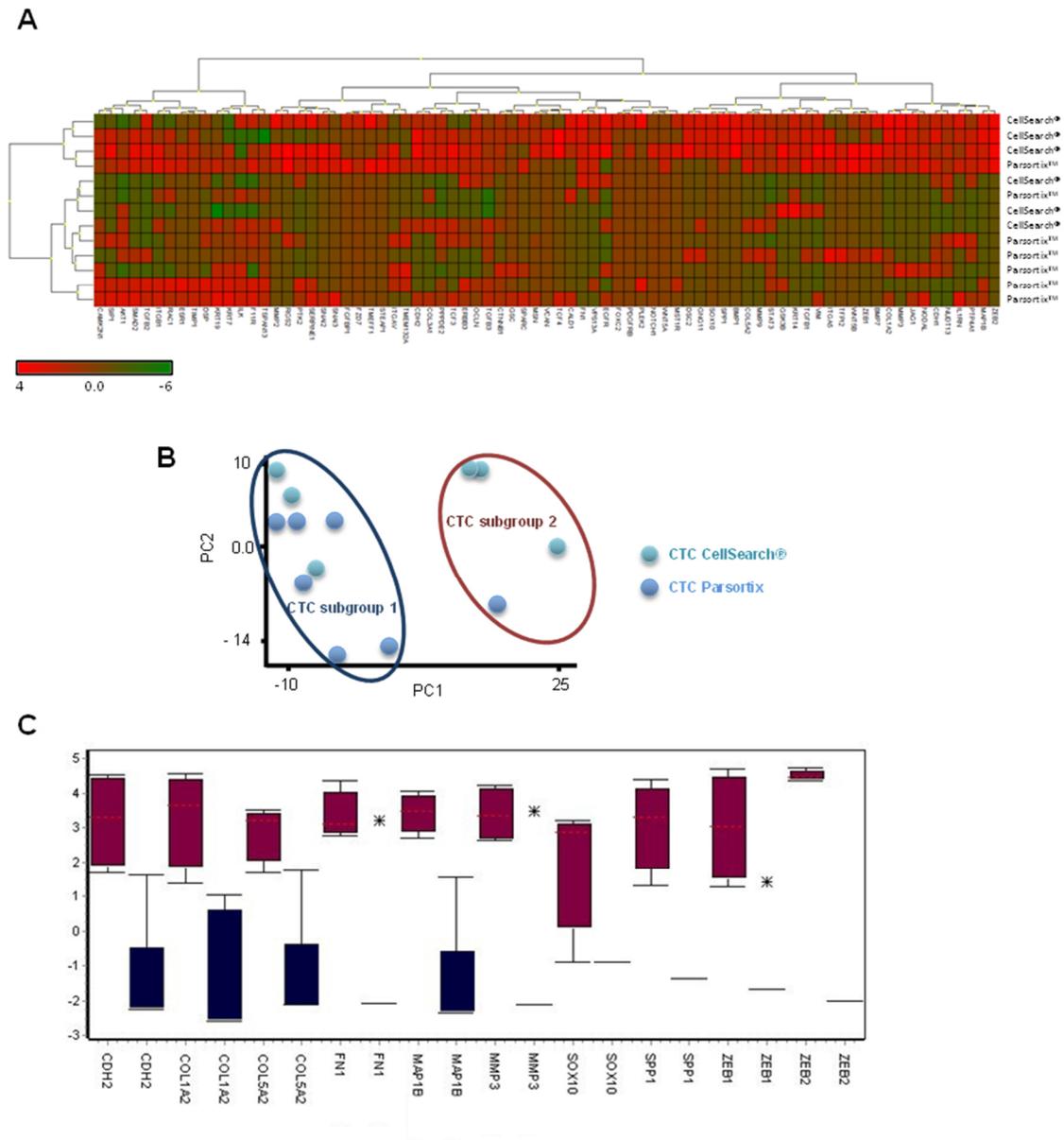


Abbildung 3.15 Molekulare Signatur von CTCs einer BCa-Patientin. Gentranskriptionsprofile von CTCs, die entweder über das Parsortix™-System (n = 7) isoliert oder über das CellSearch®-System (n = 6) angereichert und mittels *MessageBooster Kit™* in Kombination mit dem *RT² PreAmp and Profiler Human EMT PCR Array* analysiert wurden. A) Dendrogramm und Heatmap zeigen eine hierarchische Clusteranalyse von CTCs beider Anreicherungsverfahren. B) PCA gruppiert CTCs in zwei Subgruppen. C) Boxplot-Analyse zeigt statistisch signifikante Transkriptionsunterschiede ausgewählter Gene zwischen den CTC-Subgruppen 1 und 2 ($p < 0,05$).

Auch im Fall der zweiten BCa-Patientin ließen sich die einzelnen CTCs anhand ihres Transkriptionsprofils in zwei Subgruppen unterteilen (Abbildung 3.15 A-B), was auf eine intraindividuelle Heterogenität der CTCs hinweist. Unterschiedlich stark transkribierte Gene waren: *N-Cadherin* (*CDH2*), *Kollagene* (*COL1A2*,

COL5A2), *MAP1B*, *MMP3*, welche als prognostischer Marker für das Überleben in BCa-Patienten beschrieben ist (Mehner et al., 2015), ein mesenchymaler Regulator in epithelialen Brustzellen *SOX10* (Dravis et al., 2015), *Osteopontin* (*SSP1*), was im Zusammenhang mit Prozessen der Metastasierung beschrieben wird (Shevde et al., 2010) sowie die EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren *ZEB1* und *ZEB2*, die in die Suppression der E-Cadherin-Expression involviert sind (Brabletz and Brabletz, 2010, Gheldof et al., 2012). Die Transkription dieser EMT-assoziierten Marker war in der zweiten Subgruppe statistisch signifikant höher als in der ersten Subgruppe (vergleiche Abbildung 3.15 C). Eine detaillierte Auflistung der Genexpression (C_q-Werte) sind in **Supplement Tabelle 8.4** sowie **Supplement Tabelle 8.5** zu finden.

CTCs, die aus Blutproben eines PCa-Patienten (PCa 1) isoliert und entsprechend der Abbildung 3.11 durch die Nummer (1) blaue Pfeile prozessiert wurden, zeigten ebenfalls eine intraindividuelle Heterogenität der CTCs innerhalb eines Patienten auf. Die PCA, welche anhand der Transkriptionsprofile erstellt wurde, unterteilte die CTCs in zwei Subgruppen (vergleiche Abbildung 3.16 A-B). Gene, die für die Berechnung der PCA berücksichtigt wurden, mussten in mind. drei der CTCs detektiert werden.

als therapeutisches Target fungiert (Anantharaman and Friedlander, 2015), der Transkriptionsfaktor *NFB* (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), welcher in die Regulation des AR involviert ist und somit in das PCa-Wachstum (Zhang et al., 2009), sowie der Stimulator der Vaskulo- sowie Angiogenese *VEGFA*. Ein weiterer Faktor, der in die androgen-assoziierte Regulationen involviert ist, war das *Homöobox-Gen NKX3-1*, dessen Transkription ebenfalls in der zweiten Subgruppe reguliert vorlag. Das durch Androgene regulierte Enzym *Transmembran-Transferase Serin-2 (TMPRSS2)*, was in Wachstumsprozesse des PCa involviert ist (Bowen et al., 2015), wies im Vergleich zur Subgruppe 1 eine höhere Transkriptionsintensität auf, als in der zweiten Gruppe (siehe Abbildung 3.16 C). Eine Auflistung der detaillierten Transkriptionsprofile (Cq-Werte) sind in **Supplement Tabelle 8.6** zu finden.

Aus dem Blut eines weiteren PCa Patienten (PCa 2) konnten zusätzlich sieben CTCs für Multimarker-Transkriptionsanalysen prozessiert werden. Die detaillierte Abfolge der Analyseschritte ist in Abbildung 3.11 mit der Nummer (2) graue Pfeile gekennzeichnet. Durch die Transkriptionsanalysen der einzelnen CTCs konnte wiederum eine intraindividuelle Heterogenität der CTCs eines Patienten beobachtet werden. Die PCA, welche anhand der Transkriptionsprofile erstellt wurde, unterteilte die CTCs in zwei Subgruppen (vergleiche Abbildung 3.17 A-B).

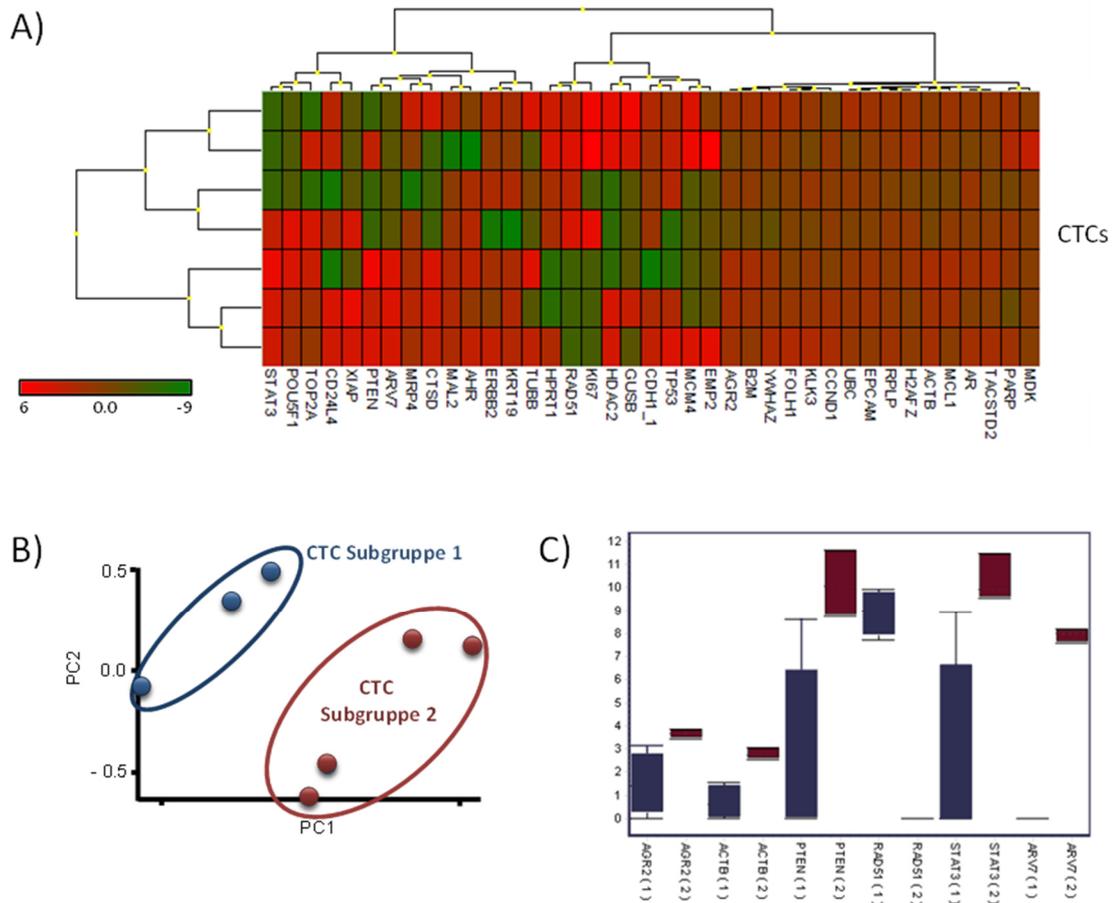


Abbildung 3.17 Molekulare Signatur von CTCs des zweiten PCa-Patienten (PCa 2). Gentranskriptionsprofile von CTCs (n = 7), welche über das Parsortix™-System angereichert und mittels *CelluLyser™ Micro and cDNA Synthesis Kit* in Kombination mit dem *GrandPerformance Panel* analysiert wurden. A) Dendrogramm und Heatmap zeigen eine hierarchische Clusteranalyse. B) PCA unterteilt CTCs in zwei Subgruppen. C) Boxplot-Analyse zeigt statistisch signifikante Transkriptionsunterschiede ausgewählter Gene zwischen den CTC-Subgruppen 1 und 2 (p<0,05).

CTCs der ersten Subgruppe wiesen eine erhöhte Transkription der *Rekombinase RAD51* auf. Eine Überexpression dieses Proteins wurde bereits in Zusammenhang mit aggressivem PCa beschrieben (Mitra et al., 2009). CTCs der zweiten Subgruppe zeigten dagegen ein stärkeres Signal der Gentranskripte des therapeutisch-relevanten Markers *Adrogenrezeptor-Slice-Variante-7 (AR-V7)* oder des Transkriptionsfaktors *STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)*, welcher in anti-apoptotische und proliferative Prozesse involviert ist (Antonarakis et al., 2014, Bosch-Barrera and Menendez, 2015). CTCs derselben Subgruppe wiesen ebenfalls eine erhöhte Transkription der *Phosphatase PTEN* auf. PTEN, als Tumorsuppressor, spielt eine wichtige Rolle in der

Tumorzellproliferation sowie in der Bildung von Metastasen (Pourmand et al., 2007). Eine Auflistung der detaillierten Transkriptionsprofile (C_q-Werte) sind in **Supplement Tabelle 8.7** zu finden.

3.2.3 Aktivierung von Inflammation und Immunität in CTC-Signalwegen

In der Onkologie wird viel über die Kommunikation zwischen Tumorzellen und zellulären Mediatoren von Entzündungsreaktionen sowie Immunität diskutiert (Schreiber et al., 2011, Noman et al., 2014). Das Immunsystem als körpereigene Abwehr gegen entartete Zellen ist einer der ersten Mechanismen um Krebszellen zu bekämpfen. Die Kommunikation zwischen Immunzellen und Krebszellen aufzuschlüsseln, könnte dazu beitragen neue Therapieansätze zu schaffen und bestehende weiterzuentwickeln. Der Einsatz von z.B. Immuncheck-Point-Inhibitoren wie PD-1 / PDL-1 findet in einer Vielzahl von Phase I – III Studien Anwendung (Hirano et al., 2005, Shih et al., 2014) und zeigt vielversprechende Ergebnisse in der Krebstherapie. In dieser Arbeit sollten ebenfalls die Transkription von Genen, die in immun-assoziierte Prozesse involviert sind, analysiert werden. Um potentielle Unterschiede von CTC-Subtypen vergleichend analysieren zu können, wurden CTCs sowohl über das EpCAM-abhängige CellSearch®- als auch über das Marker-unabhängige Parsortix™-System angereichert. Die detaillierte Abfolge der dafür benötigten Analyseschritte ist in **Abbildung 3.11** mit der Nummer (3) orange Pfeile gekennzeichnet. Es konnte für beide Anreicherungswege jeweils eine CTC derselben Patientin für RNA-Transkriptionsanalysen isoliert und prozessiert werden. Der C_q-Wert der untersuchten Gene beider CTCs ist in **Abbildung 3.18** paarweise dargestellt.

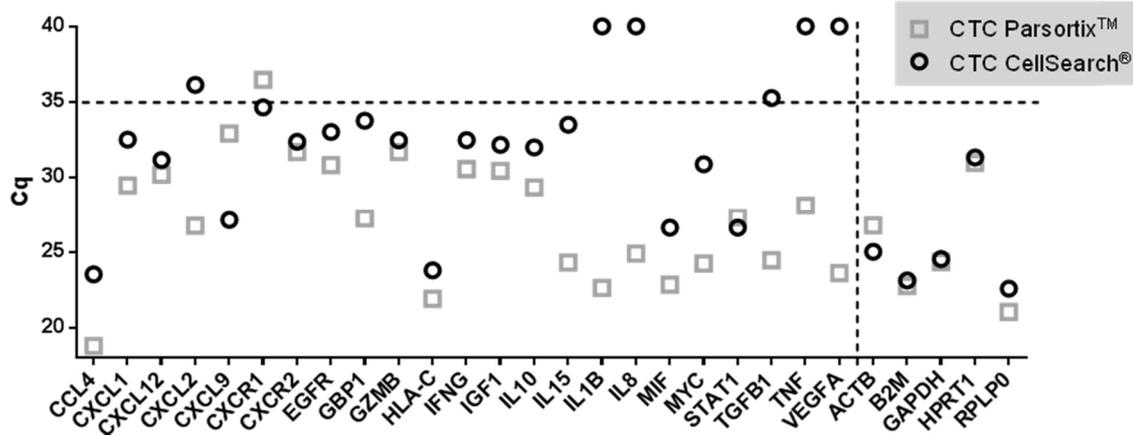


Abbildung 3.18 Vergleichende RNA-Analyse von zwei CTCs derselben Patientin, angereichert mittels CellSearch® oder Parsortix™. Die Zellen wurden mittels *MessageBooster Kit™* und der Kombination aus *RT^P PreAmp* und *Profiler Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk PCR Array* analysiert. Der Cq-Wert für jedes Gen ist separat abgebildet. Fehlende Cq-Werte wurden durch den Wert 37 ersetzt.

Durch die vergleichende Anwendung zweier unterschiedlicher Anreicherungstechnologien konnte sichergestellt werden, dass sich die Qualität der Referenzgentranskription (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*) der CTCs zwischen den Methoden nicht unterschieden hat (durchschnittlicher Cq-Wert nach Anreicherung über CellSearch®: 25.31 vs. Cq-Wert nach Anreicherung über Parsortix™: 25.16). Dieses Ergebnis zeigt die Zuverlässigkeit von beiden Anreicherungsstrategien auf. Im Gegensatz zu den Referenzgenen wurden allerdings manche in die Kommunikation von Immun- und Krebszellen involvierte Gene wie *CCL4*, *CXCL2*, *CXCL9*, *IL15*, *IL1B*, oder *IL8*, in EpCAM-abhängig und -unabhängig angereicherten CTCs unterschiedlich stark transkribiert (vergleiche Abbildung 3.18). Das Chemokin C-C-Motiv-Ligand 4 (*CCL4*) unterstützt zum Beispiel, durch eine Interaktion mit dem C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (*CCR5*), die Bildung von Knochenmarks-Metastasen (Mukaida et al., 2015). Dieses Gen wurde in Marker-unabhängig angereicherten CTCs deutlich stärker transkribiert, als in CTCs, die EpCAM-basiert isoliert wurden. Chemokine und Interleukine, wie *CXCL2*, *CXCL8* (*IL8*), *IL15*, *IL1B* zeigten ebenfalls eine signifikant höhere Transkription in Marker-unabhängig isolierten CTCs. Für *IL15*, ist bekannt, dass es bei einer erhöhten Transkription in Kolorektal-Karzinomen (CRC) eine wichtige Rolle in Zell-Wachstum, -Invasion und Bildung von Metastasen übernimmt (Kuniyasu et al., 2001). Das Chemokin *CXCL9* dagegen wurde in CTCs, die EpCAM-basiert angereichert wurden, stärker

transkribiert als in CTCs, die Marker-unabhängig isoliert wurden. Für das Kolorektalkarzinom ist beschrieben, dass die Expression von CXCL9 mit Tumordifferenzierung, -invasion und Metastasenbildung assoziiert ist (Wu et al., 2016). Auch in Melanoma-Zellen konnten bei einer erhöhten Expression von CXCL9 ähnliche Effekte, die eine Invasion von Tumorzellen begünstigen, beobachtet werden (Amatschek et al., 2011). Eine Auflistung der detaillierten Transkriptionsprofile (Cq-Werte) sind in **Supplement Tabelle 8.8** zu finden.

Zusammenfassend konnten wir im zweiten Teilabschnitt dieser Arbeit einen verlässlichen Arbeitsablauf etablieren, der es uns ermöglicht, Multimarker-Transkriptionsprofile von einzelnen CTCs, die EpCAM-abhängig oder Marker-unabhängig angereichert wurden, zu analysieren. Es ließen sich eindeutige Transkriptionssignaturen von CTCs im Gegensatz zu Leukozyten abbilden, wodurch diese leicht voneinander unterschieden werden konnten. Zwei der isolierten CTCs zeigten neben der Transkription von epithelialen Markern (*EpCAM* und *K19*) ebenfalls positive Signale des Leukozytenmarkers *CD45* sowie des mesenchymalen Markers *Vimentin*. Darüber hinaus können wir durch die Einzelzellanalysen wertvolle Informationen über die Heterogenität von CTCs innerhalb eines Patienten abbilden und untersuchen. CTC-Subgruppen ließen sich durch eine differentielle Transkription von Genen, die in EMT-assoziierte Prozesse (z.B. *VIM*, *JAG1*, *CDH2*, *MMPs*, *SOX10*, *SSP1* oder *ZEB1/ZEB2*), DNA-Reparatur (*RAD51*), in Mechanismen der Resistenzentwicklungen spezifischer Therapien (z.B. *AR*, *ARV7*, *HER2*, *EGFR*) oder in Signalwege der Zellteilung (z.B. *PIK3CA*, *AKT1*, *mTOR*, *MAPK*) involviert sind, eingehend charakterisieren. Darüber hinaus konnten in einigen CTC-Subgruppen die Transkription von Krebsstammzell-assoziierten Genen (z.B. *CD24* und *CD44*) oder Gene, die in die Kommunikation zwischen Tumor- und Immunzellen (z.B. *CCL4*, *CXCL2*, *CXCL9*, *IL15*, *IL1B*, oder *IL8*) involviert sind, nachgewiesen werden.

3.3 Etablierung einer CTC-Zelllinie aus dem peripheren Blut einer Brustkrebspatientin

Mit der zunehmenden Anwendung von Target-spezifischen Krebstherapien und der häufig auftretenden Resistenzentwicklung, werden Patienten-spezifische *in vitro* und *in vivo* Tumormodelle, die zur Verbesserung der personalisierten Krebstherapie beitragen könnten, dringend benötigt. Dabei können funktionale Untersuchungen von CTC-abgeleiteten Zelllinien oder Mausmodellen neue Zusammenhänge in Prozessen der Krebsprogression und Metastasierung aufzeigen. Biologische Eigenschaften von metastasierenden Zellen könnten eingehend charakterisiert sowie die Metastasen-initiiierenden Zellen identifiziert werden (Baccelli et al., 2013). Darüber hinaus könnten durch die Testung von Medikamenten neue therapeutische Targets identifiziert werden, die zu einer verbesserten Behandlungsstrategie führen könnten (Hodgkinson et al., 2014, Yu et al., 2014). Durch die geringe Anzahl an CTCs in peripherem Blut sowie der geringe Anteil an proliferierenden Zellen, bleibt eine Langzeitkultivierung jedoch eine große Herausforderung. Weltweit konnte bisher nur in sehr wenigen Studien eine Langzeitkultivierung von CTCs oder CTC-abgeleitete Xenografts etabliert werden. Zhang et al. waren dazu in der Lage CTCs aus dem Blut von 3 BCa-Patientinnen, für bis zu 28 Tage zu kultivieren, bis sie in die Seneszenz oder Apoptose eintraten (Zhang et al., 2013). Yu et al. konnten hingegen eine Kultivierung von 5 CTC-Zelllinien aus dem Blut von BCa-Patienten bis hin zu 6 Monaten erreichen (Yu et al., 2014). Aktuell sind keine weiteren Daten zu proliferierenden CTC-Zelllinien von BCa Patientinnen bekannt, was die Schwierigkeit CTCs für einen längeren Zeitraum zu kultivieren hervorhebt.

3.3.1 *Ex vivo* Kultivierung von CTCs aus Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom

Da in der Literatur beschriebene Versuche für die Etablierung einer CTC-Zelllinie oder eines CTC-abgeleiteten Xenografts nur dann zum Erfolg führten, wenn die Patienten in 7,5 ml Blut über hunderte CTCs aufwiesen (Zhang et al., 2013, Hodgkinson et al., 2014, Baccelli et al., 2013), wurden für folgende Versuche ebenfalls nur Patientenblut mit > 100 CTCs in 7,5 ml verwendet. Für die Langzeitkultivierung einer möglichen CTC-Zelllinie wurde, in einem Zeitraum von Januar 2014 bis heute, peripheres Blut von metastasierten BCa-Patientinnen mit

Hilfe des CellSearch®-Systems analysiert (n = 50). In dem genannten Zeitraum konnten insgesamt bei neun von 50 Patienten > 100 CTCs nachgewiesen werden, woraufhin das Blut für eine Langzeitkultivierung von CTCs wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben prozessiert wurde.

Lediglich bei einer der neun Patientinnen, konnten Zellen isoliert werden, die erfolgreich in Kultur gewachsen sind. Das Blut derselben Patientin wurde an zwei weiteren Zeitpunkten des Therapieverlaufs isoliert (s. Abbildung 3.19), es konnte jedoch keine erneute Proliferation der isolierten Zellen beobachtet werden. Für die Kultivierung wurde ein Medium, welches bereits für die Kultivierung von DTCs aus dem Knochenmark eingesetzt wurde, mit zwei weiteren Zusätzen verwendet (Putz et al., 1999) (siehe Tabelle 2.5).

Bis heute war eine Langzeitkultivierung von der zurzeit einzigen bekannten proliferierenden BCa-CTC-Zelllinie (CTC-ITB-01) möglich (>24 Monate).

3.3.2 Klinisch-pathologische Charakteristika der Brustkrebspatientin, aus dessen Blut die CTC-ITB-01-Zelllinie isoliert werden konnte

Die klinischen Charakteristika sowie Behandlungsformen der Patientin, aus dessen Blut die CTCs kultiviert werden konnten, wurden uns zur Verfügung gestellt. Die Erstdiagnose eines primär lymphatisch und ossär (knochenmarksinfiltriert) metastasierten, bilateralen Mammakarzinoms (ER+/PR+/HER2-) wurde im Mai 2012 gestellt. Dabei handelte es sich um zwei unterschiedliche Karzinome, ein invasiv-lobuläres Karzinom der linken Brust sowie ein invasiv-duktales Karzinom der rechten Brust. Neu auftretende Fernmetastasen (Leber, Milz, Vagina) wurden im September 2014 vor dem Zeitpunkt der Blutentnahme für die Langzeitkultivierung entdeckt. Klinisch-pathologische Parameter sowie Behandlung der Patientin sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Der Behandlungsverlauf sowie die Zeitpunkte der Blutentnahme sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

Tabelle 3.6 Diagnose und klinisch-pathologische Charakteristika

Erstdiagnose Mai 2012

Primär lymphatisch und ossär (knochenmarksinfiltriert) metastasiertes, bilaterales Mammakarzinom

Ergebnisse

Mamma links	Mamma rechts
Gut differenziertes, invasiv-lobuläres Karzinom cT2, cN1	Gut differenziertes, invasiv-duktales Karzinom cT4, cN1
HER2-Status: negativ	HER2-Status: negativ
n/a	E-Cadherin: deutliche Membranfärbung
Estrogenrezeptor: in über 80 % der Tumorzellkerne mäßiggradig exprimiert (IRS 8)	Estrogenrezeptor: in über 80 % der Tumorzellkerne stark exprimiert (IRS 12)
Progesteronrezeptor: in über 80 % der Tumorzellkerne stark exprimiert (IRS 12)	Progesteronrezeptor: in über 80 % der Tumorzellkerne stark exprimiert (IRS 12)
Ki-67-Labeling-Index: 5 %	Ki-67-Labeling-Index: 5 %

Metastasen September 2014

**Hepatische Metastasen und Milzmetastasierung,
stark dispergierend wachsendes Adenokarzinom in der Vagina**

Adenokarzinom in der Vagina:

HER2-Status: negativ

Estrogenrezeptor:

in ca. 60 % der Tumorzellkerne stark exprimiert (IRS 9)

Progesteronrezeptor:

in ca. 70 % der Tumorzellkerne stark exprimiert (IRS 9)

Beide Primärtumore sowie die Adenokarzinom-Metastase in der Vagina wiesen dieselben Charakteristika auf. Analysen von Stanzbiopsien der drei Gewebe zeigten alle eine starke Expression des Estrogen- und Progesteronrezeptors. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zeigten in allen Fällen keine Amplifikation des HER2-Gens.

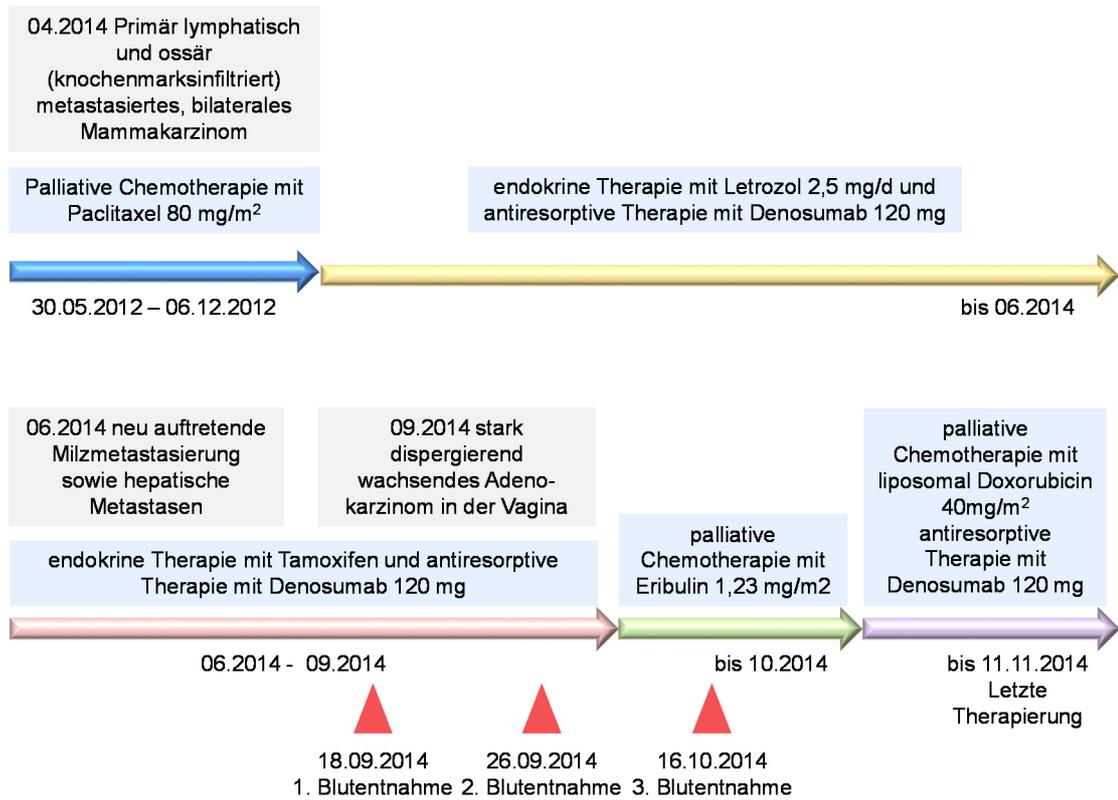


Abbildung 3.19 Diagnose und detaillierter Therapieverlauf der BCa-Patientin. Die Zeitpunkte der Blutentnahme sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

3.3.3 Charakterisierung der CTC-ITB-01-Zelllinie

3.3.3.1 Zellmorphologie und Wachstum

Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie wiesen einen heterogenen Phänotyp auf. Unter den von uns gewählten Kulturbedingungen wuchsen ca. 50 % der Zellen adhärent, wohingegen sich die anderen 50 % in Sphären vermehrten. Abbildung 3.20 stellt repräsentative Bilder von adhärennten sowie in Sphären wachsenden Tumorzellen dar.

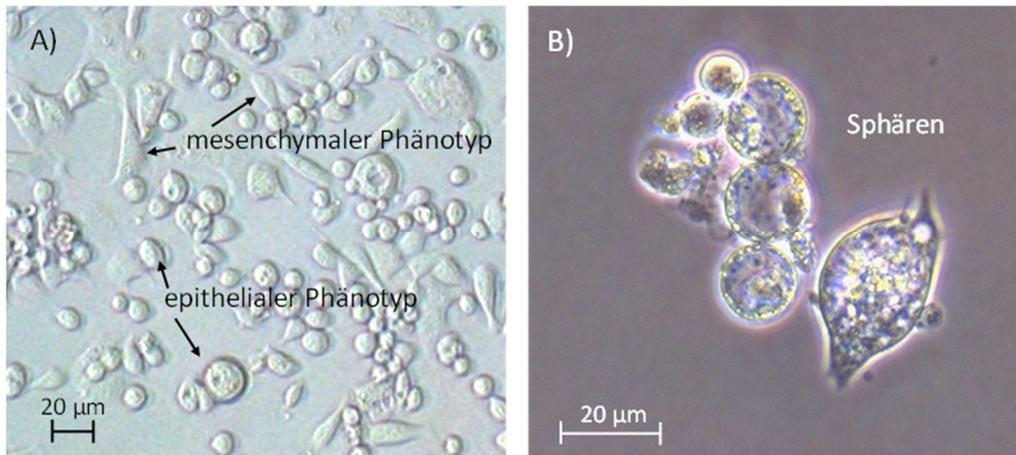


Abbildung 3.20 Morphologie und Wachstumsformen der CTC-ITB-01-Zelllinie. A) Adhärentes Wachstum von morphologisch eher epithelialen oder eher mesenchymalen Zellen. B) In Sphären wachsende Zellen (Zeiss, Axiovision, 200 x und 400 x Vergrößerung).

Beide Wachstumsformen wiesen eine ausgeprägte Variabilität hinsichtlich der Zellgröße auf. Der Durchmesser der Tumorzellen variierte zwischen 8 μm und 30 μm . Darüber hinaus konnten die adhärent wachsenden Zellen morphologisch in einen eher epithelialen (runde Zellen) oder eher mesenchymalen (spindelförmige Zellen) Phänotyp unterteilt werden. In den ersten 6 Monaten betrug die Verdoppelungszeit 24 h. Alle zwei Tage benötigten die Zellen frisches Medium, was auf eine übermäßig starke Proliferation hindeutete. In späteren Passagen > 30 stagnierte das Wachstum und die Verdopplungszeit verlangsamte sich bis hin zu ein bis zwei Wochen. Zellen früherer Passagen (4-7) wurden eingefroren (vergleiche Kapitel 2.2.1.2) und in Flüssigstickstoff (-196 °C) gelagert. Nach dem erneuten Auftauen zeigten ebenfalls die frühen Passagen eine verlangsamte Proliferation mit einer Verdopplungszeit von 4-7 Tagen.

Um sicherzustellen, dass die Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie unter optimalen Kulturbedingungen wuchsen, wurde ihre Proliferation nach Zugabe von drei weiteren Medien untersucht. Dazu wurde dieselbe Zellzahl in 4 Wells ausgesät und über drei Wochen mit dem ursprünglichen sowie drei zusätzlichen Medien kultiviert. Das Ergebnis des Proliferationsverhaltens der Zellen ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

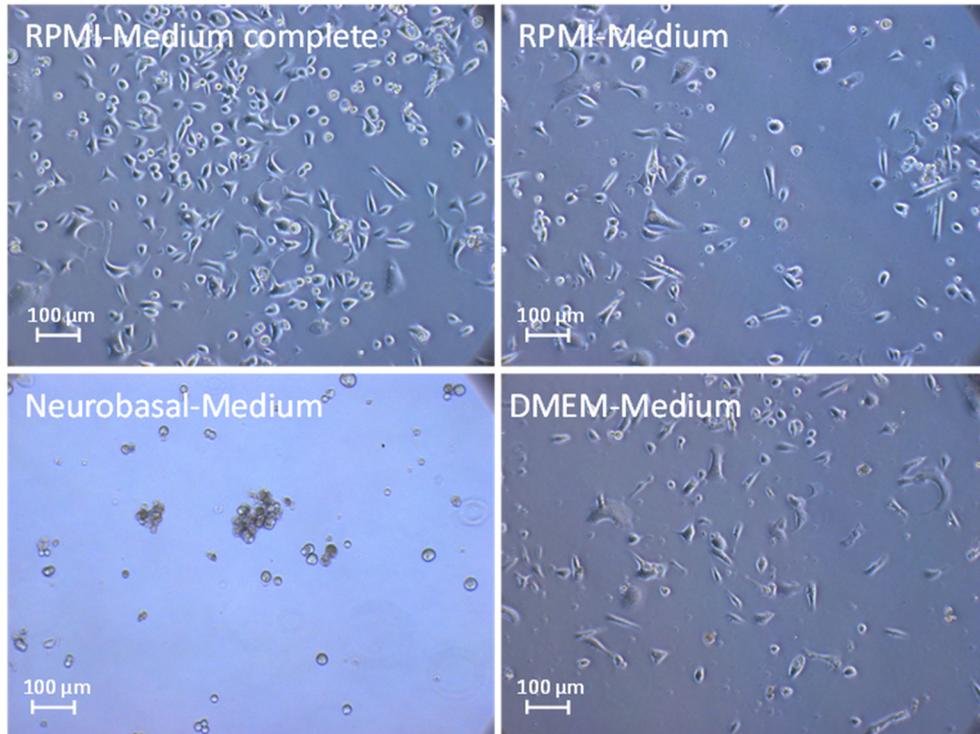


Abbildung 3.21 Proliferation von Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie in vier unterschiedlichen Medien. Es wurden jeweils 10 000 Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und entweder mit RPMI-Medium complete, RPMI-Medium, Neuro Basal-Medium oder DMEM-Medium über drei Wochen kultiviert (Zeiss, Axiovision, 100 x Vergrößerung).

Nach einer dreiwöchigen Kultivierung in unterschiedlichen Medien, wiesen die Zellen, die im ursprünglichen RPMI-Medium complete kultiviert wurden, die größte Zelldichte auf. Zellen die in RPMI- und DMEM-Medium kultiviert wurden, zeigten hingegen ein verlangsamtes Wachstum und eine geringere Zelldichte. Ein besonderer Fall trat nach Zugabe des Neurobasal-Mediums auf, was häufig für die Kultivierung von in Sphären wachsenden neuronalen Tumorzellen eingesetzt wird. Nach Zugabe des Mediums lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturschale ab und lagen nur noch in Sphären vor. Die Proliferation nahm im Vergleich zu den Zellen, die in RPMI-Medium complete kultiviert wurden, ebenfalls ab. Folglich wurde die CTC-ITB-01-Zelllinie weiterhin in RPMI-Medium complete kultiviert.

3.3.3.2 CellSearch®-Analyse

In einem weiteren Ansatz sollte die Zelllinie mit Hilfe des CellSearch®-Systems untersucht werden. Als EpCAM-abhängige Anreicherungsverfahren konnte das System erste Aufschlüsse über die epithelialen Eigenschaften (EpCAM- und pan-Keratin-Expression) der CTC-ITB-01-Zelllinie liefern. Für diesen Versuch wurden 100 Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie in 7,5 ml Blut eines gesunden Spenders überführt und durch das CellSearch®-System prozessiert. Als bildlicher Vergleich wurden die Ergebnisse des CellSearch®-Laufs herangezogen, der damals zum selben Zeitpunkt durchgeführt wurde, als die Langzeitkultivierung der Linie aus dem Blut dieser Patientin startete.

A) > 50 000 CTCs in 7,5ml Blut der Patientin

B) 97% (97/100) in Blut eines gesunden Spenders überführte Zellen der CTC-ITB-01 Linie wurden detektiert → sehr starke EpCAM Expression

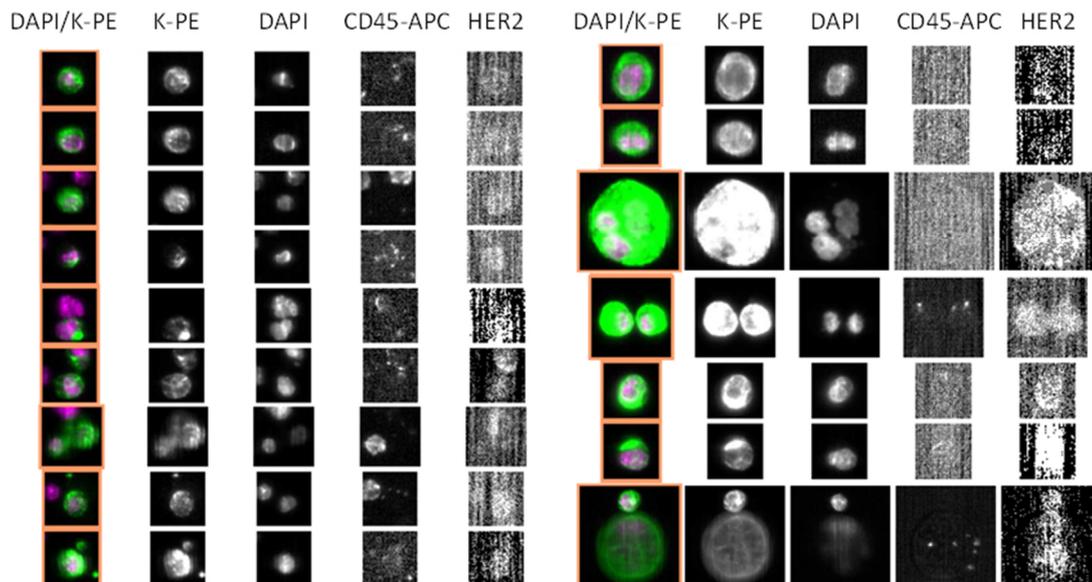


Abbildung 3.22 CellSearch®-Analysen des Patientenbluts, aus dem die CTC-ITB-01-Zelllinie generiert werden konnte, sowie Zellen dieser Linie überführt in Blut eines gesunden Spenders. A) Repräsentative Auswahl von pan-Keratin-positiven Zellen der über 50 000 detektierten CTCs in 7,5 ml Blut der Patientin. B) Repräsentative Auswahl von Bildern der 97 von 100 detektierten Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie in 7,5 ml Blut eines gesunden Spenders.

Von den in Blut überführten Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie konnten insgesamt 97 % der Zellen (97/100) über das CellSearch®-System detektiert werden, was eine starke EpCAM- sowie pan-Keratin-Expression aufzeigt. Auffällig ist wiederum die bereits zuvor beschriebene Heterogenität der Zelllinie. Einige Zellen entsprachen phänotypisch den abgebildeten CTCs der Patientin, wohingegen

andere die 6-fache Größe dieser CTCs erreichten. Innerhalb dieser großen Zellen konnten mehrere Zellkerne nachgewiesen werden (siehe DAPI Signal in Abbildung 3.22 B).

Ein Karyogramm von Zellen der CTC-Zelllinie wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Homologe Rekombination von PD Dr. Kerstin Borgmann am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf erstellt. Dabei wiesen die Zellen durchschnittlich eine erhöhte Anzahl an Chromosomen auf (\bar{O} 74 Chromosomen) (Abbildung 3.233).

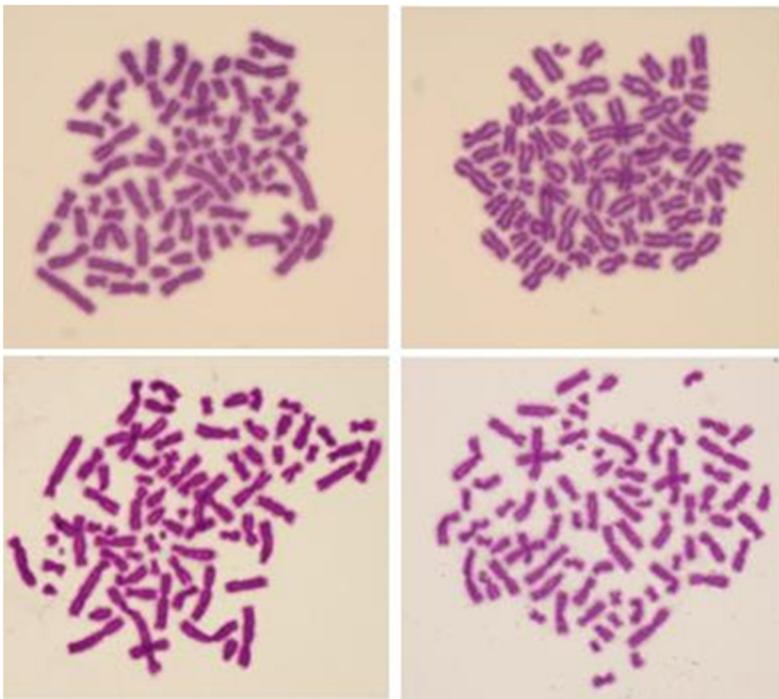


Abbildung 3.23 Karyogramm von Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie. Repräsentative Darstellung von Chromosomensätzen der CTC-Zelllinie mit durchschnittlich 74 Chromosomen pro Zelle (74, 74, 74, 76).

3.3.3.3 Transkriptom-Analysen der CTC-ITB-01-Zelllinie

Die ersten untersuchten Merkmale wie die EpCAM- und pan-Keratin-Expression, charakterisierten die CTC-ITB-01-Zelllinie als einen epithelialen Phänotyp. Durch anschließende Transkriptionsanalysen sollten ausgewählte Gene der CTC-Zelllinie mit der Gentranskription einer epithelialen BCa-Zelllinie (MDA-468) sowie einer mesenchymalen BCa-Zelllinie (MDA-231) mit Hilfe einer quantitativen PCR vergleichend analysiert werden (siehe Abbildung 3.24). In einem zusätzlichen Vorversuch wurden die Gentranskripte von Zellen der CTC-Zelllinie, die adhärent wuchsen im Vergleich zu sich in Sphären vermehrenden

Zellen untersucht. Die Expressionsanalysen ergaben keine Unterschiede (Daten nicht abgebildet). Für den Vergleich mit den unterscheidlichen BCa-Zelllinien wurden Gene epithelialer Marker wie *E-Cadherin (CDH1)* und verschiedene *Keratine (K7, K14, K19)* sowie mesenchymale oder in EMT-assoziierte Prozesse involvierte Marker wie *N-Cadherin (CDH2)*, *EGFR*, *VIM*, *JAG1* und *NOTCH1* (Shao et al., 2015) untersucht. Weitere Gene von Interesse waren *AKT1* sowie *HER3* als Mitglieder von Signalwegen, die bei Amplifikation in Tumorwachstum und Zellproliferation resultieren können (Perez-Nadales and Lloyd, 2004). Da der Primärtumor sowie die Metastase der Patientin, aus dessen Blut die CTC-Zelllinie etabliert werden konnte, positiv für den Estrogenrezeptor waren, wurde das Gen für den Rezeptor *ESR1* ebenfalls in der Zelllinie untersucht. In Prozesse der Krebsinvasion und Metastasierung involvierte Adhäsionsmoleküle wie *Fibronektin (FN1)* und verschiedene Integrine (*ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*) sowie beteiligte Matrix-Metalloproteinasen (MMP2, MMP3, MMP9) (Fernandez-Garcia et al., 2014) wurden zusätzlich untersucht.

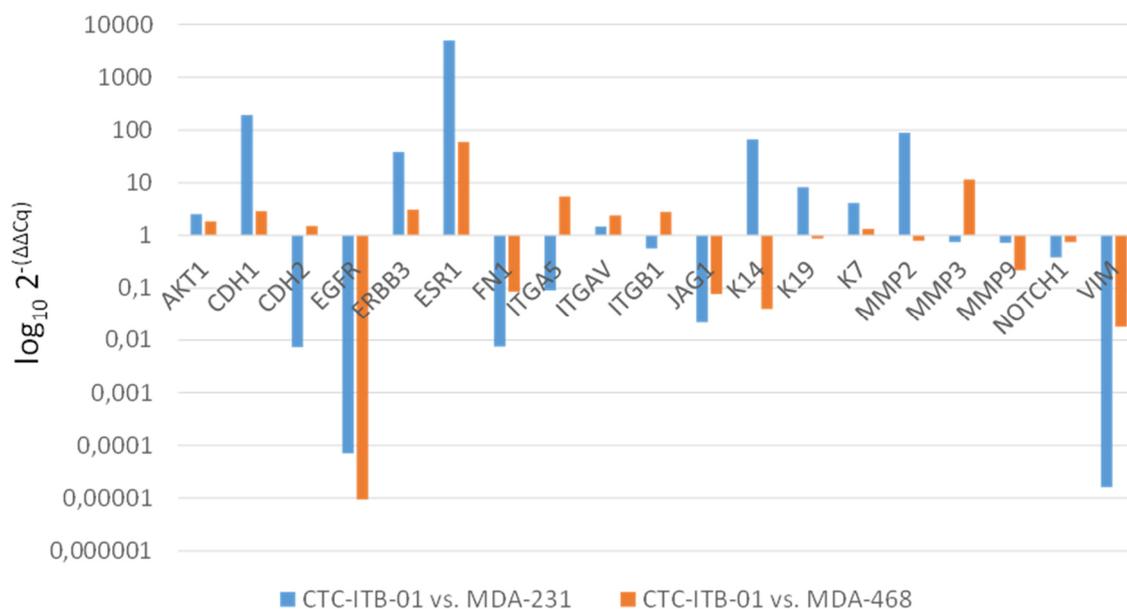


Abbildung 3.24 Vergleichende Transkriptionsanalysen von Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie im Gegensatz zu BCa-Zelllinien (MDA-231 und MDA-468). Die RNA-Expression der verschiedenen Gene wurde mittels quantitativen PCR bestimmt. Die logarithmisch aufgetragenen $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ -Werte geben die auf das Referenzgen (*-Actin*) normierte Expression der Gene der CTC-Zelllinie im Vergleich zu denen der MDA-231 (blau) oder MDA-468 (orange) Zelllinien an. Lag der $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ -Wert bei 1 entsprach die Gentranskription der CTC-ITB-01-Zelllinie, der der jeweiligen BCa-Zelllinie. Bei einem Wert > 1 zeigte die CTC-ITB-01-Zelllinie eine erhöhte Gentranskription im

Vergleich zu den BCa-Zelllinien, bei einem niedrigeren Wert als 1, war die Gentranskription geringer.

Betrachtet man die Transkriptionsprofile ausgewählter Gene der CTC-ITB-01-Zelllinie deuten diese auf einen epithelialen Phänotyp hin. Die logarithmisch aufgetragenen $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$ -Werte geben die auf das Referenzgen (*-Actin*) normierte Transkription der Gene der CTC-Zelllinie im Vergleich zu denen der MDA-231 oder MDA-468-Zelllinien an. Lag der $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$ -Wert bei 1 entsprach die Gentranskription der CTC-ITB-01-Zelllinie, der Transkription der jeweiligen BCa-Zelllinie. Bei einem Wert > 1 zeigte die CTC-ITB-01-Zelllinie eine erhöhte Gentranskription im Vergleich zu den BCa-Zelllinien, bei einem niedrigeren Wert als 1, war die Gentranskription geringer. Der epitheliale Marker *E-Cadherin* wurde in der CTC-ITB-01-Zelllinie stärker transkribiert als in beiden BCa-Zelllinien. Im Vergleich zu Zellen der mesenchymalen MDA-231-Zelllinie, wiesen Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie eine stärkere Transkription der Keratine (*K14*, *K19* und *K7*) auf. Im Vergleich zu den epithelialen MDA-468-Zellen, zeigten Zellen der CTC-Zelllinie eine ähnlich hohe Transkription von *K19* und *K7*, jedoch ein deutlich niedrigeres Signal für *K14*. Mesenchymale oder in Prozesse von EMT involvierte Marker wie *CDH2*, *EGFR*, *VIM*, *JAG1* und *NOTCH1* wurden dagegen in Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie nicht transkribiert. Mitglieder von in Tumorprogression involvierten Signalwegen (PIK3CA) wie *HER3* und *Akt1* (Wu et al., 2009), wurden in der CTC-Zelllinie wiederum stark transkribiert. Interessanterweise zeigten Zellen der CTC-Zelllinie, den histologischen Befunden des Primärtumors sowie der Metastase entsprechend (vergleiche Tabelle 3.6), ebenfalls eine starke Expression des *ESR1*. Zelladhäsions-Moleküle wie *FNI* wurden geringer oder *Integrine* in einer ähnlichen Intensität wie bei den BCa-Zelllinien transkribiert. *ITGA5*, dessen Expression bei BCa mit Tumorwachstum und Tumorangiogenese assoziiert ist (Bianchi-Smiraglia et al., 2013), wurde bei der CTC-Zelllinie sogar stärker als bei der MDA-468-Zelllinie transkribiert, jedoch geringer als bei der MDA-231-Zelllinie. Betrachtet man die Transkriptionsprofile der MMPs waren diese heterogen. *MMP2*, welche in invasivem BCa überexprimiert wird (Nakopoulou et al., 2003), wurde in Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie stärker exprimiert als bei Zellen der MDA-231-Zelllinie und in einem ähnlich hohen Maß wie bei der MDA-468-Zelllinie. *MMP3*, welche als prognostischer Marker für das Überleben in BCa-Patienten beschrieben ist

(Mehner et al., 2015), wurde bei Zellen der CTC-Zelllinie stärker transkribiert als bei Zellen der MDA-468-Zelllinie und in einem ähnlich hohen Maß wie bei Zellen der MDA-231-Zelllinie. *MMP9*, welche als unabhängiger prognostischer Überlebensfaktor in Lymphknoten-negativen BCa beschrieben ist (Scorilas et al., 2001), wurde dagegen in Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie geringer als in Zellen der MDA-468-Zelllinie und in einem ähnlich hohen Maß in Zellen der MDA-231-Zelllinie transkribiert. Eine Auflistung der detaillierten Expressions-Profile (Cq-Werte) sind in **Supplement Tabelle 8.9** zu finden.

3.3.3.4 Proteom-Analysen der CTC-ITB-01-Zelllinie

Die Ergebnisse der Transkriptom-Analysen konnten auch auf der Proteom-Ebene bestätigt werden. Die Rezeptortypen EGFR und HER2 wurden auf der Zelloberfläche der CTC-ITB-01-Zellen nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte eine starke Expression des ERs im Zellkern der CTC-Zelllinie sowie ein positives Signal für Keratin durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.25).

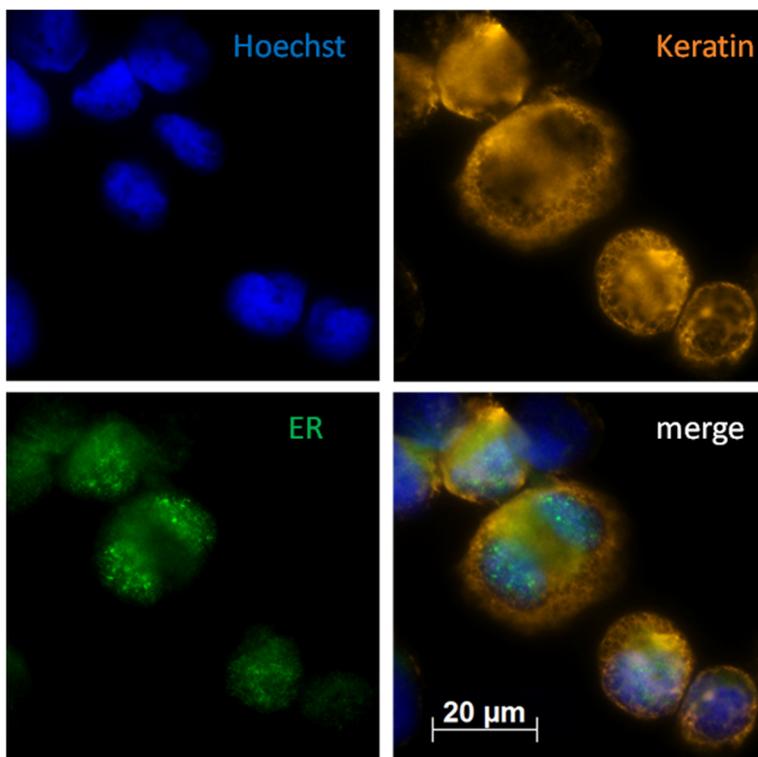


Abbildung 3.25 Estrogenrezeptor (ER)-positive Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie. Zellen wurden aus der Zellkultur isoliert und mittels Zentrifugation auf einen Objektträger fixiert und im Anschluss gefärbt. (Zeiss Axiovision, 400 x Vergrößerung).

Auch die Ergebnisse der ER-Fluoreszenzfärbung der CTC-ITB-01-Zelllinie entsprachen den Befunden der ER-Positivität des Primärtumors sowie der Metastase sowie dem oben beschriebenen Transkriptionssignal des *ESR1* der Zelllinie.

3.3.3.5 Identifikation einer funktionell relevanten Mutation im Genom der CTC-ITB-01-Zelllinie

3.3.3.5.1 *p53*-Mutationsanalyse der CTC-ITB-01-Zelllinie

Mutationen im *p53*-Gen wurden bereits häufig beim BCa (20 % - 88 % abhängig vom Subtyp (Bertheau et al., 2013)) beschrieben. p53 wirkt in gesunden Menschen als Tumorsuppressor und kontrolliert die Zellteilung sowie DNA-Reparatur und kann die Apoptose von ausgearteten Zellen induzieren (Riley et al., 2008). In verschiedenen Krebsentitäten wie auch in BCa ist u.a. eine Mutation des *p53*-Gens und der damit einhergehenden Funktionsverlust oder „*gain of oncogenic function*“, Grund für die unkontrollierte Zellteilung und Entwicklung zur Tumorzelle (Kastan and Berkovich, 2007). Für die Mutationsanalysen wurden Exone (Exon 5-9), die als „*Hotspot*“-Regionen für die meisten relevanten Mutationen beschrieben sind (Olivier et al., 2002), sequenziert. Die Sequenzierung wurde basierend auf dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung des *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) (siehe Kapitel 2.2.3.7) durchgeführt. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

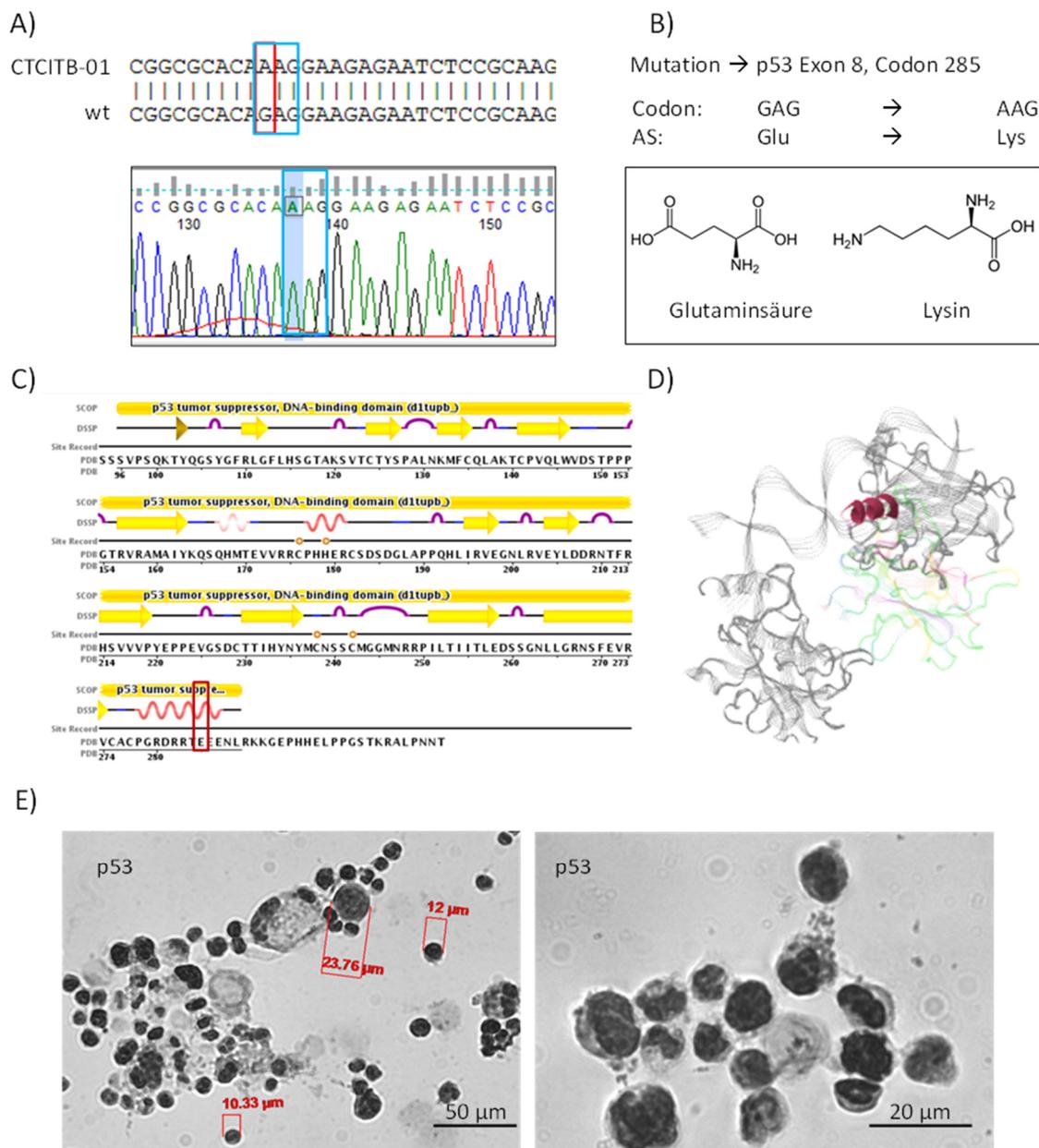


Abbildung 3.26 *p53*-Mutationsanalyse von Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie. A) Punktmutation von Guanin (G) zu Adenin (A) lokalisiert auf dem Exon 8 der *p53*-Gensequenz (FinchTV (Version 1.4.0)). B) Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Lysin durch die Mutation im Codon 285. C) Lokalisation der Mutation in der sekundären Proteinstruktur von *p53* sowie Einteilung der funktionalen Bereiche (http://www.pdb.org/pdb/explore/remediated_Sequence.do?structureId=1TUP&bionumber=1). D) Lokalisation der Mutation in der Quartärstruktur des *p53*-Proteins angelagert an ein DNA-Molekül. E) Immunzytochemische H_2O_2 -Färbung von *p53* im Zellkern der CTC-ITB-01-Zellen (Zeiss, Axiovision, 200 x und 400 x Vergrößerung).

Durch die Mutationsanalysen konnte eine Punktmutation im Exon 8, Codon 285 des *p53*-Gens der gDNA der CTC-Zelllinie detektiert werden. Die Mutation im Codon 285 ist bereits in der Literatur als „Hotspot“-Mutation in BCa beschrieben (Xu et al., 1997, Oh et al., 2000). Die Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch: Codon GAG was Glutaminsäure (E) codiert wurde zu AAG, wodurch nun Lysin (K) in die Aminosäuresequenz integriert wurde (vergleiche Abbildung 3.26 A-B). Die Lokalisation der Mutation ist in der Sekundär- sowie Quartärstruktur des Proteins markiert (Abbildung 3.26 C-D). Der Aminosäureaustausch von E zu K tritt in einer α -Helix-Struktur der DNA-Bindedomäne auf.

Nach der Identifikation der E285K *p53*-Mutation sollte in einem Folgeversuch das p53-Protein im Zellkern der CTC-ITB-01-Zelllinie immunzytochemisch analysiert werden. In gesunden Menschen ist im Normalfall p53 für eine Detektion nicht in ausreichender Menge vorhanden. Im Gegensatz dazu sind in den Zellkernen der CTC-ITB-01-Zelllinie, durch die dunkle Färbung, starke Signale von p53 zu beobachten, was auf eine überdurchschnittliche Menge des im Zellkern lokalisiert Transkriptionsfaktors hindeutet (Abbildung 3.26 E).

Zusammenfassend konnte im dritten Teilabschnitt dieser Arbeit die Langzeitkultivierung der zurzeit einzigen bekannten, proliferierenden CTC-Zelllinie aus dem Blut einer BCa-Patientin etabliert werden. Mit Hilfe von Transkriptom- sowie Proteom-Analysen konnte die CTC-ITB-01-Zelllinie phänotypisch als epitheliale Zelllinie charakterisiert werden. Mutationsanalysen des Genoms stellten eine Punktmutation im Exon 8, Codon 285 des *p53*-Gens heraus.

Weitere Mutationsanalysen des gesamten Exoms der Zelllinie im Vergleich zu Material beider Primärtumore sowie einer Metastase befinden sich noch im Auswertungsprozess und können im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr beschrieben und diskutiert werden. Des Weiteren wurden Zellen der CTC-Zelllinie subkutan in acht Nacktmäuse injiziert, um sie auf ihr tumorerzeugendes Potential zu testen. In allen der acht Mäuse ist ein Primärtumor gewachsen, wohingegen in einer Maus fünf weitere Metastasen detektiert werden konnten, was auf eine Metastasen-initiiierende Fähigkeit der Zelllinie hindeutet. Die Mäuse befinden sich weiterhin unter Beobachtung.

4 Diskussion

Der frühe Nachweis einer progredienten Tumorerkrankung sowie die gezielte Behandlung von metastasierten Krebspatienten stellen in der Onkologie nach wie vor große Herausforderungen dar. In den letzten Jahren haben sich zirkulierende Tumorzellen (CTCs) als Surrogat-Marker für die Prognose von Krebserkrankungen sowie als wertvoller Biomarker für die Überwachung von Krebstherapien erwiesen. Aufgrund der außerordentlich geringen Anzahl von CTCs im Blut besteht das Ziel gegenwärtiger Untersuchungen zunächst darin, neue hocheffiziente sensitive und spezifische Nachweismethoden für diese Zellen zu etablieren.

4.1 CTC-Detektion in Hochrisiko-PCa-Patienten

Trotz großer Fortschritte in der Früherkennung von Prostatakarzinomen repräsentiert der einzige standardmäßig verwendete Biomarker für diese Tumorentität PSA oftmals nicht den aktuellen Tumorstatus, wodurch die PSA-Bestimmung zu falsch-positiven/negativen Befunden führen kann (de Bono et al., 2008). Daher werden verlässliche Surrogat-Marker, die dazu beitragen, minimale Resterkrankungen (MRD) abzubilden und so verbesserte Therapieentscheidungen lenken zu können, dringend benötigt. In der metastasierten Situation sind CTCs, die über das FDA-zugelassene CellSeach®-Verfahren detektiert worden sind, bereits als prognostischer Biomarker anerkannt und konnten im Vergleich zu PSA sogar zu einer genaueren Vorhersage des Gesamtüberlebens der Patienten beitragen (Danila et al., 2007, de Bono et al., 2008, Saad and Pantel, 2012). Dabei war ein Grenzwert von ≥ 5 CTCs/7,5 ml Blut mit einer statistisch signifikant schlechteren Prognose für das PFS und OS der Patienten assoziiert als ein Nachweis von < 5 CTCs/7,5 ml Blut. Die klinische Relevanz von CTCs in der nicht-metastasierten Situation ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt, was auf geringe CTC-Detektionsraten (5 % - 27 %) und geringe CTC-Konzentrationen zurückzuführen ist (Davis et al., 2008, Resel Folkersma et al., 2012, Loh et al., 2014, Thalgott et al., 2015, Thalgott et al., 2013).

Im ersten Teilabschnitt dieser Doktorarbeit sollten verschiedene Methoden zur CTC-Detektion in Hochrisiko-PCa-Patienten verglichen werden. Für den Methodenvergleich wurden (i) das CellSearch®-System als Referenzmethode, (ii) der *in vivo* CellCollector sowie (iii) der EPISPOT-Assay verwendet. Mit Hilfe des EpCAM-abhängigen CellSearch®-Systems konnte eine CTC-Positivitätsrate (≥ 1 CTC/7,5 ml Blut) von 37 % detektiert werden (beide Zeitpunkte kombiniert). Im Vergleich zu bereits publizierten CTC-Positivitätsraten von 5 % - 27 % (Davis et al., 2008, Resel Folkersma et al., 2012, Thalgott et al., 2013, Thalgott et al., 2015, Loh et al., 2014, Pal et al., 2015) konnte im Rahmen dieser Patientenkohorte eine deutlich erhöhte Anzahl CTC-positiver Patienten detektiert werden. Die erhöhte CTC-Konzentration könnte auf auftretenden Lymphknotenmetastasen zurückzuführen sein (33/84 der Patienten) jedoch konnte keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0,28$). Über den CellCollector konnten bei 54,9 % der Patienten ≥ 1 CTC detektiert werden. Diese derzeit noch EpCAM-abhängige Technologie ermöglicht im Vergleich zum CellSearch®-System, während der halbstündigen *in vivo* Applikation im Patienten die Analyse eines deutlich höheren Blutvolumens, (Gorges et al., 2015). Folglich konnten mehr CTCs über den CellCollector als über das CellSearch®-System detektiert werden, wobei sich die Anzahl der CTCs nicht signifikant unterschied (CellSearch® Bereich 1-10 CTC, Median 1.8; CellCollector Bereich 1-12 CTC, Median 2.4).

Eine aktuelle Studie von Thiel und Kollegen konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl von CTCs, die über den CellCollector isoliert wurden, und dem Gesamtüberleben der Patienten bei einem Grenzwert von ≥ 5 CTCs nachweisen. Da die Korrelation auf einer kleinen Kohorte von PCa-Patienten im frühen bis metastasierten Stadien (lokalisierter PCa $n = 13$; lokal fortgeschrittener PCa $n = 7$; metastasierter PCa $n = 11$) basiert, müssen diese Ergebnisse allerdings in zusätzlichen größeren Studien validiert werden.

Obwohl sich über den CellCollector mehr CTCs in Hochrisiko PCa-Patienten nachweisen ließen als über das CellSearch®-System besteht die Limitation beider Methoden darin, dass nur epitheliale (EpCAM-positiven) CTCs detektiert werden können. Unterliegen CTCs jedoch einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), können epitheliale Adhäsionsmoleküle wie z.B. EpCAM herabreguliert werden, wohingegen mesenchymale Marker wie N-Cadherin und Vimentin heraufreguliert werden können (Thiery et al., 2009, Bonnomet et al., 2010,

Gunasinghe et al., 2012). Folglich wäre ein möglicher Ansatzpunkt für die Erhöhung der Detektionsrate des CellCollectors eine zusätzliche Anreicherung über EMT-assoziierte Marker wie N-Cadherin und das Zelloberflächen-Vimentin vorzunehmen (Bock et al., 2014, Satelli et al., 2015). Eine zusätzliche Detektion der CTCs könnte über den Nachweis des intrazellulären Markers Platin3 ermöglicht werden (Ueo et al., 2015, Yokobori et al., 2013). Demnach würde ein weiter entwickelter CellCollector nicht nur die Limitation des Blutabnahmevolumens aufheben, sondern darüber hinaus auch EMT-assoziierte CTC Subpopulationen identifizieren, die über epitheliale Marker nicht erfasst werden können.

Der EPISPOT-Assay basiert bereits auf einer Marker-unabhängigen Anreicherung und komplementiert dadurch das Methodenspektrum. Eine weitere Besonderheit des EPISPOT-Assays besteht darin, dass lediglich zur PSA-Sekretion befähigte CTCs und deshalb ausschließlich vitale Tumorzellen detektiert werden (Alix-Panabieres et al., 2007). Eine prognostische Relevanz der Ergebnisse des Assays konnte über die Keratin19-Sekretion bei BCa-Patientinnen nachgewiesen werden (Ramirez et al., 2014), wohingegen bisher keine prognostischen Daten zur PSA-Sekretion bekannt sind. Über den EPISPOT-Assay konnten bei 58,7 % der Patienten ≥ 1 CTC detektiert werden.

Die kumulative Positivitätsrate, in der bei mindestens einer der Assays ≥ 1 CTC nachgewiesen werden musste, betrug 81,3 % (87/107). Bei dem prognostisch relevanten Grenzwert von ≥ 5 CTCs lag die Positivitätsrate bei 21,5 % (23/107). In nur 18,7 % (20/107) der Fälle konnten in allen drei Assays detektiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Komplementarität der angewandten Technologien, die erstmals zu hohen CTC-Detektionsraten in nicht-metastasierten PCa-Patienten führen konnten.

Bei einer gepaarten Analyse von Patienten vor und nach der RP zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme von CTCs, die über den CellCollector detektiert wurden (Abnahme der CTCs von 66 % auf 34 % nach RP ($p = 0,031$)) was auf die mögliche Nutzung der CTCs als *Monitoring*-Biomarker für die Überwachung der Therapie hindeutet. In einer Studie an Blutproben von Lungenkarzinom-Patienten konnte der CellCollector ebenfalls für die Therapieüberwachung angewendet werden (Gorges et al., 2015). Diese Daten konnten weder in der von

Gorges et al. publizierten Studie in LCa-Patienten noch im Rahmen dieser Arbeit bei CTCs von PCa-Patienten, die über das CellSearch®-System detektiert wurden, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in einer CellSearch®-Studie mit mCRPCa-Patienten ein 30 %iger Abfall der CTC-Konzentrationen nach Therapie beobachtet, der mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten assoziiert war (Lorente et al., 2016). Die Anzahl an CTCs, die über den EpCAM-unabhängigen EPISPOT-Assay bestimmt wurden, wies wiederum einen gegensätzlichen Trend auf. Dabei wurde drei Monate nach der RP eine Erhöhung der CTC-Konzentration nachgewiesen (von 48 % auf 71 %, $p = 0,052$). Die Unterschiede in den CTC-Konzentrationen vor und nach der RP könnten auf die unterschiedlichen zugrundeliegenden Anreicherungsprinzipien (EpCAM-abhängig bzw. EpCAM-unabhängig) der verwendeten Methoden zurückzuführen sein. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von 1 – 2,4 h, die CTCs im Blut aufweisen (Meng et al., 2004), ist davon auszugehen, dass die zum späteren Zeitpunkt detektierten CTCs wahrscheinlich von Mikrometastasen abstammten, die über gängige bildgebende Verfahren nicht nachgewiesen werden können (Kollermann et al., 2008). Ob die erhöhte Anzahl von CTCs, die über den EpCAM-unabhängigen EPISPOT-Assay detektiert werden konnten, auf das Vorhandensein von EpCAM-negativen DTCs/Mikrometastasen hindeutet, welche mit einem potentiell erhöhten Risiko Metastasen auszubilden assoziiert sein können (Taubé et al., 2010, Bulfoni et al., 2016), muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Wieviele EpCAM-negative CTCs im Blutsystem von PCa-Patienten vorkommen, ist mit Hilfe der gegenwärtig verfügbaren CTC-Detektionstechnologien nicht zu bestimmen. Zwar zeigen Gewebesanalysen von Primärtumor und Metastasen von PCa-Patienten einen eher geringen Anteil von EpCAM-negativen oder -gering-exprimierenden Tumorzellen auf (11 % - 13 %) (Went et al., 2006, Spizzo et al., 2011), dennoch könnten die im Blut vorherrschenden Bedingungen oder der Prozess der Tumorzell dissemination veränderte EpCAM-Expressionslevel begünstigen. So könnten EpCAM-negative CTCs bzw. CTCs, die den EMT-Prozess durchlaufen haben, durch ihre erworbene Plastizität im Blutstrom einen Selektionsvorteil erfahren (Bednarz-Knoll et al., 2012, Joosse and Pantel, 2013, Yu et al., 2013, Rhim et al., 2012) und folglich vermehrt auftreten. Es wird diskutiert, dass Tumorzellen, die den EMT-Prozess durchlaufen haben, ähnliche Charakteristika wie Krebsstammzellen (CSC) aufweisen, die mit einem erhöhten

Metastasen-initiierenden Potential assoziiert sind (Mani et al., 2008, Baccelli and Trumpp, 2012, Rhim et al., 2012). In BCa-Patienten war die Expression von mesenchymalen Markern mit einer schlechteren Prognose für das progressionsfreie sowie Gesamt-Überleben assoziiert (Bulfoni et al., 2016). Die Identifikation von epithelialen sowie EMT-assoziierten CTCs könnte also einen bedeutenden Beitrag zur Stratifizierung von Patienten für eine aktive Verlaufskontrolle bzw. für multimodale Behandlungsstrategien leisten.

Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern konnten ausschließlich bei CTC-Konzentrationen, die über den EPISPOT-Assay detektiert wurden, nachgewiesen werden. Dabei zeigten ≥ 1 CTCs vor der RP eine statistisch signifikante Korrelation zum PSA-Wert ($p < 0,0001$) sowie dem klinischen Tumorstadium ($p = 0,04$). Bei einem Schwellenwert von ≥ 5 CTCs konnten keine Korrelationen zu klinisch relevanten Parametern nachgewiesen werden. Die Korrelation der Anzahl PSA-sekretierender Tumorzellen, die über den EPISPOT-Assay detektiert wurden (Alix-Panabieres et al., 2007) zu PSA-Serum-Konzentrationen könnte die klinische Relevanz der zuvor beschriebenen Ergebnisse bestätigen. Die Anzahl an PSA-positiven CTCs steht ebenfalls im direkten Zusammenhang mit der gesamten Tumorlast, die durch die Korrelation zum klinischen Tumorstadium repräsentiert wird. PSA-positive CTCs könnten also eine mögliche Erklärung für die entsprechend höheren PSA-Serum-Konzentrationen der Patienten sein. Der genaue Beitrag von PSA-positiven CTCs zum PSA-Serum-Level muss jedoch noch weiterführend analysiert werden. Dennoch könnten CTCs als wichtige PSA-Quelle eine Rolle spielen, insbesondere nach der Entfernung des Primärtumors. Neben der Sekretion von PSA wurde ebenfalls die Ko-Sekretion von FGF2, einem potentiellen Stammzell-Wachstumsfaktor, der ebenfalls für das Wachstum von mikrometastatischen Zellen relevant ist (Solakoglu et al., 2002), untersucht. Jedoch konnte bei keiner der PSA-positiven CTCs eine Ko-Sekretion von FGF2 detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie mit metastasierten PCa-Patienten eine FGF2-Sekretion der isolierten CTCs detektiert (Alix-Panabieres et al., 2007), was darauf hindeuten könnte, dass sich CTCs von nicht-metastasierten Patienten phänotypisch von CTCs in der metastasierten Situation unterscheiden.

Obwohl im Rahmen dieser im Vergleich zu bisher publizierten Studien deutlich höhere CTC-Konzentrationen in der Hochrisiko-Situation nachgewiesen werden konnten, bleibt die klinische Relevanz der detektierten CTCs zu klären. Für die genaue Beurteilung sind mehrjährige Verlaufskontrollen notwendig, die Aufschluss über das PFS oder OS geben können. Die beobachteten hohen CTC-Detektionsraten eröffnen jedoch bereits heute als „Flüssigbiopsie“ vielversprechende neue Untersuchungsmöglichkeiten im Bereich von minimalen Resterkrankungen (MRD) in Hochrisiko-PCa-Patienten, durch (i) den Nachweis einer klinisch relevanten auswertbaren Anzahl an CTCs sowie (ii) mögliche Analysen von heterogenen Subgruppen der Patienten mit EpCAM-positiven und EpCAM-negativen CTCs sowie (iii) die reproduzierbare molekulare Charakterisierung der CTCs. Neuste Studien an Gewebebiopsien zeigen, dass Resistenzmechanismen zu anti-Androgen Therapien, wie z.B. die durch die Expression von ARV7 vermittelte Resistenz gegen Abirateron-Acetat oder Enzalutamid in Patienten mit Kastrations-resistentem Protatakarzinom bereits in Hormon-sensitiven Patienten nachgewiesen werden können (Welti et al., 2016). In zukünftigen Studien könnten die durch diese Arbeit erworbenen Erkenntnisse ebenfalls zu einer verbesserten Blut-basierten Beurteilung von MRD sowie zu möglichen sequenziellen Folgeanalysen des Metastasierungsprozesses in PCa-Patienten beitragen.

4.2 RNA-Multiplex-Analysen von CTCs

Für Therapieentscheidungen in der Onkologie wird in der Regel die Expression der entsprechenden therapeutischen Zielstrukturen am Primärtumorgewebe bestimmt. In der metastasierten Situation steht dagegen meistens keine Tumorbiopsie der Metastasen zur Verfügung. Da sich Primärtumor und Metastasen hinsichtlich der Expression therapeutisch relevanter Gene unterscheiden können, werden Biomarker benötigt, die den aktuellen Status der Erkrankung widerspiegeln. In diesem Kontext könnte die Analyse von CTCs aus dem peripheren Blut zusätzliche wertvolle Informationen zur Expression therapeutischer Zielmoleküle sowie zur Aufklärung der Tumorheterogenität liefern (Heitzer et al., 2013, van de Stolpe et al., 2011, Gasch et al., 2013). Darüber hinaus ist die „Flüssigbiopsie“ im Gegensatz zur standardisierten Gewebebiopsie nicht invasiv und kann zur Verlaufskontrolle in bestimmten Abständen wiederholt werden (Pantel and Alix-Panabieres, 2013). In einigen klinischen Studien werden die Detektion sowie die Charakterisierung des HER2-Status der CTCs bereits zur klinischen Entscheidungsfindung herangezogen. So werden in der DETECT III-Studie Patientinnen mit primär HER2-negativen metastasierten Mammakarzinomen, aber HER2-positiven CTCs randomisiert mit dem gegen HER2-gerichteten Therapeutikum Lapatinib behandelt (Schramm et al., 2016). In die TREAT-CTC-Studie werden CTC-positive Patientinnen mit nicht metastasiertem Mammakarzinom eingeschlossen (Ignatiadis et al., 2016). Die Analyse von tumorrelevanten Transkripten in CTCs könnte zusätzlich Echtzeitinformationen über die Tumorerkrankung liefern sowie zu einer verbesserten Therapieplanung beitragen. Trotz einer Vielzahl von Studien, die bereits Transkriptionsanalysen von CTCs durchführten, fehlt bisher eine umfassende Validierung in großen klinischen Studien. Dabei korrelierte das Vorhandensein von CTCs, die über *Keratin19*-Transkripte detektiert wurden, mit einer schlechten Prognose der BCa-Patientinnen (Stathopoulou et al., 2001, Stathopoulou et al., 2003, Daskalaki et al., 2009, Xenidis et al., 2013, Xenidis et al., 2009). Smirnov et al. konnten erstmals Gen-Expressionsprofile von tumorassoziierten Genen in CTC-Pools von metastasierten Karzinompatienten nachweisen (Smirnov et al., 2005). Dabei konnten Patienten anhand ihrer Transkriptionsprofile von gesunden Spendern unterschieden sowie Tumorentitäten-spezifische Gen-Profile für die BCa, CRCa und PCa identifiziert werden. In weiteren Studien wurde der Nachweis von CTCs über Tumor-

assoziierte Transkripte, wie *EpCAM*, *MUC*, *HER2* oder EMT-assoziierte Transkripte wie *PI3KA*, *Akt2* oder *TWIST1* bestimmt (Kasimir-Bauer et al., 2012, Vaiopoulos et al., 2014, Barriere et al., 2012, Powell et al., 2012). Bei diesen Studien lagen die CTCs allerdings in einem Zellgemisch vor und/oder enthielten Kontaminationen durch Leukozyten. Multimarker-Transkriptomanalysen von einzelnen CTCs sind dagegen frei von Kontaminationen und könnten zusätzliche Informationen zur intra-individuellen Heterogenität von CTC-Subpopulationen aufzeigen. Einzelzellanalysen stellen jedoch nach wie vor eine große Herausforderung dar und konnten nur in wenigen Studien z.B. mit Hilfe eines dual-kolorimetrischen RNA-*in situ* Hybridisierungs-Assays oder des CTC-iChips durchgeführt werden (Yu et al., 2013, Ozkumur et al., 2013).

Im Rahmen dieses Teilprojekts der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein verlässlicher Methodenablauf etabliert und validiert werden, der es ermöglicht, angereicherte CTCs nach der Identifikation zu isolieren und in weiterführenden Analysen auf die Transkription von ausgewählten Zielgenen zu untersuchen. Dabei konnte in einzelnen CTCs eine heterogene Transkription von Therapie-relevanten Targets detektiert werden (Abbildung 3.14 - 3.17). Die Transkription von HER2 konnte z.B. in CTCs eines PCa-Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Muniyan et al. beschreiben einen ausgeprägten Zusammenhang von HER2-induzierten Signalwegen in Androgen-sensitiven und Kastrations-resistenten AR-positiven PCa-Zellen und ihrem Proliferationsverhalten (Muniyan et al., 2015). Dabei deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination von HER2-Inhibitoren mit einer Antiandrogen-Behandlung durch Enzalutamid und Abirateron-Acetat, einer Resistenzentwicklung und Tumorprogression in PCa entgegenwirken könnte (Muniyan et al., 2015). Neben der Transkription von HER2 wiesen drei der sieben CTCs ebenfalls ein starkes Signal der ARV7 auf (Abbildung 3.17). ARV7 ist eine konstitutiv aktive Splice-Variante des AR. In Patienten mit mCRPCa konnte eine Assoziation der Transkription dieser Splice-Variante in CTC-Pools mit der Ausbildung einer Kastrationsresistenz sowie Resistenz gegen Enzalutamid nachgewiesen werden (Antonarakis et al., 2014). In einer weiteren Studie von Welti et al. konnte zusätzlich eine Korrelation zwischen dem ARV7-Nachweis in Tumorgewebe und der Resistenzentwicklung sowie einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Gesamtüberleben der Patienten herausgestellt werden (Welti et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde zum

ersten Mal eine differenzielle Transkription von HER2 und/oder ARV7 in verschiedenen CTC-Subgruppen eines individuellen PCa-Patienten nachgewiesen. Die Expression dieser resistenzassoziierten Gene könnte für die Therapieüberwachung genutzt werden, und z.B. könnte bei HER2/ARV7-positiven Patienten anstelle von Enzalutamid eine Kombination von Galeteron und Abirateron-Acetat mit HER2-Inhibitoren verabreicht werden. Die Wirksamkeit von Enzalutamid und Galeteron wird aktuell in einer multizentrischen Phase III-Studie (NCT02438007) bei ARV7-positiven mCRPCa-Patienten analysiert. Weitere Targets, die durch RNA-Multiplex-Analysen von CTCs einen Beitrag für Therapieentscheidungen liefern könnten, sind der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor VEGFA oder Moleküle, die in Prozesse der Zellteilung involviert sind, wie mTOR oder PI3KCA. Die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade beschreibt einen der wichtigsten Signalwege in Tumorzellen, der bei Anschaltung der Aktivierung das Tumorwachstum und -Differenzierung begünstigt (LoPiccolo et al., 2008) und so als Target für eine Vielzahl von Therapien Anwendung findet (Johnston, 2015, Nagaraj and Ma, 2015). Tumoren benötigen für ihr Wachstum nach dem Erreichen einer bestimmten Größe eine externe Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Um diese Versorgung zu gewährleisten, können Tumorzellen VEGFA sekretieren, was wiederum die Vaskulo- und Angiogenese induzieren kann (Ferrara, 2002). Viele Therapien zielen darauf ab, durch eine Inhibierung des VEGF-Signalweges diese Versorgung zu unterbrechen (Welti et al., 2013, Kristensen et al., 2014). In CTCs zweier Subgruppen einer BCa-Patientin konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Transkription von *PI3KCA*, *mTOR* sowie *VEGFA* detektiert werden. Dabei wiesen CTCs der ersten Subgruppe eine erhöhte Menge an *PI3KCA*- sowie *mTOR*-Transkripten auf, CTCs der zweiten Gruppe dagegen eine erhöhte Anzahl an *VEGFA*-Transkripten (Abbildung 3.14). Durch den Nachweis der erhöhten Transkription von Zellwachstums-assoziierten Genen (*PI3KCA*, *mTOR*) in der ersten Subgruppe könnten diese CTCs zum Zeitpunkt der Isolation in der Lage gewesen zu sein zu proliferieren. Therapieansätze, die den PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs inhibieren, könnten somit ein breites Wirkspektrum besitzen (Baselga et al., 2012, LoPiccolo et al., 2008). Echtzeitinformationen über die analysierten aktiven Signalwege der isolierten CTCs können folglich dazu beitragen, therapeutisch relevanten Targets zu identifizieren und die Entscheidungsfindung für einen wirksamen Therapieansatz unterstützen. In Kombination mit Analysen spezifischer Mutationen, welche die Wirksamkeit von Target-spezifischen

Therapien zusätzlich beeinflussen (Gasch et al., 2013, Heitzer et al., 2013), könnten die RNA-Einzelzell-Analysen in weiterführenden Studien einen wichtigen Beitrag zu individuellen Behandlungsentscheidungen leisten.

Neben der Untersuchung von Therapie-relevanten Targets konnten Transkripte, die in biologische Prozesse wie die EMT involviert sind, in einzelnen CTCs näher charakterisiert werden. Die Anreicherung der CTCs basierte entweder auf dem EpCAM-abhängigen CellSearch®-System (Cristofanilli et al., 2004) oder auf dem neuen Marker-unabhängigen, größenbasierten Parsortix™-System (Hvichia et al., 2016a). Interessanterweise konnten die einzelnen CTCs unabhängig von der verwendeten Anreicherungstechnologie in bestimmte Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 3.15). So wies eine CTC-Subgruppe vermehrt Gene, die in EMT-assoziierte Prozesse involviert sind, wie *N-Cadherin (CDH2)*, *Vimentin*, *JAG1*, den mesenchymalen Regulator in epithelialen Brustzellen *SOX10* (Dravis et al., 2015) sowie die Transkriptionsfaktoren *ZEB1* und *ZEB2* auf (Abbildung 3.15). Drei der vier CTCs dieser Subgruppe wurden über das EpCAM-basierte CellSearch®-System detektiert und nicht wie zu erwarten von dem Marker-unabhängigen Parsortix™-System. Folglich könnten die analysierten CTCs zum Zeitpunkt der Isolation in einem Übergangszustand der EMT bzw. MET vorgelegen haben. Aktuelle Studien konnten mit Hilfe eines epithelialen und/oder mesenchymalen Tumorzell-Modellsystems (*in vivo*) einen inhibitorischen Effekt der EMT auf das Tumor-initiiierende Potential von epithelialen Tumorzellen feststellen (Celia-Terrassa et al., 2012). Dabei zeichnete sich der intermediäre Phänotyp durch erhöhte Plastizität sowie Metastasen-initiiierendes Potential aus. Folglich würden CTCs, die einen nicht beeinflussbaren epithelialen oder mesenchymalen Phänotyp aufweisen, die Plastizität verlieren, zwischen EMT und MET zu variieren und z.B. durch (Re-) Expression von E-Cadherin Metastasenbildung zu initiieren (Chao et al., 2010, Korpál et al., 2011, Park et al., 2007). Diese CTC-Subgruppe wies ebenfalls eine verstärkte Transkription der Gene, die Matrixmetalloproteasen (*MMP2*, *MMP3* und *MMP9*), *Fibronektin (FN1)* sowie *Kollagene (COL1A2, COL5A2)* kodieren, auf. Fernandez-Garcia et al. beschrieben eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression von *FN1* und *MMPs* in BCa-Tumorzellen und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Metastasen auszubilden sowie einer schlechteren Prognose für das Gesamtüberleben (Fernandez-Garcia et al., 2014). Auch die Expression von

Osteopontin (SSP1), die in derselben Subgruppe heraufreguliert vorlag, steht im Zusammenhang mit der Regulation der Metastasierung (Shevde et al., 2010). Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass mit Hilfe der angewandten Transkriptionsanalysen eine intermediäre EMT/MET-assoziierte CTC-Subgruppe identifiziert werden konnte. In wieweit die analysierten CTCs ein Metastasen-initiierendes Potential aufweisen, bleibt jedoch weiterhin zu klären.

Eine weitere relativ kleine Subgruppe der analysierten CTCs einer BCa-Patientin wies neben der Transkription von epithelialen Markern wie *K19*, *E-Cadherin* und *EpCAM* ebenfalls Signale für den Leukozytenmarker *CD45* auf (Abbildung 3.14). Interessanterweise zeigten diese Zellen ebenfalls eine erhöhte Transkription von EMT-assoziierten Markern wie *Twist* und *Vimentin*, dem Onkogen *Myc*, dem Stammzellmarker *CD44* sowie *MRP1*, das in die Entwicklung von Medikamentenresistenzen involviert ist (Munoz et al., 2007). Dem Transkriptionsprofil zufolge konnten die analysierten Zellen als Tumorzellen charakterisiert werden, jedoch ist die Rolle von CD45-positiven CTCs, die ebenfalls durch das CellSearch®-System detektiert werden, noch unklar (Yu et al., 2011, Alix-Panabieres and Pantel, 2014). Folglich könnte die etablierte Analysemethode einen Beitrag dazu leisten, die Relevanz dieser spezifischen Zellen in zukünftigen Studien weiter zu charakterisieren.

Zusätzlich konnten in unterschiedlichen CTC-Subgruppen Transkripte nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit Stammzeleigenschaften und metastatischen Prozessen stehen (*EpCAM*, *CD44* und *CD24*). Publierte Daten beschreiben die Existenz von Tumor-Stammzellen (CSC), die durch eine Heraufregulation von CD44 und einer Herabregulation von CD24 charakterisiert sind (Clarke et al., 2006). Zusätzliche Studien belegen eine kontroverse Rolle von CD24, bei der beide Varianten $CD44^{hoch}/CD24^{niedrig}$ und $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ das Potential aufwiesen, Tumorwachstum zu induzieren (Jaggupilli and Elkord, 2012, Yeung et al., 2010). Darüber hinaus war eine Überexpression von CD24 mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert (Lee et al., 2010, Visvader and Lindeman, 2008). In der vorliegenden Studie waren CTCs zweier Subgruppen einer BCa-Patientin durch eine starke Transkription von *EpCAM* sowie *CD24* charakterisiert, wobei nur die zweite Gruppe ein starkes Signal für *CD44* aufwies

(Abbildung 3.14). Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse bleibt die Bedeutung der heterogenen Transkription von Stammzellmarkern in CTCs weiterhin ungeklärt.

Mit Hilfe der etablierten Methoden konnten ebenfalls Transkripte für Signalmoleküle detektiert werden, die in die Kommunikation zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem involviert sind. Das Immunsystem als körpereigene Abwehr gegen entartete Zellen stellt durch eine Vielzahl an beschriebenen Interaktionen mit Tumorzellen ein hoch aktuelles Untersuchungsfeld in der Krebstherapie dar (Schreiber et al., 2011, Noman et al., 2014). Dabei konnten in den isolierten CTCs Transkripte für Chemokine und Interleukine (CCL4, IL15, CXCL9) identifiziert werden, die bei unterschiedlichen Krebsentitäten in Prozesse der Tumorprogression oder Metastasenbildung assoziiert sind. Das Chemokin C-C-Motiv-Ligand 4 (CCL4) unterstützt z.B. die Bildung von Knochenmark-Metastasen (Mukaida et al., 2015). Des Weiteren ist z.B. für *IL15* bekannt, dass es bei einer erhöhten Transkription in Kolorektal-Karzinomen (CRCa) eine wichtige Rolle in Zell-Wachstum, -Invasion und Bildung von Metastasen spielt (Kuniyasu et al., 2001). Für CRCa ist ebenfalls beschrieben, dass die Expression von CXCL9 mit Tumordifferenzierung, -invasion und Metastasenbildung assoziiert ist (Wu et al., 2016). Auch in Melanom-Zellen konnten bei einer erhöhten Expression von CXCL9 ähnliche Effekte, die eine Invasion von Tumorzellen begünstigen, beobachtet werden (Amatschek et al., 2011). Da die vorliegenden Daten auf einer sehr geringen Stichprobenanzahl (2 CTCs) beruhen, ist eine weiterführende Interpretation der Daten bisher nicht möglich.

Aktuelle Untersuchungen beschreiben die Heterogenität von Krebszellen als grundlegende Charakteristik der funktionalen Plastizität, die zu Resistenzentwicklungen oder einer erfolgreichen Anpassungsfähigkeit an neue Umgebungen, wie metastatische Nischen, führen kann (Chen and Weiss, 2015). Diese Heterogenität und die damit verbundenen transkriptionalen Veränderungen konnten mit Hilfe des etablierten Methodenschemas eingehend charakterisiert werden. Transkriptionsprofile von CTCs könnten folglich zukünftig eine Stratifizierung von Patienten in phänotypische Subgruppen ermöglichen. Dabei

könnten die Ergebnisse dieser blutbasierten Analysen für die Weiterentwicklung von personalisierten Therapiestrategien angewendet werden („Flüssigbiopsie“) (Alix-Panabieres and Pantel, 2014, Gorges and Pantel, 2013). Aufgrund der bereits oben beschriebenen mit bisher verfügbaren Methoden geringen Anzahl an CTCs in Patienten mit nicht metastasierten Tumoren ist die klinische Anwendung bisher weitestgehend auf Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung beschränkt.

4.3 CTC-Zelllinien-Modell

Trotz großer Fortschritte in den Analysemöglichkeiten von CTCs bleiben die nähere molekulare Charakterisierung und Untersuchungen der Regulation metastatischer Prozesse bis heute eine große Herausforderung. Neben den Analysen von CTCs, die aus dem peripheren Blut von Patienten isoliert wurden, besteht ein wichtiges Ziel der CTC-Forschung darin, CTC-Modell-Systeme zu generieren, die umfassende molekulare und funktionale Analysen ermöglichen. Im Rahmen dieses Teilprojekts der Arbeit konnte erstmals eine permanente CTC-Zelllinie (CTC-ITB-01) aus dem peripheren Blut einer BCa-Patientin etabliert werden. Das Blut von insgesamt 50 Patientinnen wurde mit Hilfe des CellSearch®-Systems auf das Vorhandensein von CTCs untersucht. Der Literatur entsprechend wurde das Blut bei einer ausreichenden Anzahl an CTCs (> 100 CTCs (Baccelli et al., 2013, Cayrefourcq et al., 2015)) für die Langzeitkultivierung prozessiert. Nur aus einer Blutprobe, die $> 50\,000$ CTCs/7,5 ml Blut enthielt, konnten proliferierende Zellen vermehrt werden. Die sehr geringe Rate von isolierten proliferierenden Zellen könnte zum einen auf die kurze Überlebensdauer von CTCs in Blut von 1 – 2,4 h (Meng et al., 2004) und zum anderen auf den generell hohen Anteil an apoptotischen CTCs in Blut (Mehes et al., 2001, Rossi et al., 2010) und damit indirekt auch auf die Wirksamkeit der Krebstherapie zurückzuführen sein. Wahrscheinlich ist es aber außerordentlich kompliziert, die *in vivo*-Bedingungen der Tumorzellen, die ihnen ein ungehindertes Wachstum ermöglichen, auch *in vitro* zu etablieren.

Zellen der CTC-ITB-01-Linie weisen eine starke Heterogenität in Morphologie, Größe und Wachstumsverhalten auf (Abbildung 3.20). Unter den von uns gewählten Wachstumsbedingungen wachsen ca. 50 % der Zellen adhärent, die anderen vermehren sich in Sphären. Darüber hinaus können die adhärennten Zellen morphologisch in eher epitheliale (runde) oder eher mesenchymale (spindelförmige) Phänotypen unterteilt werden. Die Zellgröße beider Wachstumsformen variiert zwischen 8 μm – 30 μm . Die unterschiedlichen Zellgrößen stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer auftretenden Aneuploidie, bei der eine erhöhte Chromosomenanzahl (\emptyset 74 Chromosomen) in Zellen der CTC-Zelllinie nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.23). Die sehr großen Zellen von 30 μm besitzen mehrere Zellkerne (Abbildung 3.22), wodurch sie durch die Transkription und Translation der erhöhten DNA/mRNA-Menge mehr Proteine herstellen, was im Vergleich zu den Zellen mit nur einem Zellkern,

zu einer erhöhten Biomasse führt (Storchova and Pellman, 2004). Krebszellen weisen aufgrund ihrer unkontrolliert erhöhten Zellteilungsraten, häufiger Ploidie-Veränderungen wie Triploidie oder Tertraploidie auf (Nigg, 2002, Matzke et al., 2003). Dabei liegen meistens keine vollständigen Chromosomensätze (Polyploidie), sondern durch Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen charakterisierte chromosomale Aberrationen (Aneuploidie) vor. Das Auftreten der sogenannten „*giant cancer cells*“ ist in BCa-Patientinnen mit einem stärker ausgeprägten Differenzierungsgrad der Tumorzellen assoziiert (Fei et al., 2015). Die Bildung von aneuploiden großen Zellen der CTC-ITB-01-Linie scheint erst nach mehreren Teilungsprozessen aufzutreten, da sie erstmals nach mehreren Wochen der Kultivierung und nicht bereits im CellSearch®-Lauf der Patientin (CTCs Ø 15 µm), detektiert werden konnten (Abbildung 3.22). Ob Mutationen, die möglicherweise zu diesen veränderten mitotischen Prozessen und somit zur Aneuploidie führten, schon in den CTCs im Blut der Patientin vorlagen oder erst während der Langzeitkultivierung erworben wurden, bleibt ungeklärt. Da die Kultivierungsdauer im Vergleich zur Tumorprogression der stark metastasierten Patientin jedoch eine viel kürzere Zeitspanne einnimmt, ist die Entstehung der Mutation aufgrund von Selektionsmechanismen wahrscheinlicher.

In Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie konnte eine Mutation eines Gens nachgewiesen werden, was in die Kontrolle von Zellteilungsprozessen involviert ist. Dabei wurde eine Punktmutation im Exon 8, Codon 285 des *p53*-Gens detektiert. Die Mutation in Codon 285 ist bereits in der Literatur als „Hotspot“-Mutation in BCa beschrieben (Xu et al., 1997, Oh et al., 2000). Die Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure (E) zu Lysin (K), der die α -Helix-Struktur der DNA-Bindedomäne beeinflusst (Abbildung 3.26 A-D). Alpha-Helix-Strukturen sind hoch konservierte, rechtsgedrehte Spiralen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonyl- und Amidgruppen der Aminosäuren, stabilisiert werden (Kabsch and Sander, 1983). Glutaminsäure ist eine polare, negativ geladene Aminosäure, wohingegen Lysin eine basische, positiv geladene Aminosäure ist. Ein Aminosäureaustausch dieser stark unterschiedlichen Aminosäuren induziert in der α -Helix-Struktur der DNA-Bindedomäne eine Konformationsänderung und kann so zu einem Funktionsverlust der Tumor-suppressorisches Eigenschaften von p53 führen. In einer immunozytochemischen Analyse der Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie konnte ein starkes nukleäres p53-Signal detektiert werden (Abbildung

3.26 E). Bei gesunden Zellen weist p53 eine extrem kurze Halbwertszeit auf, so dass es durch die entsprechende Immunfärbung in der Regel nicht nachgewiesen werden kann (Maki and Howley, 1997). Die stark erhöhte p53-Proteinmenge im Zellkern ist dann auf eine verlängerte Halbwertszeit durch einen fehlerhaften Abbau des veränderten Proteins zurückzuführen. So würde die, aus dem Aminosäureaustausch resultierende Konformationsänderung von p53, zum einen die DNA-Bindung inhibieren und zum anderen den Abbauprozess negativ beeinflussen. p53 wirkt in gesunden Menschen als Tumorsuppressor und kontrolliert die Zellteilung sowie DNA-Reparatur und kann die Apoptose von entarteten Zellen induzieren (Riley et al., 2008). Bei einem Funktionsverlust von p53 können Replikationsfehler nicht korrigiert oder die Apoptose von Zellen, die eine unkontrollierte oder fehlerhafte Zellteilung absolvieren, nicht mehr induziert werden, was zu einer Tumorprogression führen könnte. Zusätzlich kann eine Mutation im p53-Gen zu einem „*gain of oncogenic function*“ führen, was in ein erhöhtes Tumorprogressions- oder Metastasierungs-Potential resultieren kann (Kastan and Berkovich, 2007). In Patienten mit BCa werden abhängig vom Subtyp in 20 % - 88 % eine p53-Mutation detektiert (Bertheau et al., 2013). Das Auftreten der E285K p53-Mutation im Genom der CTC-ITB-01-Zelllinie könnte also eine Ursache für die Entwicklung zur Krebszelle gewesen sein.

Die zuvor beschriebenen relativ großen aneuploiden Zellen mit mehreren Zellkernen der CTC-Zelllinie könnten auch mit dem p53-Funktionsverlust assoziiert sein. Wenn Zellen durch eine fehlerhafte Mitose mehrere Chromosomensätze aufweisen, werden u.a. p53-assoziierte Signalkaskaden ausgelöst, wodurch die Zellen in den Zellarrest (G1-Phase) eintreten oder eine mögliche Apoptose induziert wird (Storchova and Pellman, 2004). Durch den p53-Funktionsverlust könnten Zellen, bei denen eine fehlerhafte Zellteilung auftritt, unkontrolliert proliferieren, was u.a. zu aneuploiden Chromosomensätzen führen würde (Bartek and Lukas, 2001). Folglich könnte das permanente Auftreten der mehrkernigen Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie in Zusammenhang mit der detektierten p53-Mutation stehen.

Wie zuvor beschrieben, konnten Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie morphologisch als heterogen beschrieben werden. Trotz der unterschiedlichen Wachstumsformen zeigten vergleichende Transkriptom- und Proteom-Analysen von Sphären oder

adhärenten Zellen übereinstimmende Ergebnisse. Dabei wiesen alle Zellen klare epitheliale Charakteristika, wie die Transkription und/oder Expression von *EpCAM*, *pan-Keratinen* sowie *E-Cadherin* auf (Abbildung 3.24). Marker die in EMT-assoziierte Prozesse involviert sind, wie *N-Cadherin*, *Vimentin*, *JAG1*, *NOTCH1* (Thiery et al., 2009, Bonnomet et al., 2010, Gunasinghe et al., 2012), das Zelladhäsionsmolekül *FNI* oder *MMPs* konnten dagegen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.24). Zellen der CTC-Zelllinie zeigten eine moderate Transkription von Integrinen ($\alpha1$, αV , $\beta1$). Diese Daten deuten darauf hin, dass die isolierten CTCs, aus denen die CTC-ITB-01-Zelllinie etabliert werden konnte, den Prozess der EMT nicht durchlaufen haben. Zwar konnten in der Kultur eher mesenchymale Zellmorphologien detektiert werden, die molekularen Analysen charakterisierten aber auch diese Zellen als epithelialen Phänotyp. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wies die Patientin distante Metastasen im Knochen, in der Leber, der Milz und der Vagina auf. Folglich wurde eine außerordentlich hohe Anzahl an CTCs kontinuierlich in die Blutbahn abgegeben (CellSearch®-Lauf > 50 000 CTCs/7,5 ml Blut (Abbildung 3.22). Ein Großteil der CTCs gelangte wahrscheinlich passiv, durch fehlerhafte Blutgefäße, deren Bildung während der Tumorprogression vermehrt induziert wird (Hashizume et al., 2000, Morikawa et al., 2002), in das Gefäßsystem (Camara et al., 2006, Fornvik et al., 2013, Friedl and Alexander, 2011). Dabei scheint eine erhöhte Fähigkeit invasiv zu wachsen, die für mesenchymalen CTCs beschrieben wurde (Taube et al., 2010, Liu et al., 2014), oder die Degradation des umliegenden Gewebes durch die Sekretion von MMPs (Wolf and Friedl, 2011) eine sekundäre Rolle gespielt zu haben. Trotz der prognostischen Relevanz, die EpCAM/pan-Keratin-positive CTCs in frühen oder metastasierten Krebsstadien aufweisen (Bidard et al., 2014, Cohen et al., 2008, de Bono et al., 2008, Zhang et al., 2012, Scher et al., 2009), wird in der Literatur intensiv darüber diskutiert, ob CTCs nach EMT tatsächlich ein stärkeres Metastasen-initiierendes Potential aufweisen (Joosse and Pantel, 2013, Yu et al., 2013, Thiery, 2002). In der Studie von Yu et al. wurden CTCs anhand ihrer Expressionsprofile in epitheliale oder mesenchymale Subgruppen unterteilt, wobei mesenchymale CTCs mit einer Tumorprogression assoziiert waren (Yu et al., 2013). Eine erhöhte Plastizität von CTCs die den Prozess der EMT durchlaufen haben wiesen *in vivo* eine erhöhtes Metastasen-initiierendes Potential auf (Rhim et al., 2012). Baccelli und Kollegen konnten mit Hilfe von CTC-abgeleiteten Xenografts ein Stammzell-assoziiertes Expressionsprofil von CTCs identifizieren, das zusätzlich positiv für epitheliale Marker ist (**EPCAM⁺CD44⁺CD47⁺MET⁺**)

und mit einer erhöhten Anzahl von Metastasen sowie einer geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert war (Bacelli et al., 2013). Eine aktuelle Studie von Bulfoni und Kollegen zeigte, dass CTCs von mBCa-Patienten, die den Prozess der EMT durchlaufen haben, mit einer schlechteren Prognose für das Progressionsfreie oder Gesamtüberleben assoziiert waren (Bulfoni et al., 2016). Weitere Studien beschreiben übereinstimmende Charakteristika zwischen Krebsstammzellen und CTCs nach der EMT, die ebenfalls mit einem erhöhten Metastasen-initiiierenden Potential sowie einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert waren (Mani et al., 2008, Aktas et al., 2009, Giordano et al., 2012, Pirozzi et al., 2013). Im Kontrast dazu steht die in dieser Arbeit etablierte epitheliale CTC-ITB-01-Zelllinie, die als einzige permanente CTC-Zelllinie weltweit dazu in der Lage ist *in vitro* zu proliferieren. Die CTC-Zelllinie zeigte ebenfalls nach einer subkutanen Injektion in Mäuse ein Tumor-erzeugendes Potential (8/8) sowie ein Metastasen-initiiierende Potential (1/8), wobei die Mäuse weiterhin unter Beobachtung stehen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Zellen der CTC-Zelllinie ebenfalls eine hohe Plastizität und Invasivität aufwiesen und durch den Prozess der Mesenchymalen-Epithelialen Transition das epitheliale Expressionsprofil zurückerlangten (Ocana et al., 2012).

Eine Verbindung von CTCs zum Primärtumor und zur vaginalen Metastase konnte durch die Bestimmung des ER-Status herausgestellt werden. Dabei zeigten Zellen der CTC-Zelllinie eine erhöhte Transkription des *ESR1*-Gens sowie eine starke Expression des ERs im Zellkern (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Übereinstimmende Gewebeanalysen des Primärtumors und Metastase zeigten in 80 % der Tumorzellkerne ebenfalls eine ER-Expression (Tabelle 3.6).

Erhöhte Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR oder HER2 konnte nicht detektiert werden, was ebenfalls den Gewebefunden von Primärtumor und Metastase entspricht. Dagegen konnte eine erhöhte Transkription des Wachstumsfaktorrezeptors *HER3* und des Mitglieds des PI3KCA/Akt-Signalwegs *Akt1* in Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie nachgewiesen werden. HER3 wird bei Mammakarzinomen in 50 – 70 % der BCa-Fälle detektiert und zeigt meistens eine Ko-Überexpression von HER2 (Naidu et al., 1998, Witton et al., 2003). Die Phosphorylierung von HER3 leitet eine Signalkaskade ein, die den PI3K/Akt-

Signalweg induziert (Hellyer et al., 1998). In den meisten Fällen dimerisiert HER3 nach Aktivierung mit HER2, wodurch eine Phosphorylierung der C-terminalen Rezeptordomäne induziert wird, die wiederum zur Bindung von PI3K und zu deren Aktivierung führt (Hynes and Lane, 2005). Da die Zellen der CTC-ITB-01-Zelllinie HER2-negativ sind, aber eine starke Amplifikation von *HER3*- und *Akt1*-Transkripten aufweisen, scheint HER3 unabhängig von HER2 zu agieren. Zwar ist in der Literatur beschrieben, dass eine HER3-Dimerisierung nicht zur Phosphorylierung der intrazellulären Domäne führt (Kim et al., 1998), jedoch ist auch eine Studie publiziert, in der eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch HER3 unabhängig von EGFR oder HER2 detektiert werden konnte (Engelman et al., 2007). Möglicherweise wurde durch eine Mutation im *HER3*-Gen eine HER3-Variante exprimiert, deren C-Terminus auch unabhängig von HER2-Interaktionen phosphoryliert werden kann. Der aktivierte HER3-Rezeptor könnte die p85-Bindedomäne von PI3K binden und so die Aktivierung von Akt induzieren. Die Induktion der PI3K/Akt-Signalkaskade könnte wiederum ein Grund für die erhöhte Zellproliferation der CTC-ITB-01-Zelllinie sein.

5 Ausblick

Abschließend konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit drei hoch relevante Teilgebiete von aktuellen Forschungsfeldern zirkulierender Tumorzellen behandelt werden. Dabei konnten die generierten Ergebnisse eine Weiterentwicklung von grundlegenden Fragestellungen der personalisierten Medizin leisten (Abbildung 5.1).

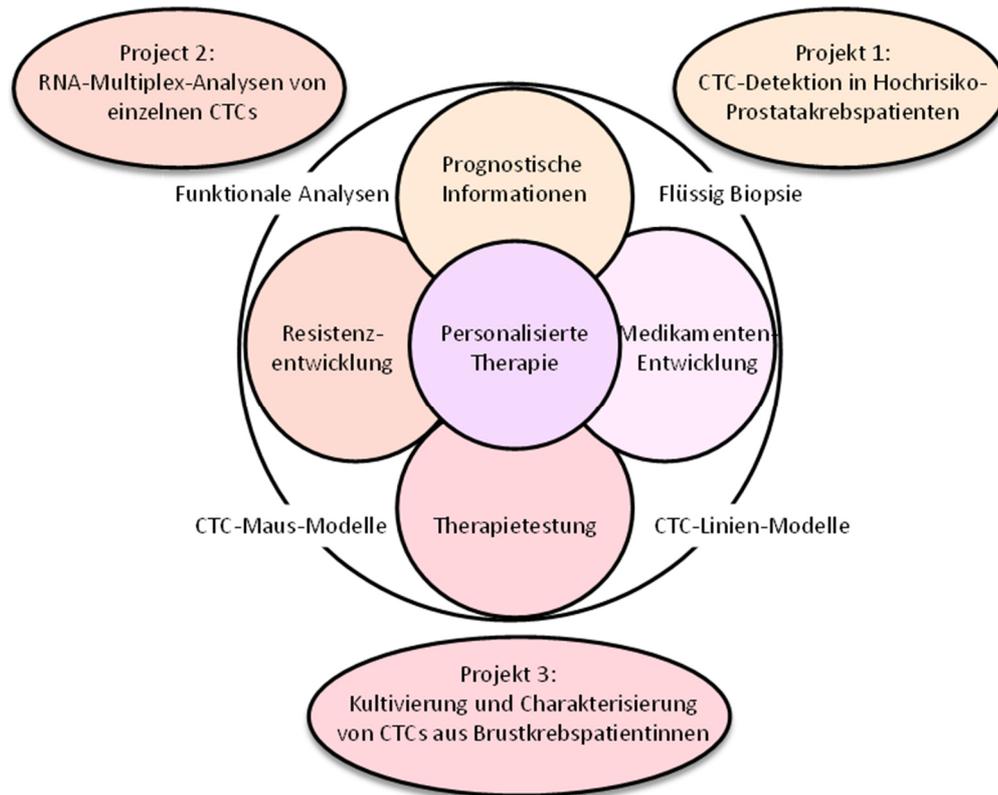


Abbildung 5.1 Übersicht der drei Doktorarbeitsprojekte und Eingliederung in potentielle Anwendungsbereiche der personalisierten Medizin (verändert nach (Alix-Panabieres et al., 2016)).

Eine Kombination von drei komplementären CTC-Detektionstechnologien konnte erstmals zu hohen CTC-Detektionsraten in nicht-metastasierten PCa-Patienten führen und deutet auf eine möglichen Nutzung der CTCs als *Monitoring*-Biomarker für die Überwachung der Therapie hin. In zukünftigen Studien könnten die erworbenen Erkenntnisse folglich zu einer Blut-basierten Beurteilung („Flüssigbiopsie“) von minimalen Resterkrankungen in nicht-metastasierten PCa-Patienten beitragen.

Mit Hilfe der RNA-Multiplex-Analysen könnten Transkriptionsprofile von CTCs eine Stratifizierung von Patienten in phänotypische Subgruppen ermöglichen und demnach zu einer Weiterentwicklung von personalisierten Therapiestrategien beitragen.

Die etablierte epitheliale CTC-Zelllinie könnte als wertvolles Modellsystem eingesetzt werden, um den Prozess der Metastasierung näher zu charakterisieren. Darüber hinaus könnten über *in vitro*- sowie *in vivo*-CTC-Zelllinien-Modelle neue Medikamente für Tumorthérapien getestet werden und so einen ersten Ansatz für eine verbesserte Therapieplanung liefern.

6 Literatur

- AKTAS, B., TEWES, M., FEHM, T., HAUCH, S., KIMMIG, R. & KASIMIR-BAUER, S. 2009. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 11, R46.
- ALIX-PANABIERES, C. 2012. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res*, 195, 69-76.
- ALIX-PANABIERES, C., BARTKOWIAK, K. & PANTEL, K. 2016. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Mol Oncol*, 10, 443-9.
- ALIX-PANABIERES, C. & PANTEL, K. 2014. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*, 14, 623-31.
- ALIX-PANABIERES, C., VENDRELL, J. P., PELLE, O., REBILLARD, X., RIETHDORF, S., MULLER, V., FABBRO, M. & PANTEL, K. 2007. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem*, 53, 537-9.
- ALLARD, W. J., MATERA, J., MILLER, M. C., REPOLLET, M., CONNELLY, M. C., RAO, C., TIBBE, A. G., UHR, J. W. & TERSTAPPEN, L. W. 2004. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, 10, 6897-904.
- AMATSCHEK, S., LUCAS, R., EGER, A., PFLUEGER, M., HUNDSBERGER, H., KNOLL, C., GROSSEKRACHT, S., SCHUETT, W., KOSZIK, F., MAURER, D. & WIESNER, C. 2011. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *Br J Cancer*, 104, 469-79.
- ANANTHARAMAN, A. & FRIEDLANDER, T. W. 2015. Targeting the androgen receptor in metastatic castrate-resistant prostate cancer: A review. *Urol Oncol*.
- ANDREOPOULOU, E., YANG, L. Y., RANGEL, K. M., REUBEN, J. M., HSU, L., KRISHNAMURTHY, S., VALERO, V., FRITSCH, H. A. & CRISTOFANILLI, M. 2012. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer*, 130, 1590-7.
- ANTONARAKIS, E. S., LU, C., WANG, H., LUBER, B., NAKAZAWA, M., ROESER, J. C., CHEN, Y., MOHAMMAD, T. A., CHEN, Y., FEDOR, H. L., LOTAN, T. L., ZHENG, Q., DE MARZO, A. M., ISAACS, J. T., ISAACS, W. B., NADAL, R., PALLER, C. J., DENMEADE, S. R., CARDUCCI, M. A., EISENBERGER, M. A. & LUO, J. 2014. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 371, 1028-38.
- ARMSTRONG, A. J., MARENGO, M. S., OLTEAN, S., KEMENY, G., BITTING, R. L., TURNBULL, J. D., HEROLD, C. I., MARCOM, P. K., GEORGE, D. J. & GARCIA-BLANCO, M. A. 2011. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res*, 9, 997-1007.
- BABAYAN, A., HANNEMANN, J., SPOTTER, J., MULLER, V., PANTEL, K. & JOOSSE, S. A. 2013. Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *PLoS One*, 8, e75038.
- BACCELLI, I., SCHNEEWEISS, A., RIETHDORF, S., STENZINGER, A., SCHILLERT, A., VOGEL, V., KLEIN, C., SAINI, M., BAUERLE, T., WALLWIENER, M., HOLLAND-LETZ, T., HOFNER, T., SPRICK, M., SCHARPFF, M., MARME, F., SINN, H. P., PANTEL, K., WEICHERT, W. & TRUMPP, A. 2013. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*, 31, 539-44.
- BACCELLI, I. & TRUMPP, A. 2012. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol*, 198, 281-93.
- BARRIERE, G., RIOUALLON, A., RENAUDIE, J., TARTARY, M. & RIGAUD, M. 2012. Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer*, 12, 114.

- BARTEK, J. & LUKAS, J. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 738-47.
- BASELGA, J., CAMPONE, M., PICCART, M., BURRIS, H. A., 3RD, RUGO, H. S., SAHMOUD, T., NOGUCHI, S., GNANT, M., PRITCHARD, K. I., LEBRUN, F., BECK, J. T., ITO, Y., YARDLEY, D., DELEU, I., PEREZ, A., BACHELOT, T., VITTORI, L., XU, Z., MUKHOPADHYAY, P., LEBWOHL, D. & HORTOBAGYI, G. N. 2012. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 366, 520-9.
- BEDNARZ-KNOLL, N., ALIX-PANABIERES, C. & PANTEL, K. 2012. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev*, 31, 673-87.
- BEDNARZ, N., ELTZE, E., SEMJONOW, A., RINK, M., ANDREAS, A., MULDER, L., HANNEMANN, J., FISCH, M., PANTEL, K., WEIER, H. U., BIELAWSKI, K. P. & BRANDT, B. 2010. BRCA1 loss preexisting in small subpopulations of prostate cancer is associated with advanced disease and metastatic spread to lymph nodes and peripheral blood. *Clin Cancer Res*, 16, 3340-8.
- BERTHEAU, P., LEHMANN-CHE, J., VARNA, M., DUMAY, A., POIROT, B., PORCHER, R., TURPIN, E., PLASSA, L. F., DE ROQUANCOURT, A., BOURSTYN, E., DE CREMOUX, P., JANIN, A., GIACCHETTI, S., ESPIE, M. & DE THE, H. 2013. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast*, 22 Suppl 2, S27-9.
- BIANCHI-SMIRAGLIA, A., PAESANTE, S. & BAKIN, A. V. 2013. Integrin beta5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene*, 32, 3049-58.
- BIDARD, F. C., PEETERS, D. J., FEHM, T., NOLE, F., GISBERT-CRIADO, R., MAVROUDIS, D., GRISANTI, S., GENERALI, D., GARCIA-SAENZ, J. A., STEBBING, J., CALDAS, C., GAZZANIGA, P., MANSO, L., ZAMARCHI, R., DE LASCOITI, A. F., DE MATTOS-ARRUDA, L., IGNATIADIS, M., LEBOFKY, R., VAN LAERE, S. J., MEIER-STIEGEN, F., SANDRI, M. T., VIDAL-MARTINEZ, J., POLITAKI, E., CONSOLI, F., BOTTINI, A., DIAZ-RUBIO, E., KRELL, J., DAWSON, S. J., RAIMONDI, C., RUTTEN, A., JANNI, W., MUNZONE, E., CARANANA, V., AGELAKI, S., ALMICI, C., DIRIX, L., SOLOMAYER, E. F., ZORZINO, L., JOHANNES, H., REIS-FILHO, J. S., PANTEL, K., PIERGA, J. Y. & MICHIELS, S. 2014. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 15, 406-14.
- BISHOP, J. M. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science*, 235, 305-11.
- BLANCO, M. J., MORENO-BUENO, G., SARRIO, D., LOCASCIO, A., CANO, A., PALACIOS, J. & NIETO, M. A. 2002. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 21, 3241-6.
- BOCK, C., RACK, B., HUOBER, J., ANDERGASSEN, U., JESCHKE, U. & DOISNEAU-SIXOU, S. 2014. Distinct expression of cytokeratin, N-cadherin and CD133 in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Future Oncol*, 10, 1751-65.
- BONNOMET, A., BRYSSSE, A., TACHSIDIS, A., WALTHAM, M., THOMPSON, E. W., POLETTE, M. & GILLES, C. 2010. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 261-73.
- BOSCH-BARRERA, J. & MENENDEZ, J. A. 2015. Silibinin and STAT3: A natural way of targeting transcription factors for cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 41, 540-6.
- BOWEN, C., ZHENG, T. & GELMANN, E. P. 2015. NKX3.1 Suppresses TMPRSS2-ERG Gene Rearrangement and Mediates Repair of Androgen Receptor-Induced DNA Damage. *Cancer Res*, 75, 2686-98.
- BRABLETZ, S. & BRABLETZ, T. 2010. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep*, 11, 670-7.
- BRAGADO, P., ESTRADA, Y., PARIKH, F., KRAUSE, S., CAPOBIANCO, C., FARINA, H. G., SCHEWE, D. M. & AGUIRRE-GHISO, J. A. 2013. TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling. *Nat Cell Biol*, 15, 1351-61.

- BRAWER, M. K., BENSON, M. C., BOSTWICK, D. G., DJAVAN, B., LILJA, H., SEMJONOW, A., SU, S. & ZHOU, Z. 1999. Prostate-specific antigen and other serum markers: current concepts from the World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Semin Urol Oncol*, 17, 206-21.
- BUDD, G. T., CRISTOFANILLI, M., ELLIS, M. J., STOPECK, A., BORDEN, E., MILLER, M. C., MATERA, J., REPOLLET, M., DOYLE, G. V., TERSTAPPEN, L. W. & HAYES, D. F. 2006. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 6403-9.
- BULFONI, M., GERRATANA, L., DEL BEN, F., MARZINOTTO, S., SORRENTINO, M., TURETTA, M., SCOLES, G., TOFFOLETTO, B., ISOLA, M., BELTRAMI, C. A., DI LORETO, C., BELTRAMI, A. P., PUGLISI, F. & CESSELLI, D. 2016. In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis. *Breast Cancer Res*, 18, 30.
- BUTLER, T. P. & GULLINO, P. M. 1975. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 35, 512-6.
- CAMARA, O., KAVALLARIS, A., NOSCHEL, H., RENGESBERGER, M., JORKE, C. & PACHMANN, K. 2006. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol*, 4, 67.
- CAYREFOURCQ, L., MAZARD, T., JOOSSE, S., SOLASSOL, J., RAMOS, J., ASSEMAT, E., SCHUMACHER, U., COSTES, V., MAUDELONDE, T., PANTEL, K. & ALIX-PANABIÈRES, C. 2015. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res*, 75, 892-901.
- CELIA-TERRASSA, T., MECA-CORTES, O., MATEO, F., MARTINEZ DE PAZ, A., RUBIO, N., ARNAL-ESTAPE, A., ELL, B. J., BERMUDO, R., DIAZ, A., GUERRA-REBOLLO, M., LOZANO, J. J., ESTARAS, C., ULLOA, C., ALVAREZ-SIMON, D., MILA, J., VILELLA, R., PACIUCCI, R., MARTINEZ-BALBAS, M., DE HERREROS, A. G., GOMIS, R. R., KANG, Y., BLANCO, J., FERNANDEZ, P. L. & THOMSON, T. M. 2012. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest*, 122, 1849-68.
- CHAFFER, C. L. & WEINBERG, R. A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331, 1559-64.
- CHAO, Y. L., SHEPARD, C. R. & WELLS, A. 2010. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer*, 9, 179.
- CHEN, J. & WEISS, W. A. 2015. Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, 34, 1-14.
- CLARKE, M. F., DICK, J. E., DIRKS, P. B., EAVES, C. J., JAMIESON, C. H., JONES, D. L., VISVADER, J., WEISSMAN, I. L. & WAHL, G. M. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66, 9339-44.
- COHEN, S. J., PUNT, C. J., IANNOTTI, N., SAIDMAN, B. H., SABBATH, K. D., GABRAIL, N. Y., PICUS, J., MORSE, M., MITCHELL, E., MILLER, M. C., DOYLE, G. V., TISSING, H., TERSTAPPEN, L. W. & MEROPOL, N. J. 2008. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 3213-21.
- COHEN, S. J., PUNT, C. J., IANNOTTI, N., SAIDMAN, B. H., SABBATH, K. D., GABRAIL, N. Y., PICUS, J., MORSE, M. A., MITCHELL, E., MILLER, M. C., DOYLE, G. V., TISSING, H., TERSTAPPEN, L. W. & MEROPOL, N. J. 2009. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 20, 1223-9.
- CRISTOFANILLI, M., BUDD, G. T., ELLIS, M. J., STOPECK, A., MATERA, J., MILLER, M. C., REUBEN, J. M., DOYLE, G. V., ALLARD, W. J., TERSTAPPEN, L. W. & HAYES, D. F. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351, 781-91.

- DANILA, D. C., HELLER, G., GIGNAC, G. A., GONZALEZ-ESPINOZA, R., ANAND, A., TANAKA, E., LILJA, H., SCHWARTZ, L., LARSON, S., FLEISHER, M. & SCHER, H. I. 2007. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 7053-8.
- DASKALAKI, A., AGELAKI, S., PERRAKI, M., APOSTOLAKI, S., XENIDIS, N., STATHOPOULOS, E., KONTOPODIS, E., HATZIDAKI, D., MAVROUDIS, D. & GEORGOULIAS, V. 2009. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer*, 101, 589-97.
- DAVIS, J. W. 2009. Circulating tumor cell assays for the prognosis of prostate and colon cancers. *Expert Opin Med Diagn*, 3, 293-301.
- DAVIS, J. W., NAKANISHI, H., KUMAR, V. S., BHADKAMKAR, V. A., MCCORMACK, R., FRITSCHKE, H. A., HANDY, B., GORNET, T. & BABAIAN, R. J. 2008. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol*, 179, 2187-91; discussion 2191.
- DE BONO, J. S., SCHER, H. I., MONTGOMERY, R. B., PARKER, C., MILLER, M. C., TISSING, H., DOYLE, G. V., TERSTAPPEN, L. W., PIENTA, K. J. & RAGHAVAN, D. 2008. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 6302-9.
- DENEVE, E., RIETHDORF, S., RAMOS, J., NOCCA, D., COFFY, A., DAURES, J. P., MAUDELONDE, T., FABRE, J. M., PANTEL, K. & ALIX-PANABIERES, C. 2013. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 59, 1384-92.
- DRAVIS, C., SPIKE, B. T., HARRELL, J. C., JOHNS, C., TREJO, C. L., SOUTHARD-SMITH, E. M., PEROU, C. M. & WAHL, G. M. 2015. Sox10 Regulates Stem/Progenitor and Mesenchymal Cell States in Mammary Epithelial Cells. *Cell Rep*, 12, 2035-48.
- EGEBLAD, M. & WERB, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 161-74.
- ENGELMAN, J. A., ZEJNULLAHU, K., MITSUDOMI, T., SONG, Y., HYLAND, C., PARK, J. O., LINDEMAN, N., GALE, C. M., ZHAO, X., CHRISTENSEN, J., KOSAKA, T., HOLMES, A. J., ROGERS, A. M., CAPPUZZO, F., MOK, T., LEE, C., JOHNSON, B. E., CANTLEY, L. C. & JANNE, P. A. 2007. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 316, 1039-43.
- FEI, F., ZHANG, D., YANG, Z., WANG, S., WANG, X., WU, Z., WU, Q. & ZHANG, S. 2015. The number of polyploid giant cancer cells and epithelial-mesenchymal transition-related proteins are associated with invasion and metastasis in human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 34, 158.
- FELDING-HABERMANN, B., O'TOOLE, T. E., SMITH, J. W., FRANSVEA, E., RUGGERI, Z. M., GINSBERG, M. H., HUGHES, P. E., PAMPORI, N., SHATTIL, S. J., SAVEN, A. & MUELLER, B. M. 2001. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1853-8.
- FERNANDEZ-GARCIA, B., EIRO, N., MARIN, L., GONZALEZ-REYES, S., GONZALEZ, L. O., LAMELAS, M. L. & VIZOSO, F. J. 2014. Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology*, 64, 512-22.
- FERRARA, N. 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2, 795-803.
- FERREIRA, M. M., RAMANI, V. C. & JEFFREY, S. S. 2016. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 10, 374-94.
- FORNVIK, D., ANDERSSON, I., DUSTLER, M., EHRNSTROM, R., RYDEN, L., TINGBERG, A., ZACKRISSON, S. & AALTONEN, K. 2013. No evidence for shedding of circulating tumor cells to the peripheral venous blood as a result of mammographic breast compression. *Breast Cancer Res Treat*, 141, 187-95.
- FREEDLAND, S. J. & MOUL, J. W. 2007. Prostate specific antigen recurrence after definitive therapy. *J Urol*, 177, 1985-91.

- FRIEDL, P. & ALEXANDER, S. 2011. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 147, 992-1009.
- FRIEDL, P. & WOLF, K. 2009. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev*, 28, 129-35.
- FUMAGALLI, D., GAVIN, P. G., TANIYAMA, Y., KIM, S. I., CHOI, H. J., PAIK, S. & POGUE-GEILE, K. L. 2010. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC Cancer*, 10, 101.
- GASCH, C., BAUERNHOFER, T., PICHLER, M., LANGER-FREITAG, S., REEH, M., SEIFERT, A. M., MAUERMANN, O., IZBICKI, J. R., PANTEL, K. & RIETHDORF, S. 2013. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem*, 59, 252-60.
- GAZZANIGA, P., DE BERARDINIS, E., RAIMONDI, C., GRADILONE, A., Busetto, G. M., DE FALCO, E., NICOLAZZO, C., GIOVANNONE, R., GENTILE, V., CORTESI, E. & PANTEL, K. 2014. Circulating tumor cells detection has independent prognostic impact in high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Cancer*, 135, 1978-82.
- GHELDOLF, A., HULPIAU, P., VAN ROY, F., DE CRAENE, B. & BERX, G. 2012. Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2527-41.
- GIANCOTTI, F. G. 2013. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*, 155, 750-64.
- GIORDANO, A., GAO, H., ANFOSSI, S., COHEN, E., MEGO, M., LEE, B. N., TIN, S., DE LAURENTIIS, M., PARKER, C. A., ALVAREZ, R. H., VALERO, V., UENO, N. T., DE PLACIDO, S., MANI, S. A., ESTEVA, F. J., CRISTOFANILLI, M. & REUBEN, J. M. 2012. Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 11, 2526-34.
- GORGES, T. M. & PANTEL, K. 2013. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 62, 931-9.
- GORGES, T. M., PENKALLA, N., SCHALK, T., JOOSSE, S. A., RIETHDORF, S., TUCHOLSKI, J., LUCKE, K., WIKMAN, H., JACKSON, S., BRYCHTA, N., VON AHSEN, O., SCHUMANN, C., KRAHN, T. & PANTEL, K. 2015. Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res*, 22, 2197-206.
- GORGES, T. M., RIETHDORF, S., VON AHSEN, O., NASTALY, P., ROCK, K., BOEDE, M., PEINE, S., KUSKE, A., SCHMID, E., KNEIP, C., KONIG, F., RUDOLPH, M. & PANTEL, K. 2016. Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells - a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer. *Oncotarget*.
- GORGES, T. M., TINHOFER, I., DROSCH, M., ROSE, L., ZOLLNER, T. M., KRAHN, T. & VON AHSEN, O. 2012. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 12, 178.
- GUNASINGHE, N. P., WELLS, A., THOMPSON, E. W. & HUGO, H. J. 2012. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 31, 469-78.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANSSEN, A., WAGNER, J., GORGES, T. M., TAENZER, A., UZUNOGLU, F. G., DRIEMEL, C., STOECKLEIN, N. H., KNOEFEL, W. T., ANGENENDT, S., HAUCH, S., ATANACKOVIC, D., LOGES, S., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & WIKMAN, H. 2016. Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*, 6, 28010.

- HARB, W., FAN, A., TRAN, T., DANILA, D. C., KEYS, D., SCHWARTZ, M. & IONESCU-ZANETTI, C. 2013. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Transl Oncol*, 6, 528-38.
- HARTKOPF, A. D., BANYS, M. & FEHM, T. 2012. HER2-positive DTCs/CTCs in breast cancer. *Recent Results Cancer Res*, 195, 203-15.
- HASHIZUME, H., BALUK, P., MORIKAWA, S., MCLEAN, J. W., THURSTON, G., ROBERGE, S., JAIN, R. K. & MCDONALD, D. M. 2000. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*, 156, 1363-80.
- HAYASHI, S. I., EGUCHI, H., TANIMOTO, K., YOSHIDA, T., OMOTO, Y., INOUE, A., YOSHIDA, N. & YAMAGUCHI, Y. 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer*, 10, 193-202.
- HAYES, D. F., CRISTOFANILLI, M., BUDD, G. T., ELLIS, M. J., STOPECK, A., MILLER, M. C., MATERA, J., ALLARD, W. J., DOYLE, G. V. & TERSTAPPEN, L. W. 2006. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*, 12, 4218-24.
- HAZAN, R. B., PHILLIPS, G. R., QIAO, R. F., NORTON, L. & AARONSON, S. A. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*, 148, 779-90.
- HE, W., KULARATNE, S. A., KALLI, K. R., PRENDERGAST, F. G., AMATO, R. J., KLEE, G. G., HARTMANN, L. C. & LOW, P. S. 2008. Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands. *Int J Cancer*, 123, 1968-73.
- HEITZER, E., AUER, M., GASCH, C., PICHLER, M., ULZ, P., HOFFMANN, E. M., LAX, S., WALDISPUEHL-GEIGL, J., MAUERMANN, O., LACKNER, C., HOFLE, G., EISNER, F., SILL, H., SAMONIGG, H., PANTEL, K., RIETHDORF, S., BAUERNHOFER, T., GEIGL, J. B. & SPEICHER, M. R. 2013. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res*, 73, 2965-75.
- HELLYER, N. J., CHENG, K. & KOLAND, J. G. 1998. ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*, 333 (Pt 3), 757-63.
- HIRANO, F., KANEKO, K., TAMURA, H., DONG, H., WANG, S., ICHIKAWA, M., RIETZ, C., FLIES, D. B., LAU, J. S., ZHU, G., TAMADA, K. & CHEN, L. 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*, 65, 1089-96.
- HIRATSUKA, S., GOEL, S., KAMOUN, W. S., MARU, Y., FUKUMURA, D., DUDA, D. G. & JAIN, R. K. 2011. Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 3725-30.
- HODGKINSON, C. L., MORROW, C. J., LI, Y., METCALF, R. L., ROTHWELL, D. G., TRAPANI, F., POLANSKI, R., BURT, D. J., SIMPSON, K. L., MORRIS, K., PEPPER, S. D., NONAKA, D., GREYSTOKE, A., KELLY, P., BOLA, B., KREBS, M. G., ANTONELLO, J., AYUB, M., FAULKNER, S., PRIEST, L., CARTER, L., TATE, C., MILLER, C. J., BLACKHALL, F., BRADY, G. & DIVE, C. 2014. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med*, 20, 897-903.
- HOFMAN, V., ILIE, M. I., LONG, E., SELVA, E., BONNETAUD, C., MOLINA, T., VENISSAC, N., MOUROUX, J., VIELH, P. & HOFMAN, P. 2011. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*, 129, 1651-60.
- HOU, J. M., KREBS, M. G., LANCASHIRE, L., SLOANE, R., BACKEN, A., SWAIN, R. K., PRIEST, L. J., GREYSTOKE, A., ZHOU, C., MORRIS, K., WARD, T., BLACKHALL, F. H. & DIVE, C. 2012. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 30, 525-32.

- HULIT, J., SUYAMA, K., CHUNG, S., KEREN, R., AGIOSTRATIDOU, G., SHAN, W., DONG, X., WILLIAMS, T. M., LISANTI, M. P., KNUDSEN, K. & HAZAN, R. B. 2007. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res*, 67, 3106-16.
- HVICHIA, G. E., PARVEEN, Z., WAGNER, C., JANNING, M., QUIDDE, J., STEIN, A., MULLER, V., LOGES, S., NEVES, R. P., STOECKLEIN, N. H., WIKMAN, H., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & GORGES, T. M. 2016a. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer*, 138, 2894-904.
- HVICHIA, G. E., PARVEEN, Z., WAGNER, C., JANNING, M., QUIDDE, J., STEIN, A., MULLER, V., LOGES, S., NEVES, R. P., STOECKLEIN, N. H., WIKMAN, H., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & GORGES, T. M. 2016b. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer*.
- HYNES, N. E. & LANE, H. A. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5, 341-54.
- IGNATIADIS, M., RACK, B., ROTHE, F., RIETHDORF, S., DECRAENE, C., BONNEFOI, H., DITTRICH, C., MESSINA, C., BEAUVOIS, M., TRAPP, E., GOULIOTI, T., TRYFONIDIS, K., PANTEL, K., REPOLLET, M., JANNI, W., PICCART, M., SOTIRIOU, C., LITIERE, S. & PIERGA, J. Y. 2016. Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *Eur J Cancer*, 63, 97-104.
- IGNATIADIS, M., ROTHE, F., CHABOTEAUX, C., DURBECQ, V., ROUAS, G., CRISCITIELLO, C., METALLO, J., KHEDDOUMI, N., SINGHAL, S. K., MICHIELS, S., VEYS, I., ROSSARI, J., LARSIMONT, D., CARLY, B., PESTRIN, M., BESSI, S., BUXANT, F., LIEBENS, F., PICCART, M. & SOTIRIOU, C. 2011. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One*, 6, e15624.
- ITO, S., NAKANISHI, H., IKEHARA, Y., KATO, T., KASAI, Y., ITO, K., AKIYAMA, S., NAKAO, A. & TATEMATSU, M. 2001. Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int J Cancer*, 93, 212-7.
- JAGGUPILLI, A. & ELKORD, E. 2012. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*, 2012, 708036.
- JOHNSTON, S. R. 2015. Enhancing Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: Cotargeting Signaling Pathways. *J Natl Cancer Inst*, 107.
- JOOSSE, S. A., GORGES, T. M. & PANTEL, K. 2015. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*, 7, 1-11.
- JOOSSE, S. A., HANNEMANN, J., SPOTTER, J., BAUCHE, A., ANDREAS, A., MULLER, V. & PANTEL, K. 2012. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*, 18, 993-1003.
- JOOSSE, S. A. & PANTEL, K. 2013. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*, 73, 8-11.
- JUNG, S., PANCHALINGAM, K. M., ROSENBERG, L. & BEHIE, L. A. 2012. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells Int*, 2012, 123030.
- KABSCH, W. & SANDER, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22, 2577-637.
- KANG, Y. & PANTEL, K. 2013. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*, 23, 573-81.
- KAO, J., SALARI, K., BOCANEGRA, M., CHOI, Y. L., GIRARD, L., GANDHI, J., KWEI, K. A., HERNANDEZ-BOUSSARD, T., WANG, P., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D. & POLLACK, J. R. 2009. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*, 4, e6146.

- KAPLAN, R. N., RIBA, R. D., ZACHAROULIS, S., BRAMLEY, A. H., VINCENT, L., COSTA, C., MACDONALD, D. D., JIN, D. K., SHIDO, K., KERNS, S. A., ZHU, Z., HICKLIN, D., WU, Y., PORT, J. L., ALTORKI, N., PORT, E. R., RUGGERO, D., SHMELKOV, S. V., JENSEN, K. K., RAFII, S. & LYDEN, D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438, 820-7.
- KARAPETIS, C. S., KHAMBATA-FORD, S., JONKER, D. J., O'CALLAGHAN, C. J., TU, D., TEBBUTT, N. C., SIMES, R. J., CHALCHAL, H., SHAPIRO, J. D., ROBITAILLE, S., PRICE, T. J., SHEPHERD, L., AU, H. J., LANGER, C., MOORE, M. J. & ZALCBERG, J. R. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, 359, 1757-65.
- KASIMIR-BAUER, S., HOFFMANN, O., WALLWIENER, D., KIMMIG, R. & FEHM, T. 2012. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*, 14, R15.
- KASTAN, M. B. & BERKOVICH, E. 2007. p53: a two-faced cancer gene. *Nat Cell Biol*, 9, 489-91.
- KENNECKE, H., YERUSHALMI, R., WOODS, R., CHEANG, M. C., VODUC, D., SPEERS, C. H., NIELSEN, T. O. & GELMON, K. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*, 28, 3271-7.
- KIM, H. H., VIJAPURKAR, U., HELLYER, N. J., BRAVO, D. & KOLAND, J. G. 1998. Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J*, 334 (Pt 1), 189-95.
- KISHI, S., BAYLISS, P. E. & HANAI, J. 2015. A prospective epigenetic paradigm between cellular senescence and epithelial-mesenchymal transition in organismal development and aging. *Transl Res*, 165, 241-9.
- KNUDSON, A. G., JR. 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, 45, 1437-43.
- KOBAYASHI, A., OKUDA, H., XING, F., PANDEY, P. R., WATABE, M., HIROTA, S., PAI, S. K., LIU, W., FUKUDA, K., CHAMBERS, C., WILBER, A. & WATABE, K. 2011. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med*, 208, 2641-55.
- KOLLERMANN, J., WEIKERT, S., SCHOSTAK, M., KEMPKENSTEFFEN, C., KLEINSCHMIDT, K., RAU, T. & PANTEL, K. 2008. Prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment. *J Clin Oncol*, 26, 4928-33.
- KORPAL, M., ELL, B. J., BUFFA, F. M., IBRAHIM, T., BLANCO, M. A., CELIA-TERRASSA, T., MERCATALI, L., KHAN, Z., GOODARZI, H., HUA, Y., WEI, Y., HU, G., GARCIA, B. A., RAGOSSIS, J., AMADORI, D., HARRIS, A. L. & KANG, Y. 2011. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med*, 17, 1101-8.
- KRANTZ, S. B., SHIELDS, M. A., DANGI-GARIMELLA, S., MUNSHI, H. G. & BENTREM, D. J. 2012. Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression. *J Surg Res*, 173, 105-12.
- KREBS, M. G., SLOANE, R., PRIEST, L., LANCASHIRE, L., HOU, J. M., GREYSTOKE, A., WARD, T. H., FERRALDESCHI, R., HUGHES, A., CLACK, G., RANSON, M., DIVE, C. & BLACKHALL, F. H. 2011. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 29, 1556-63.
- KRISTENSEN, T. B., KNUTSSON, M. L., WEHLAND, M., LAURSEN, B. E., GRIMM, D., WARNKE, E. & MAGNUSSON, N. E. 2014. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in breast cancer. *Int J Mol Sci*, 15, 23024-41.
- KUNIYASU, H., OUE, N., NAKAE, D., TSUTSUMI, M., DENDA, A., TSUJIUCHI, T., YOKOZAKI, H. & YASUI, W. 2001. Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells. *Pathobiology*, 69, 86-95.
- LEE, H. J., CHOE, G., JHEON, S., SUNG, S. W., LEE, C. T. & CHUNG, J. H. 2010. CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a

- retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. *J Thorac Oncol*, 5, 649-57.
- LIU, S., CONG, Y., WANG, D., SUN, Y., DENG, L., LIU, Y., MARTIN-TREVINO, R., SHANG, L., MCDERMOTT, S. P., LANDIS, M. D., HONG, S., ADAMS, A., D'ANGELO, R., GINESTIER, C., CHARAFE-JAUFFRET, E., CLOUTHIER, S. G., BIRNBAUM, D., WONG, S. T., ZHAN, M., CHANG, J. C. & WICHA, M. S. 2014. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*, 2, 78-91.
- LOH, J., JOVANOVIC, L., LEHMAN, M., CAPP, A., PRYOR, D., HARRIS, M., NELSON, C. & MARTIN, J. 2014. Circulating tumor cell detection in high-risk non-metastatic prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 2157-62.
- LONNING, P. E. & EIKESDAL, H. P. 2013. Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved. *Endocr Relat Cancer*, 20, R183-201.
- LOPICCOLO, J., BLUMENTHAL, G. M., BERNSTEIN, W. B. & DENNIS, P. A. 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, 11, 32-50.
- LORENTE, D., OLMOS, D., MATEO, J., BIANCHINI, D., SEED, G., FLEISHER, M., DANILA, D. C., FLOHR, P., CRESPO, M., FIGUEIREDO, I., MIRANDA, S., BAETEN, K., MOLINA, A., KHEOH, T., MCCORMACK, R., TERSTAPPEN, L. W., SCHER, H. I. & DE BONO, J. S. 2016. Decline in Circulating Tumor Cell Count and Treatment Outcome in Advanced Prostate Cancer. *Eur Urol*.
- LU, J., FAN, T., ZHAO, Q., ZENG, W., ZASLAVSKY, E., CHEN, J. J., FROHMAN, M. A., GOLIGHTLY, M. G., MADAJEWICZ, S. & CHEN, W. T. 2010. Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int J Cancer*, 126, 669-83.
- LUCCI, A., HALL, C. S., LODHI, A. K., BHATTACHARYYA, A., ANDERSON, A. E., XIAO, L., BEDROSIAN, I., KUERER, H. M. & KRISHNAMURTHY, S. 2012. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol*, 13, 688-95.
- MAHESWARAN, S., SEQUIST, L. V., NAGRATH, S., ULKUS, L., BRANNIGAN, B., COLLURA, C. V., INSERRA, E., DIEDERICH, S., IAFRATE, A. J., BELL, D. W., DIGUMARTHY, S., MUZIKANSKY, A., IRIMIA, D., SETTLEMAN, J., TOMPKINS, R. G., LYNCH, T. J., TONER, M. & HABER, D. A. 2008. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*, 359, 366-77.
- MAKI, C. G. & HOWLEY, P. M. 1997. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol*, 17, 355-63.
- MANI, S. A., GUO, W., LIAO, M. J., EATON, E. N., AYYANAN, A., ZHOU, A. Y., BROOKS, M., REINHARD, F., ZHANG, C. C., SHIPITSIN, M., CAMPBELL, L. L., POLYAK, K., BRISKEN, C., YANG, J. & WEINBERG, R. A. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-15.
- MARRINUCCI, D., BETHEL, K., KOLATKAR, A., LUTTGEN, M. S., MALCHIODI, M., BAEHRING, F., VOIGT, K., LAZAR, D., NIEVA, J., BAZHENOVA, L., KO, A. H., KORN, W. M., SCHRAM, E., COWARD, M., YANG, X., METZNER, T., LAMY, R., HONNATTI, M., YOSHIOKA, C., KUNKEN, J., PETROVA, Y., SOK, D., NELSON, D. & KUHN, P. 2012. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol*, 9, 016003.
- MATZKE, M. A., METTE, M. F., KANNO, T. & MATZKE, A. J. 2003. Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer? *Trends Genet*, 19, 253-6.
- MEHES, G., WITT, A., KUBISTA, E. & AMBROS, P. F. 2001. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol*, 159, 17-20.
- MEHNER, C., MILLER, E., NASSAR, A., BAMLET, W. R., RADISKY, E. S. & RADISKY, D. C. 2015. Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma. *Genes Cancer*, 6, 480-9.

- MENG, S., TRIPATHY, D., FRENKEL, E. P., SHETE, S., NAFTALIS, E. Z., HUTH, J. F., BEITSCH, P. D., LEITCH, M., HOOVER, S., EUHUS, D., HALEY, B., MORRISON, L., FLEMING, T. P., HERLYN, D., TERSTAPPEN, L. W., FEHM, T., TUCKER, T. F., LANE, N., WANG, J. & UHR, J. W. 2004. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10, 8152-62.
- MIKOLAJCZYK, S. D., MILLAR, L. S., TSINBERG, P., COUTTS, S. M., ZOMORRODI, M., PHAM, T., BISCHOFF, F. Z. & PIRCHER, T. J. 2011. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol*, 2011, 252361.
- MITCHELL, M. J. & KING, M. R. 2013. Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress. *Front Oncol*, 3, 44.
- MITRA, A., JAMESON, C., BARBACHANO, Y., SANCHEZ, L., KOTE-JARAI, Z., PEOCK, S., SODHA, N., BANCROFT, E., FLETCHER, A., COOPER, C., EASTON, D., EELES, R. & FOSTER, C. S. 2009. Overexpression of RAD51 occurs in aggressive prostatic cancer. *Histopathology*, 55, 696-704.
- MITRA, A., MISHRA, L. & LI, S. 2015. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*, 6, 10697-711.
- MORIKAWA, S., BALUK, P., KAIDOH, T., HASKELL, A., JAIN, R. K. & MCDONALD, D. M. 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*, 160, 985-1000.
- MORROW, C. J., TRAPANI, F., METCALF, R. L., BERTOLINI, G., HODGKINSON, C. L., KHANDELWAL, G., KELLY, P., GALVIN, M., CARTER, L., SIMPSON, K. L., WILLIAMSON, S., WIRTH, C., SIMMS, N., FRANKLILN, L., FRESE, K. K., ROTHWELL, D. G., NONAKA, D., MILLER, C. J., BRADY, G., BLACKHALL, F. H. & DIVE, C. 2016. Tumourigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study. *Ann Oncol*, 27, 1155-60.
- MUKAIDA, N., SASAKI, S. & BABA, T. 2015. ID: 33: CCL4 can promote bone metastasis of a murine breast cancer cell line, by interacting CCR5-expressing non-tumor cells in bone marrow. *Cytokine*, 76, 70.
- MUNIYAN, S., CHEN, S. J., LIN, F. F., WANG, Z., MEHTA, P. P., BATRA, S. K. & LIN, M. F. 2015. ErbB-2 signaling plays a critical role in regulating androgen-sensitive and castration-resistant androgen receptor-positive prostate cancer cells. *Cell Signal*, 27, 2261-71.
- MUNOZ, M., HENDERSON, M., HABER, M. & NORRIS, M. 2007. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*, 59, 752-7.
- NAGARAJ, G. & MA, C. 2015. Revisiting the estrogen receptor pathway and its role in endocrine therapy for postmenopausal women with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 150, 231-42.
- NAIDU, R., YADAV, M., NAIR, S. & KUTTY, M. K. 1998. Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer*, 78, 1385-90.
- NAKOPOULOU, L., TSIRMPA, I., ALEXANDROU, P., LOUVROU, A., AMPELA, C., MARKAKI, S. & DAVARIS, P. S. 2003. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat*, 77, 145-55.
- NIGG, E. A. 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*, 2, 815-25.
- NOMAN, M. Z., MESSAI, Y., MURET, J., HASMIM, M. & CHOUAIB, S. 2014. Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 7, 153-60.
- OCANA, O. H., CORCOLES, R., FABRA, A., MORENO-BUENO, G., ACLOQUE, H., VEGA, S., BARRALLO-GIMENO, A., CANO, A. & NIETO, M. A. 2012. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22, 709-24.
- OH, S. J., JUNG, J. Y., SHIM, S. S., IM, M. Y., KIM, H. D., CHUNG, S. Y. & YOON, J. H. 2000. Identification of p53 gene mutations in breast cancers and their effects on transcriptional activation function. *Mol Cells*, 10, 275-80.

- OKADA, N., KITANO, Y. & ICHIHARA, K. 1982. Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. *J Invest Dermatol*, 79, 42-7.
- OKEGAWA, T., ITAYA, N., HARA, H., TAMBO, M. & NUTAHARA, K. 2014. Circulating tumor cells as a biomarker predictive of sensitivity to docetaxel chemotherapy in patients with castration-resistant prostate cancer. *Anticancer Res*, 34, 6705-10.
- OLIVIER, M., EELES, R., HOLLSTEIN, M., KHAN, M. A., HARRIS, C. C. & HAINAUT, P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19, 607-14.
- OSBORNE, C. K. & SCHIFF, R. 2011. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*, 62, 233-47.
- OZKUMUR, E., SHAH, A. M., CICILIANO, J. C., EMMINK, B. L., MIYAMOTO, D. T., BRACHTEL, E., YU, M., CHEN, P. I., MORGAN, B., TRAUTWEIN, J., KIMURA, A., SENGUPTA, S., STOTT, S. L., KARABACAK, N. M., BARBER, T. A., WALSH, J. R., SMITH, K., SPUHLER, P. S., SULLIVAN, J. P., LEE, R. J., TING, D. T., LUO, X., SHAW, A. T., BARDIA, A., SEQUIST, L. V., LOUIS, D. N., MAHESWARAN, S., KAPUR, R., HABER, D. A. & TONER, M. 2013. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*, 5, 179ra47.
- PAL, S. K., HE, M., WILSON, T., LIU, X., ZHANG, K., CARMICHAEL, C., TORRES, A., HERNANDEZ, S., LAU, C., AGARWAL, N., KAWACHI, M., YEN, Y. & JONES, J. O. 2015. Detection and phenotyping of circulating tumor cells in high-risk localized prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 13, 130-6.
- PANTEL, K. & ALIX-PANABIERES, C. 2013. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res*, 73, 6384-8.
- PARK, D., KARESEN, R., AXCRONA, U., NOREN, T. & SAUER, T. 2007. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *APMIS*, 115, 52-65.
- PECOT, C. V., BISCHOFF, F. Z., MAYER, J. A., WONG, K. L., PHAM, T., BOTTSFORD-MILLER, J., STONE, R. L., LIN, Y. G., JALADURGAM, P., ROH, J. W., GOODMAN, B. W., MERRITT, W. M., PIRCHER, T. J., MIKOLAJCZYK, S. D., NICK, A. M., CELESTINO, J., ENG, C., ELLIS, L. M., DEEVERS, M. T. & SOOD, A. K. 2011. A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov*, 1, 580-6.
- PEINADO, H., OLMEDA, D. & CANO, A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7, 415-28.
- PEREZ-NADALES, E. & LLOYD, A. C. 2004. Essential function for ErbB3 in breast cancer proliferation. *Breast Cancer Res*, 6, 137-9.
- PIROZZI, G., TIRINO, V., CAMERLINGO, R., LA ROCCA, A., MARTUCCI, N., SCOGNAMIGLIO, G., FRANCO, R., CANTILE, M., NORMANNO, N. & ROCCO, G. 2013. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer. *Oncol Rep*, 29, 1763-8.
- POURMAND, G., ZIAEE, A. A., ABEDI, A. R., MEHRSAI, A., ALAVI, H. A., AHMADI, A. & SAADATI, H. R. 2007. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol J*, 4, 95-100.
- POWELL, A. A., TALASAZ, A. H., ZHANG, H., CORAM, M. A., REDDY, A., DENG, G., TELLI, M. L., ADVANI, R. H., CARLSON, R. W., MOLLICK, J. A., SHETH, S., KURIAN, A. W., FORD, J. M., STOCKDALE, F. E., QUAKE, S. R., PEASE, R. F., MINDRINOS, M. N., BHANOT, G., DAIRKEE, S. H., DAVIS, R. W. & JEFFREY, S. S. 2012. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One*, 7, e33788.
- PUTZ, E., WITTER, K., OFFNER, S., STOSIEK, P., ZIPPELIUS, A., JOHNSON, J., ZAHN, R., RIETHMULLER, G. & PANTEL, K. 1999. Phenotypic characteristics of cell lines derived

- from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res*, 59, 241-8.
- RACK, B., ANDERGASSEN, U., NEUGEBAUER, J., SALMEN, J., HEPP, P., SOMMER, H., LICHTENEGGER, W., FRIESE, K., BECKMANN, M. W., HAUNER, D., HAUNER, H. & JANNI, W. 2010. The German SUCCESS C Study - The First European Lifestyle Study on Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 5, 395-400.
- RACK, B., SCHINDLBECK, C., ANDERGASSEN, U., LORENZ, R., ZWINGERS, T., SCHNEEWEISS, A., LICHTENEGGER, W., BECKMANN, M. W., SOMMER, H., PANTEL, K., FRIESE, K. & JANNI, W. 2020. Use of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCESS Trial 7. *Clin Oncol*, 28.
- RACK, B., SCHINDLBECK, C., JUCKSTOCK, J., ANDERGASSEN, U., HEPP, P., ZWINGERS, T., FRIEDL, T. W., LORENZ, R., TESCH, H., FASCHING, P. A., FEHM, T., SCHNEEWEISS, A., LICHTENEGGER, W., BECKMANN, M. W., FRIESE, K., PANTEL, K., JANNI, W. & GROUP, S. S. 2014. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 106.
- RAMIREZ, J. M., FEHM, T., ORSINI, M., CAYREFOURCO, L., MAUDELONDE, T., PANTEL, K. & ALIX-PANABIERES, C. 2014. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem*, 60, 214-21.
- RESEL FOLKERSMA, L., SAN JOSE MANSO, L., GALANTE ROMO, I., MORENO SIERRA, J. & OLIVIER GOMEZ, C. 2012. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urology*, 80, 1328-32.
- REYMOND, N., D'AGUA, B. B. & RIDLEY, A. J. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*, 13, 858-70.
- RHIM, A. D., MIREK, E. T., AIELLO, N. M., MAITRA, A., BAILEY, J. M., MCALLISTER, F., REICHERT, M., BEATTY, G. L., RUSTGI, A. K., VONDERHEIDE, R. H., LEACH, S. D. & STANGER, B. Z. 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148, 349-61.
- RIETHDORF, S., FRITSCH, H., MULLER, V., RAU, T., SCHINDLBECK, C., RACK, B., JANNI, W., COITH, C., BECK, K., JANICKE, F., JACKSON, S., GORNET, T., CRISTOFANILLI, M. & PANTEL, K. 2007. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*, 13, 920-8.
- RIETHDORF, S., MULLER, V., ZHANG, L., RAU, T., LOIBL, S., KOMOR, M., ROLLER, M., HUOBER, J., FEHM, T., SCHRADER, I., HILFRICH, J., HOLMS, F., TESCH, H., EIDTMANN, H., UNTCH, M., VON MINCKWITZ, G. & PANTEL, K. 2010. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res*, 16, 2634-45.
- RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P. & LEVINE, A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 402-12.
- RINK, M., CHUN, F. K., MINNER, S., FRIEDRICH, M., MAUERMAN, O., HEINZER, H., HULAND, H., FISCH, M., PANTEL, K. & RIETHDORF, S. 2011. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int*, 107, 1668-75.
- ROSSI, E., BASSO, U., CELADIN, R., ZILIO, F., PUCCIARELLI, S., AIETA, M., BARILE, C., SAVA, T., BONCIARELLI, G., TUMOLO, S., GHIOTTO, C., MAGRO, C., JIRILLO, A., INDRACCOLO, S., AMADORI, A. & ZAMARCHI, R. 2010. M30 neoepitope expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis. *Clin Cancer Res*, 16, 5233-43.
- ROSSI, E., RUGGE, M., FACCHINETTI, A., PIZZI, M., NARDO, G., BARBIERI, V., MANICONE, M., DE FAVERI, S., CHIARA SCAINI, M., BASSO, U., AMADORI, A. & ZAMARCHI, R. 2014. Retaining the long-survive capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs) followed by xenotransplantation: not only from metastatic cancer of the breast but also of prostate cancer patients. *Oncoscience*, 1, 49-56.

- SAAD, F. & PANTEL, K. 2012. The current role of circulating tumor cells in the diagnosis and management of bone metastases in advanced prostate cancer. *Future Oncol*, 8, 321-31.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SATELLI, A., BROWNLEE, Z., MITRA, A., MENG, Q. H. & LI, S. 2015. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin Chem*, 61, 259-66.
- SAUCEDO-ZENI, N., MEWES, S., NIESTROJ, R., GASIOROWSKI, L., MURAWA, D., NOWACZYK, P., TOMASI, T., WEBER, E., DWORACKI, G., MORGENTHALER, N. G., JANSEN, H., PROPPING, C., STERZYNSKA, K., DYSZKIEWICZ, W., ZABEL, M., KIECHLE, M., REUNING, U., SCHMITT, M. & LUCKE, K. 2012. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*, 41, 1241-50.
- SAVAGNER, P., YAMADA, K. M. & THIERY, J. P. 1997. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 137, 1403-19.
- SCHEEL, C., EATON, E. N., LI, S. H., CHAFFER, C. L., REINHARDT, F., KAH, K. J., BELL, G., GUO, W., RUBIN, J., RICHARDSON, A. L. & WEINBERG, R. A. 2011. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*, 145, 926-40.
- SCHER, H. I., HELLER, G., MOLINA, A., ATTARD, G., DANILA, D. C., JIA, X., PENG, W., SANDHU, S. K., OLMOS, D., RIISNAES, R., MCCORMACK, R., BURZYKOWSKI, T., KHEOH, T., FLEISHER, M., BUYSE, M. & DE BONO, J. S. 2015. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 33, 1348-55.
- SCHER, H. I., JIA, X., DE BONO, J. S., FLEISHER, M., PIENTA, K. J., RAGHAVAN, D. & HELLER, G. 2009. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol*, 10, 233-9.
- SCHER, H. I., MORRIS, M. J., BASCH, E. & HELLER, G. 2011. End points and outcomes in castration-resistant prostate cancer: from clinical trials to clinical practice. *J Clin Oncol*, 29, 3695-704.
- SCHNECK, H., GIERKE, B., UPPENKAMP, F., BEHRENS, B., NIEDERACHER, D., STOECKLEIN, N. H., TEMPLIN, M. F., PAWLAK, M., FEHM, T., NEUBAUER, H. & DISSEMINATED CANCER CELL NETWORK, D. 2015. EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS One*, 10, e0144535.
- SCHRAMM, A., FRIEDL, T. W., SCHOCHTER, F., SCHOLZ, C., DE GREGORIO, N., HUOBER, J., RACK, B., TRAPP, E., ALUNNI-FABBRONI, M., MULLER, V., SCHNEEWEISS, A., PANTEL, K., MEIER-STIEGEN, F., HARTKOPF, A., TARAN, F. A., WALLWIENER, D., JANNI, W. & FEHM, T. 2016. Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program. *Arch Gynecol Obstet*, 293, 271-81.
- SCHREIBER, R. D., OLD, L. J. & SMYTH, M. J. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565-70.
- SCORILAS, A., KARAMERIS, A., ARNOGIANNAKI, N., ARDAVANIS, A., BASSILOPOULOS, P., TRANGAS, T. & TALIERI, M. 2001. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer*, 84, 1488-96.
- SERRANO, M. J., ORTEGA, F. G., ALVAREZ-CUBERO, M. J., NADAL, R., SANCHEZ-ROVIRA, P., SALIDO, M., RODRIGUEZ, M., GARCIA-PUCHE, J. L., DELGADO-RODRIGUEZ, M., SOLE, F., GARCIA, M. A., PERAN, M., ROSELL, R., MARCHAL, J. A. & LORENTE, J. A. 2014. EMT and EGFR in CTCs cyokeratin negative non-metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 5, 7486-97.

- SHAO, S., ZHAO, X., ZHANG, X., LUO, M., ZUO, X., HUANG, S., WANG, Y., GU, S. & ZHAO, X. 2015. Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Mol Cancer*, 14, 28.
- SHEVDE, L. A., DAS, S., CLARK, D. W. & SAMANT, R. S. 2010. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr Mol Med*, 10, 71-81.
- SHIH, K., ARKENAU, H. T. & INFANTE, J. R. 2014. Clinical impact of checkpoint inhibitors as novel cancer therapies. *Drugs*, 74, 1993-2013.
- SIEUWERTS, A. M., KRAAN, J., BOLT, J., VAN DER SPOEL, P., ELSTRODT, F., SCHUTTE, M., MARTENS, J. W., GRATAMA, J. W., SLEIJFER, S. & FOEKENS, J. A. 2009. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 101, 61-6.
- SMIRNOV, D. A., ZWEITZIG, D. R., FOULK, B. W., MILLER, M. C., DOYLE, G. V., PIENTA, K. J., MEROPOL, N. J., WEINER, L. M., COHEN, S. J., MORENO, J. G., CONNELLY, M. C., TERSTAPPEN, L. W. & O'HARA, S. M. 2005. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res*, 65, 4993-7.
- SOBEL, R. E. & SADAR, M. D. 2005. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol*, 173, 342-59.
- SOLAKOGLU, O., MAIERHOFER, C., LAHR, G., BREIT, E., SCHEUNEMANN, P., HEUMOS, I., PICHLMEIER, U., SCHLIMOK, G., OBERNEDER, R., KOLLERMANN, M. W., KOLLERMANN, J., SPEICHER, M. R. & PANTEL, K. 2002. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2246-51.
- SPIZZO, G., FONG, D., WURM, M., ENSINGER, C., OBRIST, P., HOFER, C., MAZZOLENI, G., GASTL, G. & WENT, P. 2011. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*, 64, 415-20.
- STATHOPOULOU, A., ANGELOPOULOU, K., PERRAKI, M., GEORGOULIAS, V., MALAMOS, N. & LIANIDOU, E. 2001. Quantitative RT-PCR luminometric hybridization assay with an RNA internal standard for cytokeratin-19 mRNA in peripheral blood of patients with breast cancer. *Clin Biochem*, 34, 651-9.
- STATHOPOULOU, A., GIZI, A., PERRAKI, M., APOSTOLAKI, S., MALAMOS, N., MAVROUDIS, D., GEORGOULIAS, V. & LIANIDOU, E. S. 2003. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res*, 9, 5145-51.
- STORCHOVA, Z. & PELLMAN, D. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 45-54.
- STRATI, A., KASIMIR-BAUER, S., MARKOU, A., PARISI, C. & LIANIDOU, E. S. 2013. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 15, R20.
- SUDA, T. & DEXTER, T. M. 1981. Effect of hydrocortisone on long-term human marrow cultures. *Br J Haematol*, 48, 661-4.
- TAM, W. L. & WEINBERG, R. A. 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*, 19, 1438-49.
- TAUBE, J. H., HERSCHKOWITZ, J. I., KOMUROV, K., ZHOU, A. Y., GUPTA, S., YANG, J., HARTWELL, K., ONDER, T. T., GUPTA, P. B., EVANS, K. W., HOLLIER, B. G., RAM, P. T., LANDER, E. S., ROSEN, J. M., WEINBERG, R. A. & MANI, S. A. 2010. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15449-54.
- TEWES, M., AKTAS, B., WELT, A., MUELLER, S., HAUCH, S., KIMMIG, R. & KASIMIR-BAUER, S. 2009. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat*, 115, 581-90.

- THALGOTT, M., RACK, B., HORN, T., HECK, M. M., EIBER, M., KUBLER, H., RETZ, M., GSCHWEND, J. E., ANDERGASSEN, U. & NAWROTH, R. 2015. Detection of Circulating Tumor Cells in Locally Advanced High-risk Prostate Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Prostatectomy. *Anticancer Res*, 35, 5679-85.
- THALGOTT, M., RACK, B., MAURER, T., SOUVATZOGLOU, M., EIBER, M., KRESS, V., HECK, M. M., ANDERGASSEN, U., NAWROTH, R., GSCHWEND, J. E. & RETZ, M. 2013. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139, 755-63.
- THEIL, G., FISCHER, K., WEBER, E., MEDEK, R., HODA, R., LUCKE, K. & FORNARA, P. 2016. The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes - A Proof-of-Concept Study. *PLoS One*, 11, e0158354.
- THIERY, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-54.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- UEO, H., SUGIMACHI, K., GORGES, T. M., BARTKOWIAK, K., YOKOBORI, T., MULLER, V., SHINDEN, Y., UEDA, M., UEO, H., MORI, M., KUWANO, H., MAEHARA, Y., OHNO, S., PANTEL, K. & MIMORI, K. 2015. Circulating tumour cell-derived platin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 112, 1519-26.
- UHR, J. W. & PANTEL, K. 2011. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 12396-400.
- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M. & ROZEN, S. G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40, e115.
- VAIOPOULOS, A. G., KOSTAKIS, I. D., GKIOKA, E., ATHANASOULA, K., PIKOULIS, E., PAPALAMBROS, A., CHRISTOPOULOS, P., GOGAS, H., KOURAKLIS, G. & KOUTSILIERIS, M. 2014. Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res*, 34, 3083-92.
- VAN DE STOLPE, A., PANTEL, K., SLEIJFER, S., TERSTAPPEN, L. W. & DEN TOONDER, J. M. 2011. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res*, 71, 5955-60.
- VAN LEENDERS, G. J., AALDERS, T. W., HULSBERGEN-VAN DE KAA, C. A., RUITER, D. J. & SCHALKEN, J. A. 2001. Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines. *J Pathol*, 195, 563-70.
- VISVADER, J. E. & LINDEMAN, G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8, 755-68.
- VLIETSTRA, R. J., VAN ALEWIJK, D. C., HERMANS, K. G., VAN STEENBRUGGE, G. J. & TRAPMAN, J. 1998. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res*, 58, 2720-3.
- WEINBERG, R. A. 1985. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science*, 230, 770-6.
- WEITZ, J., KIENLE, P., LACROIX, J., WILLEKE, F., BENNER, A., LEHNERT, T., HERFARTH, C. & VON KNEBEL DOEBERITZ, M. 1998. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 4, 343-8.
- WELLNER, U., SCHUBERT, J., BURK, U. C., SCHMALHOFER, O., ZHU, F., SONNTAG, A., WALDVOGEL, B., VANNIER, C., DARLING, D., ZUR HAUSEN, A., BRUNTON, V. G., MORTON, J., SANSOM, O., SCHULER, J., STEMMLER, M. P., HERZBERGER, C., HOPT, U., KECK, T., BRABLETZ, S. & BRABLETZ, T. 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*, 11, 1487-95.
- WELTI, J., LOGES, S., DIMMELER, S. & CARMELIET, P. 2013. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*, 123, 3190-200.

- WELTI, J., RODRIGUES, D. N., SHARP, A., SUN, S., LORENTE, D., RIISNAES, R., FIGUEIREDO, I., ZAFEIRIOU, Z., RESCIGNO, P., DE BONO, J. S. & PLYMATE, S. R. 2016. Analytical Validation and Clinical Qualification of a New Immunohistochemical Assay for Androgen Receptor Splice Variant-7 Protein Expression in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*.
- WENT, P., VASEI, M., BUBENDORF, L., TERRACCIANO, L., TORNILLO, L., RIEDE, U., KONONEN, J., SIMON, R., SAUTER, G. & BAEUERLE, P. A. 2006. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer*, 94, 128-35.
- WENT, P. T., LUGLI, A., MEIER, S., BUNDI, M., MIRLACHER, M., SAUTER, G. & DIRNHOFER, S. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35, 122-8.
- WINTER, M. J., NAGTEGAAL, I. D., VAN KRIEKEN, J. H. & LITVINOV, S. V. 2003. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol*, 163, 2139-48.
- WITTON, C. J., REEVES, J. R., GOING, J. J., COOKE, T. G. & BARTLETT, J. M. 2003. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*, 200, 290-7.
- WOLF, K. & FRIEDL, P. 2011. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol*, 21, 736-44.
- WU, P., LIU, T. & HU, Y. 2009. PI3K inhibitors for cancer therapy: what has been achieved so far? *Curr Med Chem*, 16, 916-30.
- WU, Z., HUANG, X., HAN, X., LI, Z., ZHU, Q., YAN, J., YU, S., JIN, Z., WANG, Z., ZHENG, Q. & WANG, Y. 2016. The chemokine CXCL9 expression is associated with better prognosis for colorectal carcinoma patients. *Biomed Pharmacother*, 78, 8-13.
- WULFING, P., BORCHARD, J., BUERGER, H., HEIDL, S., ZANKER, K. S., KIESEL, L. & BRANDT, B. 2006. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 12, 1715-20.
- XENIDIS, N., IGNATIADIS, M., APOSTOLAKI, S., PERRAKI, M., KALBAKIS, K., AGELAKI, S., STATHOPOULOS, E. N., CHLOUVERAKIS, G., LIANIDOU, E., KAKOLYRIS, S., GEORGOULIAS, V. & MAVROUDIS, D. 2009. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol*, 27, 2177-84.
- XENIDIS, N., PERRAKI, M., APOSTOLAKI, S., AGELAKI, S., KALBAKIS, K., VARDAKIS, N., KALYKAKI, A., XYRAFAS, A., KAKOLYRIS, S., MAVROUDIS, D. & GEORGOULIAS, V. 2013. Differential effect of adjuvant taxane-based and taxane-free chemotherapy regimens on the CK-19 mRNA-positive circulating tumour cells in patients with early breast cancer. *Br J Cancer*, 108, 549-56.
- XU, X., STOWER, M. J., REID, I. N., GARNER, R. C. & BURNS, P. A. 1997. A hot spot for p53 mutation in transitional cell carcinoma of the bladder: clues to the etiology of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 611-6.
- YANG, J., MANI, S. A., DONAHER, J. L., RAMASWAMY, S., ITZYKSON, R. A., COME, C., SAVAGNER, P., GITELMAN, I., RICHARDSON, A. & WEINBERG, R. A. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117, 927-39.
- YANG, P., GUO, L., DUAN, Z. J., TEPPER, C. G., XUE, L., CHEN, X., KUNG, H. J., GAO, A. C., ZOU, J. X. & CHEN, H. W. 2012. Histone methyltransferase NSD2/MMSET mediates constitutive NF-kappaB signaling for cancer cell proliferation, survival, and tumor growth via a feed-forward loop. *Mol Cell Biol*, 32, 3121-31.
- YEUNG, T. M., GANDHI, S. C., WILDING, J. L., MUSCHEL, R. & BODMER, W. F. 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3722-7.
- YOKOBORI, T., IINUMA, H., SHIMAMURA, T., IMOTO, S., SUGIMACHI, K., ISHII, H., IWATSUKI, M., OTA, D., OHKUMA, M., IWAYA, T., NISHIDA, N., KOGO, R., SUDO, T., TANAKA, F., SHIBATA, K., TOH, H., SATO, T., BARNARD, G. F., FUKAGAWA, T., YAMAMOTO, S., NAKANISHI, H., SASAKI, S., MIYANO, S., WATANABE, T., KUWANO, H., MIMORI, K., PANTEL, K. & MORI, M. 2013. Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells

- undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res*, 73, 2059-69.
- YU, M., BARDIA, A., ACETO, N., BERSANI, F., MADDEN, M. W., DONALDSON, M. C., DESAI, R., ZHU, H., COMAILLS, V., ZHENG, Z., WITTNER, B. S., STOJANOV, P., BRACHTTEL, E., SGROI, D., KAPUR, R., SHIODA, T., TING, D. T., RAMASWAMY, S., GETZ, G., IAFRATE, A. J., BENES, C., TONER, M., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2014. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*, 345, 216-20.
- YU, M., BARDIA, A., WITTNER, B. S., STOTT, S. L., SMAS, M. E., TING, D. T., ISAKOFF, S. J., CICILIANO, J. C., WELLS, M. N., SHAH, A. M., CONCANNON, K. F., DONALDSON, M. C., SEQUIST, L. V., BRACHTTEL, E., SGROI, D., BASELGA, J., RAMASWAMY, S., TONER, M., HABER, D. A. & MAHESWARAN, S. 2013. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 339, 580-4.
- YU, M., STOTT, S., TONER, M., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2011. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*, 192, 373-82.
- ZHANG, L., ALTUWAIJRI, S., DENG, F., CHEN, L., LAL, P., BHANOT, U. K., KORETS, R., WENSKE, S., LILJA, H. G., CHANG, C., SCHER, H. I. & GERALD, W. L. 2009. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am J Pathol*, 175, 489-99.
- ZHANG, L., RIDGWAY, L. D., WETZEL, M. D., NGO, J., YIN, W., KUMAR, D., GOODMAN, J. C., GROVES, M. D. & MARCHETTI, D. 2013. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med*, 5, 180ra48.
- ZHANG, L., RIETHDORF, S., WU, G., WANG, T., YANG, K., PENG, G., LIU, J. & PANTEL, K. 2012. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 18, 5701-10.

7 Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
ARV7	Androgenrezeptor-Slice-Variante 7
BCa	Mammakarzinom
BLCa	Blasenkarzinom
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD45	Leukozytenantigen (<i>cluster of differentiation 45</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cq	Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle threshold</i>)
CRCa	Kolorektales Karzinom
cT	Klinisches Tumorstadium
CTC	Zirkulierende Tumorzellen (<i>circulating tumor cells</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTC	disseminierte Tumorzellen (DTC = Disseminating Tumor Cells)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (Epidermal Growth Factor)
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>)
EPISPOT	epithelialer Immunospot
ER	Estrogenrezeptor
et al.	und andere (et alii/et aliae)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>)
h	Stunde
HER2	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>epidermal growth factor</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
K	Keratin
m	Milli-
M0	metastasefrei
M1	Fernmetastasen vorhanden
min	Minuten
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)</i>
n	Anzahl

Abkürzungsverzeichnis

N	Lymphknotenstatus (<i>Nodes</i>)
n	Nano-
NSCLC	Nicht-Kleinzelliges-Lungenkarzinom (<i>non small cell lung cancer</i>)
p	Pico-
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCa	Prostatakarzinom
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PR	Progesteronrezeptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	Pathologisches Tumorstadium
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real time PCR</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SCLC	Kleinzelliges-Lungenkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
sek.	Sekunden
xg	mehrfaches der Erdbeschleunigung
μ	Mikro-
Gene	
ACTB	Actin, beta
ADAM17	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 17
AGR2	anterior gradient 2
AHNAK	AHNAK nucleoprotein
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2, transcript variant 1
ALDH	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
ANXA2R	annexin A2 receptor
AR	androgen receptor
ARV7	androgen receptor splice variant 7
AURKA	Aurora kinase A
B2M	Beta-2-microglobulin
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMP1	Bone morphogenetic protein 1
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
CALD1	Caldesmon 1
CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1

Abkürzungsverzeichnis

CAV2	Caveolin 2
CCND1	Homo sapiens cyclin D1
CCND1	cyclin D1
CCNE2	cyclin E2
CD24L4	Homo sapiens CD24 molecule
CD44_all	CD44 molecule (Indian blood group)
CD45 / PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
COL5A2	Collagen, type V, alpha 2
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
CTSD	cathepsin D
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CYP11A1	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1
DSC2	Desmocollin 2
DSP	Desmoplakin
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMP2	epithelial membrane protein 2
EPCAM	Homo sapiens epithelial cell adhesion molecule
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian), transcript variant 2
ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
ESR1	Estrogen receptor 1
ESR2	estrogen receptor 2
F11R	F11 receptor
FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1
FN1	Fibronectin 1
FOLH1	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
FOXO	Homo sapiens forkhead box O3 (FOXO3)
FZD7	Frizzled family receptor 7
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
GSC	Goosecoid homeobox
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
H2AFZ	Homo sapiens H2A histone family, member Z
HDAC2	Homo sapiens histone deacetylase 2

Abkürzungsverzeichnis

HER2	Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
Hjrp	Holliday junction recognition protein
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IBSP	integrin-binding sialoprotein
IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4
IGFR	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 receptor
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
ILK	Integrin-linked kinase
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
JAG1	Jagged 1
KI67	Homo sapiens antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
KIT	KIT v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KLK3	kallikrein-related peptidase 3
KRAS	Homo sapiens v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRT14	Keratin 14
KRT19	Keratin 19
KRT7	Keratin 7
MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1
MCM4	Homo sapiens minichromosome maintenance complex component 4
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type)
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type)
MRP1	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 (ABCC1)
MRP2	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 (ABCC2)
MRP4	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4)
MRP5	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5 (ABCC5)
MRP5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
MSN	Moesin
MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
MTOR	Homo sapiens mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
MUC1	mucin 1, cell surface associated
Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1

Abkürzungsverzeichnis

NES	nestin
NODAL	Nodal homolog (mouse)
NOTCH1	Notch 1
NUDT13	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13
OCLN	Occludin
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase 1
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PGR	progesterone receptor (PGR)
PI3KCA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PLEK2	Pleckstrin 2
POU5F1	POU class 5 homeobox 1
PPIC	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)
PPPDE2	PPPDE peptidase domain containing 2
PROM1	prominin 1
PSCA	prostate stem cell antigen
PTCH1	patched 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
RAD51	RAD51 recombinase
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SATB1	SATB homeobox 1
SCGB2A / MAM	secretoglobin, family 2A, member 2
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
SHH	sonic hedgehog
SIP1	Survival of motor neuron protein interacting protein 1
SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 8
SMAD2	SMAD family member 2
SNAI1	snail family zinc finger 1
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
SRD5A1	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
STEAP1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2

Abkürzungsverzeichnis

TCF3	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
TCF4	Transcription factor 4
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1
TMEM132A	Transmembrane protein 132A
TNFSF11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha
TP53	tumor protein p53
TSPAN13	Tetraspanin 13
TUBB3	tubulin, beta 3 class III
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
Twist1	twist family bHLH transcription factor 1
UPA	plasminogen activator, urokinase
VCAN	Versican
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
VEGFR1	Homo sapiens fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1)
VEGFR2	kinase insert domain receptor
VIM	Vimentin
VPS13A	Vacuolar protein sorting 13 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
WHSC1L1_L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1
WHSC1S1_S1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1
WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2

8 Anhang

Supplement Tabelle 8.1 Expressionsprofil von Prostatakrebszelllinien und Leukozyten

	PC3_1	PC3_2	PC3_3	LnCap_1	LnCap_2	LnCap_3	Leuko_1	Leuko_2
ACACA	30,72	29,33	30,22	24,26	24,25	23,64	N/A	39,19
AKT1	27,85	28,75	28,22	29,31	29,75	26,88	37,8	39,21
APC	27,31	N/A	34,84	24,95	25,16	35,62	35,91	35,54
AR	N/A	N/A	N/A	32,24	31,29	28,75	N/A	40,39
ARNTL	23,73	26,54	25,76	31,91	N/A	23,43	36,9	N/A
BCL2	33,42	35,51	32,6	31,66	34,22	28,72	32,25	33,66
CAMKK1	N/A	N/A	33,23	N/A	N/A	36,49	N/A	N/A
CAMSAP1	23,29	23,35	26,36	28,45	28,82	22,92	N/A	N/A
CASP3	25,54	37,48	23,85	N/A	33,25	22,38	N/A	N/A
CAV1	20,1	22,27	21,08	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CAV2	24,5	25,97	24,03	38,13	38,22	34,78	N/A	N/A
CCNA1	32,07	N/A	25,01	N/A	38,04	34,25	N/A	N/A
CCND1	27,39	25,52	28,3	39,24	33,5	26,88	38,76	N/A
CCND2	N/A	38,91	32,41	39,58	N/A	31,29	38,27	39,4
CDH1	N/A	26,12	N/A	27,28	27,81	23,7	37,71	N/A
CDKN2A	21,03	24,66	22,17	N/A	N/A	21,93	N/A	N/A
CLN3	24,23	26,96	27,4	26,83	27,14	23,83	N/A	N/A
CREB1	24,44	24,52	28,26	24,79	25,08	22,02	37,26	N/A
DAXX	29,13	29,15	27,82	32,57	31,45	26,67	N/A	N/A
DDX11	29,27	24,74	26,22	N/A	33,02	27,06	40,3	N/A
DKK3	32,38	36,68	34,47	35,13	36,98	33,16	37,67	39,37
DLC1	N/A	39,28	39,33	38,67	N/A	37,84	N/A	N/A
ECT2	21,36	25,69	23,77	37,75	38,26	22,02	40,68	39,14
EDNRB	35,1	N/A	N/A	N/A	37,22	N/A	N/A	N/A
EGFR	28,22	27,52	32,71	40,54	37,14	31,77	31,9	32,58
EGR3	39,38	40,8	38,21	38,08	N/A	38,12	N/A	N/A
ERG	37,03	38,25	37,68	N/A	N/A	36,49	N/A	N/A
ETV1	25,15	36,54	32,53	24,67	24,84	20,08	N/A	N/A
FASN	29,28	29,28	28,39	29,47	30,22	24,7	N/A	N/A
FOXO1	29,72	29,3	27,35	29,31	29,51	27,25	39,38	N/A
GCA	24,03	23,35	23,29	23,55	23,89	21,9	36,79	37,55
GNRH1	N/A	N/A	25,87	N/A	N/A	26,56	N/A	N/A
GPX3	39,44	35,7	37,38	N/A	N/A	34,13	36,16	36,4
GSTP1	19,89	21,14	20,2	N/A	N/A	35,8	35,02	35,98
HAL	38,73	N/A	N/A	N/A	N/A	34,89	N/A	N/A
HMGCR	27,95	24,15	25,78	23,9	24,29	22,38	39,26	N/A
IGF1	N/A	39,53	40,27	23,18	23,47	26,83	31,48	34,65
IGFBP5	32,62	N/A	N/A	N/A	36,02	33,27	N/A	N/A
IL6	N/A	N/A	25,06	N/A	N/A	33,28	35,18	N/A
KLHL13	23,71	37,15	26,27	32,61	N/A	24,48	N/A	N/A
KLK3	34,9	N/A	37,94	23,28	23,63	21,43	N/A	N/A
LGALS4	N/A	N/A	31,41	N/A	39,07	32,43	N/A	N/A
LOXL1	25,79	25,27	25,19	32,21	N/A	26,84	39,73	N/A

Anhang

MAPK1	23,19	25,19	24,33	24,24	24,58	22,62	N/A	N/A
MAX	24,96	31,3	24,52	40,56	30,71	29,47	37,28	N/A
MGMT	26,13	26,59	28,69	24,48	25,08	24,11	N/A	N/A
MKI67	23,02	23,71	23,4	N/A	N/A	23,81	N/A	N/A
MSX1	31,33	N/A	38,62	35,46	36,49	34,33	N/A	N/A
MTO1	23,11	25,04	23,8	23,79	23,97	20,29	36,88	36,24
NDRG3	23,27	24,6	23,69	27,82	28,55	21,92	N/A	N/A
NFKB1	24,32	24,61	26,15	30,49	31,49	23,2	26,82	27,78
NKX3-1	23,29	30,82	30,38	19,07	19,33	17,81	N/A	N/A
NRIP1	30,1	25,12	29,32	32,21	32,63	31,34	39,31	N/A
PDLIM4	27,24	31,12	24,69	37,8	34,13	36,3	N/A	N/A
PDPK1	24,29	24,15	22,35	25,79	26,52	22,71	40,66	N/A
PES1	24,39	28,68	28,6	27,14	27,95	24,38	N/A	N/A
PPP2R1B	24,88	28,1	22,61	31,12	30,92	22,75	N/A	N/A
PRKAB1	30,18	29,6	24,53	N/A	N/A	29,34	N/A	N/A
PTEN	N/A	N/A	N/A	24,52	24,88	23,06	N/A	N/A
PTGS1	32,5	40,97	38	35,77	N/A	33,56	N/A	35,6
PTGS2	39,35	N/A	32,39	N/A	34	33,31	38,72	N/A
RARB	25,03	39,89	36,38	24,29	25,06	27,04	N/A	N/A
RASSF1	31,96	39,11	34,63	N/A	36,32	33,67	N/A	N/A
RBM39	21,36	21,17	21	23,05	23,42	19,54	N/A	36,05
SCAF11	25,17	25,12	23,87	25,07	25,2	22,5	N/A	N/A
Sep7	22,03	24,18	23,35	26,99	27,41	23,07	32,93	37,65
SFRP1	33,74	40,61	34,16	N/A	40,5	35,58	40,61	N/A
SHBG	N/A	35,87	N/A	27,59	27,89	29,48	N/A	N/A
SLC5A8	N/A	N/A	N/A	36,7	38,15	32,8	N/A	N/A
SOCS3	32,29	33,58	35,82	N/A	N/A	36,2	N/A	N/A
SOX4	N/A	38,95	N/A	N/A	N/A	35,31	N/A	N/A
SREBF1	31,21	31,16	31,03	32,54	33,45	27,92	N/A	N/A
STK11	32	33,11	31,95	32,91	33,59	28,98	36,65	N/A
SUPT7L	23,02	22,89	22,31	22,09	22,37	20,93	37,73	36,53
TFPI2	19,92	23,82	20,76	N/A	N/A	37	N/A	N/A
TGFB111	27,83	32,15	33,04	N/A	34,71	36,29	N/A	N/A
TIMP2	21,29	21,84	21,29	25,12	25,53	25,44	N/A	N/A
TIMP3	33,25	36,21	33,72	37,37	37,4	37,05	38,1	40,35
TMPRSS2	N/A	32,77	31,05	20,57	21,05	21,14	N/A	N/A
TNFRSF10D	34,67	N/A	32,5	31,93	32,48	27,26	N/A	N/A
TP53	31,2	33,49	31,44	29,99	31,14	23,74	29,88	31,47
USP5	24,14	27,64	24,3	24,9	25,16	22,84	N/A	N/A
VEGFA	21,25	21,39	22,29	21,28	21,51	18,85	32,44	34,86
ZNF185	28,54	29,85	24,79	37,92	N/A	31,02	N/A	N/A
ACTB	18,04	19,98	18,91	20,21	20,44	18,05	22,48	23,73
B2M	21,1	23,77	21,29	22,37	22,82	20,84	19,99	21,28
GAPDH	17,05	19,49	18,62	19,29	19,64	16,28	22,98	25,7
HPRT1	22,06	23,49	22,39	31,71	31,75	21,12	31,03	30,9
RPLP0	15,18	16,5	15,81	15,94	16,18	12,46	19,51	21,37
HGDC	33,97	40,79	37,52	N/A	33,28	30,03	31,08	34,03
RTC	N/A	N/A	N/A	38,71	N/A	38,55	39,64	37,97
RTC	N/A	40,51	40,52	40,39	N/A	N/A	38,73	N/A

Anhang

RTC	N/A	40,31	N/A	N/A	40,24	40,61	N/A	37,95
PPC	21,85	21,87	21,23	21,66	21,77	22,67	22,09	22,01
PPC	21,77	21,69	21,22	21,58	21,69	22,67	21,98	21,79
PPC	22,01	21,83	21,37	21,71	21,9	22,7	22,11	22

Supplement Tabelle 8.2 Expressionsprofil von Brustkrebszelllinien und Leukozyten (vergleiche Abbildung 3.11 Zellkultur (1) blaue Pfeile; (4) grüne Pfeile)

	Leuko1	Leuko2	468	468	468	SKBR3	SKBR3	SKBR3
ADAM17	N/A	28,65	22,61	23,3	22,59	23,25	23,11	22,24
CTSD	29,61	28,83	21,32	22,28	20,35	19,49	19,64	18,3
HDAC2	N/A	27,87	20,34	20,44	19,72	21,05	20,8	19,56
MET_1	N/A	N/A	24,74	23,4	24,19	23,78	23,73	23,54
PARP	28,45	26,01	21,29	22,35	21,34	19,89	19,51	18,55
TOP2A	29,97	N/A	26,48	21,45	25,58	20,12	19,59	18,54
CCNE2	N/A	N/A	25,43	31,34	27,78	27,68	27,86	26,19
GAPDH	N/A	24,75	18,11	18,77	17,23	17,1	16,37	15,02
YWHAZ	26,24	24,61	19,82	20,07	19,14	20,77	20,62	18,76
AKT2	30,39	28,69	24,14	25,82	23,77	23,38	22,76	21,84
EGFR	N/A	N/A	19,33	20,06	18,95	N/A	N/A	N/A
IBSP_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,66	27,2	29,29
MRP2	N/A	N/A	27,96	N/A	28,7	27,93	31,25	26,9
PGR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TP53	27,62	26,59	21,34	21,9	21,06	21,54	21,7	20,24
PPIC	N/A	N/A	21,81	22,22	21,69	23,63	23,31	22,93
GUSB	N/A	30,54	24,48	25,28	24,12	23,21	23,27	21,74
ALDH	N/A	N/A	28,01	N/A	N/A	25,68	26,13	24,38
EPCAM	N/A	N/A	20,07	20,03	19,13	20,06	19,79	19,11
IGFR	N/A	27,79	25,98	26,15	25,59	24,78	25,57	23,51
MRP1	N/A	27,6	26,85	25,56	24,35	23,07	22,85	22,59
PI3KCA	N/A	28,58	25,11	25,54	24,54	23,5	22,61	21,7
Twist1	30,19	34,03	N/A	N/A	N/A	25,68	27,43	26,77
SLC6A8	N/A	N/A	26,94	27,89	27,34	23,94	23,48	22,29
HPRT1	N/A	28,07	23,43	24,08	23,13	23,15	23,62	N/A
AURKA	N/A	N/A	27,43	22,61	26,79	22,5	21,42	20,13
ERBB2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	17,23	16,66	16,32
KI67	N/A	N/A	23,81	21,51	24,21	20,6	21,32	20,79
MRP4	28,91	31,94	26,81	27,69	25,62	27,02	26,09	25,28
PTEN	27,1	26,64	23,66	23,6	22,26	23,25	22,85	22,14
UPA	N/A	N/A	N/A	N/A	28,93	N/A	N/A	N/A
Hjurp	N/A	N/A	N/A	23,93	28,14	24,12	24,79	23,05
PPIA	24,52	24,2	17,77	18,1	16,88	16,98	17,17	15,47
CCND1	N/A	N/A	22,96	24,04	22,44	22,29	21,64	20,66
ESR1	N/A	28,91	N/A	N/A	27,25	N/A	N/A	N/A
KIT_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MRP5	N/A	N/A	25,6	27,01	25,72	22,8	23,04	21,97
CD45/PTPRC	25,55	22,87	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VEGFA	N/A	N/A	24,08	25,33	24,02	23,43	23,32	22,84
EMP2	N/A	N/A	22,15	22,17	21,1	21,18	20,94	20,31

Anhang

RPLP	23,73	21,64	18,02	19,35	17,52	17,42	17,83	15,96
CD24L4	28,85	27,77	17,28	18,28	16,38	18,78	18,45	17,45
VEGFR1	N/A							
KRAS	27,31	27,83	23,23	23,03	22,5	22,57	21,76	21,27
MTOR	N/A	N/A	25,12	26,32	24,88	24,71	23,47	23,01
RAD51	N/A	N/A	23,54	25,56	27,08	23,39	22,76	22,12
VIM	26,41	24,01	N/A	N/A	27,55	N/A	N/A	N/A
MAL2	N/A	N/A	21,46	22,22	21,26	18,17	18,11	16,69
TBP	N/A	30,82	25,3	25,02	24,51	25,14	24,97	23,23
CD44_all	26,09	24,7	18,6	19,17	18,15	26,09	N/A	28,99
FOXO	N/A	29,07	23,91	24,42	22,85	25,62	24,93	23,35
KRT19	N/A	N/A	18,32	18,92	17,49	17,76	17,06	15,95
MUC1	N/A	N/A	22,74	22,98	21,71	21,37	21,41	20,31
SATB1	N/A	26,94	N/A	N/A	N/A	28,22	26,79	24,8
WHSC1L1	N/A	28,71	27,45	27,39	25,93	24,51	25,45	25,36
ACTB	24,23	21,67	17,84	18,99	18,17	17,63	17,46	16,08
TUBB	N/A	29,12	24,62	24,26	23,73	24,98	24,63	23,28
CDH1_1	N/A	N/A	24,03	23,61	22,7	N/A	N/A	N/A
H2AFZ	N/A	25,48	19,13	18,88	18,81	18,01	17,76	16,89
MCM4	N/A	N/A	24,08	24,81	24,26	23,82	23,24	21,65
Myc*	28,07	28,21	23,7	25,84	25,48	22,07	22,72	21,24
SCGB2A/MAM	N/A	N/A	N/A	N/A	25,78	19,61	19,06	17,41
WHSC1S1	35,68	27,64	26,69	25,07	26,37	26,21	25,09	23,66
B2M	23,21	20,81	19,55	19,71	19,47	20,4	20,79	18,97
UBC	28,06	25,19	22,58	22,09	21,23	20,23	17,62	18,98

Supplement Tabelle 8.3 Expressionsprofil von CTCs isoliert aus einer Brustkrebspatientin (vergleiche Abbildung 3.11 (4) grüne Pfeile)

	CTC	CTC	Leuk	Leuko2.	Leuko	Leuko								
ADAM17	N/A	N/A	28,2	31,3	26,5	28,5	N/A	26,4	N/A	N/A	28,65	N/A	27,57	
CTSD	25,9	29,1	28,6	25,2	26,3	27	29,5	26	29,51	29,6	28,83	N/A	N/A	
HDAC2	27,3	27,7	26,9	26,5	N/A	29,8	N/A	25,8	27,72	N/A	27,87	N/A	N/A	
MET_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A									
PARP	26,6	27,4	25,8	25,0	25,7	26,2	28,5	25,1	26,77	28,4	26,01	N/A	27,74	
TOP2A	N/A	N/A	26,4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	29,9	N/A	N/A	N/A	
CCNE2	N/A	N/A	28,2	N/A	N/A	N/A	N/A	28,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
GAPDH	23,5	24,3	24,4	22,7	23,7	21,3	26,3	22,6	23,12	N/A	24,75	28,38	24,84	
YWHAZ	23,9	26,3	25,8	23,9	26,4	23,9	N/A	25,1	25,45	26,2	24,61	27,27	25,91	
AKT2	29,8	N/A	26,7	27,1	N/A	28	N/A	27,8	28,1	30,3	28,69	N/A	29,33	
EGFR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A									
IBSP_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A									
MRP2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A									
PGR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A									
TP53	27,3	27,3	25,7	26,3	27,1	N/A	N/A	27,7	24,86	27,6	26,59	28,63	26,63	
PPIC	26,1	N/A	26,3	25,3	27,9	25,4	26,7	25,4	27,87	N/A	N/A	N/A	N/A	
GUSB	28,7	29,8	26,7	29,3	31	29,7	N/A	28,8	29,2	N/A	30,54	N/A	N/A	
ALDH	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A									
EPCAM	24,1	25,9	24,5	23,3	25,4	24,7	27,8	23,4	26,21	N/A	N/A	N/A	N/A	
IGFR	N/A	28	N/A	N/A	26,9	N/A	N/A	N/A	28,26	N/A	27,79	N/A	29,4	
MRP1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,5	N/A	N/A	N/A	N/A	27,6	28,17	28,3	

Anhang

PI3KCA	29,8	N/A	N/A	28,8	N/A	N/A	N/A	27,8	28,62	N/A	28,58	N/A	N/A
Twist1	N/A	N/A	N/A	N/A	36,1	N/A	N/A	N/A	N/A	30,1	34,03	N/A	29,47
SLC6A8	N/A	N/A	N/A	32,4	N/A	N/A	N/A	N/A	27,79	N/A	N/A	N/A	N/A
HPRT1	N/A	29,3	28,1	N/A	28	27,2	N/A	N/A	26,38	N/A	28,07	N/A	28,14
AURKA	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A								
ERBB2	29,7	N/A	26,3	26,4	N/A	N/A	N/A	N/A	25,89	N/A	N/A	N/A	27,79
KI67	N/A	N/A	25,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MRP4	N/A	28,9	31,94	N/A	N/A								
PTEN	25,4	28,6	26,4	24,6	26,2	25,4	N/A	25,6	27,02	27,1	26,64	N/A	N/A
UPA	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A								
Hjrup	N/A	N/A	27,5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PPIA	23,2	24,4	23,4	23,4	24,6	22,8	26,1	22,8	23,99	24,5	24,2	27,36	24,83
CCND1	26,4	26,4	26,7	24,5	25,9	N/A	28,6	23,6	25,61	N/A	N/A	N/A	N/A
ESR1	28,2	28,3	N/A	27,1	26,4	27,1	27,9	27,2	29,14	N/A	28,91	N/A	N/A
KIT_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A								
MRP5	28,5	N/A	N/A	28,5	N/A	27,2	N/A	26,2	26,74	N/A	N/A	N/A	26,88
CD45/PTPRC	N/A	27,4	N/A	N/A	N/A	28,6	N/A	N/A	N/A	25,5	22,87	25,04	23,71
VEGFA	N/A	28,7	28,3	28,5	28,4	28,2	N/A	N/A	26,84	N/A	N/A	N/A	28,75
EMP2	25,8	26	25,4	26,0	26,3	26,6	N/A	28,5	25,91	N/A	N/A	N/A	N/A
RPLP	21,0	23,3	22,7	22,0	21,1	21,8	24,7	22,3	22,07	23,7	21,64	25,55	23,21
CD24L4	22,8	25,8	26,1	22,9	26,4	23,9	28,3	24,4	25,31	28,8	27,77	27,92	N/A
VEGFR1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A								
KRAS	26,1	27,8	28,1	28,5	27,8	27,3	30,7	28,4	26,15	27,3	27,83	N/A	29,23
MTOR	29,4	N/A	N/A	27,4	N/A	N/A	N/A	26,6	27,76	N/A	N/A	N/A	N/A
RAD51	28,7	27	N/A	N/A	N/A	31,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VIM	N/A	27,9	N/A	N/A	N/A	27,2	N/A	N/A	N/A	26,4	24,01	26,38	24,32
MAL2	23,4	29,6	25,8	24,6	25,1	25,8	28,6	24,7	24,94	N/A	N/A	N/A	N/A
TBP	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	29,1	27,6	28,19	N/A	30,82	N/A	N/A
CD44_all	N/A	32,5	28,5	N/A	N/A	25	N/A	N/A	28,39	26,0	24,7	25,04	24,63
FOXO	N/A	N/A	N/A	N/A	28,8	29,2	N/A	N/A	29,12	N/A	29,07	N/A	N/A
KRT19	22,5	23,3	25,3	21,4	23	22,6	27,1	23	24,15	N/A	N/A	N/A	N/A
MUC1	N/A	31,5	N/A	N/A	N/A	33,3	N/A	36,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SATB1	N/A	N/A	26,94	N/A	29,34								
WHSC111	27,6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,2	N/A	N/A	28,71	N/A	N/A
ACTB	22,5	24,2	24	21,1	25,2	22,6	26,2	23,4	22,6	24,2	21,67	24,87	23,07
TUBB	28,1	29,4	30,9	27,2	N/A	26,8	N/A	29,1	N/A	N/A	29,12	28,88	N/A
CDH1_1	25,1	26,7	25,6	24,9	28,1	28,5	28,3	26,6	26,22	N/A	N/A	N/A	N/A
H2AFZ	26,5	25	23,2	23,7	28,2	23,3	26,4	24,1	24,9	N/A	25,48	26,41	26,22
MCM4	N/A	N/A	29,2	N/A	30,3	27,2	N/A	27,3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Myc*	30,0	29	36,8	30,0	N/A	29,3	N/A	N/A	N/A	28,0	28,21	29,6	28,5
SCGB2A/MA	18,9	21,6	21	17,6	19,1	25,2	20	25,1	20,32	N/A	N/A	N/A	N/A
WHSC1S1	26,6	34	N/A	26,3	28,4	N/A	N/A	28,3	N/A	35,6	27,64	N/A	N/A
B2M	22,5	21,7	22	20,9	21,6	23,4	24,4	21,1	23,24	23,2	20,81	23,37	21,2
UBC	24,6	26	26	24,3	26	23,3	28,2	25,3	24,92	28,0	25,19	28,15	27,09

Supplement Tabelle 8.4 Expressionsprofil von CTCs isoliert aus einer Brustkrebspatientin (BCa2) angereichert über das CellSearch®-System (vergleiche Abbildung 3.11 (5) rote Pfeile)

	Bca 2					
	CellSearch	CellSearch	CellSearch	CellSearch	CellSearch	CellSearch
	CTC1	CTC3	CTC5	CTC6	CTC6	CTC7
	Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	Cq
AHNAK	33,99	35,25	32,17	32,56	35,11	32,52
AKT1	31,41	N/A	31,32	N/A	32,16	32,42
BMP1	N/A	31,83	N/A	N/A	31,18	30,31
BMP2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Anhang

BMP7	N/A		32,03	N/A	N/A	N/A		31,05
CALD1	N/A		31,67	N/A			31,91	33,63
CAMK2N1	N/A	N/A			34,05	N/A	32,34	32,46
CAV2		39,32	39,09	N/A		37,85	N/A	39,47
CDH1	N/A		31,84	N/A		33,23	30,49	33,11
CDH2	N/A		33,06		33,13	N/A	30,45	30,22
COL1A2	N/A		29,86	N/A		N/A	30,32	31,22
COL3A1		36,9	32,84		32,1	36,93	31,59	31,44
COL5A2	N/A		31,75		33,13	N/A	31,39	33,22
CTNNB1	N/A		34,1		34,71	N/A	33,92	33,69
DSC2	N/A		32,54	N/A		N/A	32,19	31
DSP		33	30,48		29,95	30,55	32,12	30,26
EGFR	N/A		29,7		32,27	31,64	30,93	29,15
ERBB3	N/A	N/A			34,31	31,38	33,61	31,53
ESR1		38,52	39,76		39,02	40,14	40,4	33,49
F11R	N/A		30,53		31,02	N/A	N/A	31,91
FGFBP1	N/A		34,11	N/A		N/A	N/A	N/A
FN1	N/A		30,57	N/A		31,72	31,74	31,94
FOXC2		40,35	34,07	N/A		N/A	N/A	N/A
FZD7		37,02	34,04	N/A		N/A	N/A	N/A
GNG11	N/A		32,05		33,5	N/A	32,22	32,63
GSC	N/A	N/A		N/A		N/A	34,86	37,48
GSK3B		30,67	33,7	N/A		N/A	33,21	30,08
IGFBP4		37,28	36,22		37,98	39,22	39,35	35,28
IL1RN	N/A		31,42	N/A		N/A	32,49	34,31
ILK		38,09	30,23		30,56	37,68	N/A	35,17
ITGA5	N/A	N/A		N/A		N/A	32,29	30,97
ITGAV	N/A	N/A			35,62	N/A	N/A	31,71
ITGB1	N/A		35,76		33,12	N/A	33,9	30,74
JAG1		35,14	30,89	N/A		N/A	32,11	31,5
KRT14		30,33	32,22		39,15	37,97	32,33	31,85
KRT19	N/A		32,27		28,64	33,76	31,29	30,38
KRT7		39,06	N/A		33,03	34,24	N/A	31,26
MAP1B	N/A		31,01	N/A		40,21	30,58	31,94
MMP2		37,89	31,22		33,16	N/A	N/A	31,43
MMP3	N/A		30,65	N/A		N/A	30,94	32,12
MMP9		38,19	32,55		32,52	35,36	31,04	32,42
MSN		34,04	32,01		34,63	33,83	31,65	29,74
MST1R	N/A		34,04	N/A		N/A	35,17	32,45
NODAL	N/A		33,47		37,63	N/A	33,2	31,99
NOTCH1		39,02	38,79		40,99	N/A	36,85	33,5
NUDT13		36,75	32,02		35,86	31,83	33,03	32,02
OCLN	N/A		32,58		34,14	32,56	32,08	31,4
PDGFRB	N/A		33,77	N/A		N/A	N/A	34,51
PLEK2	N/A		31,77	N/A		N/A	N/A	35,71
PPPDE2	N/A		32,06		31,2	N/A	31,53	30,56
PTK2	N/A		31,11	N/A		33,13	N/A	30,49

Anhang

PTP4A1		38,05	33,55	38,75	32,92	31,58	31,05
RAC1		39,04	40,66	34,59	34,6	31,79	32,66
RGS2		35,54	32,97	N/A	N/A	N/A	30,07
SERPINE1	N/A		31,01	N/A	N/A	N/A	31,08
SIP1	N/A	N/A		N/A		31,97	30,28
SMAD2	N/A	N/A		N/A		31,6	30,36
SNAI1	N/A		37,81	N/A	N/A	37,54	38,07
SNAI2	N/A		33,9	N/A	N/A	N/A	31,19
SNAI3		38,77	40,97	39,44	39,59	35,63	32,49
SOX10	N/A		33,21	35,01	N/A	32,89	33,24
SPARC		38,48	33,1	38,87	36,13	34,24	38,19
SPP1	N/A		31,22	N/A	N/A	32,41	32,21
STAT3		33,37	32,05	32,28	N/A	30,83	32,22
STEAP1	N/A		34,36	40,07	N/A	N/A	34,36
TCF3	N/A	N/A		32,67	N/A	32,12	30,39
TCF4		39,28	N/A	N/A	N/A	30,46	30,56
TFPI2	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	33,09
TGFB1		32,29	33,17	N/A	N/A	31,58	32,11
TGFB2	N/A		30,61	N/A	N/A	31,32	30,26
TGFB3	N/A		32,61	30,27	31,79	30,91	31,64
TIMP1		35,29	35,65	35,92	36,04	34,51	33,78
TMEFF1		40	31,64	40,71	39,11	N/A	39,8
TMEM132A		40,22	34,11	33,56	40,8	40,51	39,55
TSPAN13		32,19	30,4	29,79	31,82	36,64	29,05
TWIST1	N/A	N/A		N/A	N/A	36,34	36,56
VCAN	N/A	N/A		N/A	N/A	33,31	33,15
VIM		31,91	31,55	N/A	N/A	31,09	28,8
VPS13A	N/A		32,58	N/A	32,21	33,47	30,83
WNT11		40,32	35,47	37,23	N/A	35,06	38,46
WNT5A		37,1	38,61	38,23	37,96	37,81	33,79
WNT5B		40,26	34,63	N/A	N/A	N/A	30,59
ZEB1	N/A		33,22	N/A	N/A	34,05	30,64
ZEB2	N/A		30,59	N/A	N/A	30,52	30,27
ACTB		31,11	29,32	28,44	29,3	28,36	28,3
B2M		30,46	29,55	29,59	28,85	29,04	30,4
GAPDH		30,49	28,52	29,68	31,02	28,45	27,93
HPRT1	N/A		32,47	N/A	31,19	32,6	31,07
RPLP0	N/A		30,69	27,09	28,35	28,03	29,3

Supplement Tabelle 8.5 Expressionsprofil von CTCs isoliert aus einer Brustkrebspatientin (BCa2) angereichert über das Parsortix™-System (vergleiche Abbildung 3.11 (5) rote Pfeile)

| | Bca 2 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Parsortix |

Anhang

	CTC2	CTC3	CTC5	CTC8	CTC9	CTC10	CTC11
	Cq						
AHNAK	32,47	34,29	33,79	35,75	30,69	33,56	33,44
AKT1	30,79	39,37	31,03	31,7	30,39	N/A	29,48
BMP1	N/A						
BMP2	N/A						
BMP7	32,99	N/A	N/A	32,53	N/A	N/A	N/A
CALD1	36,08	32,34	N/A	N/A	N/A	N/A	33,13
CAMK2N1	34,08	37,67	33,51	N/A	31,18	32,22	31,39
CAV2	N/A						
CDH1	31,34	N/A	34,11	32,93	N/A	32,22	N/A
CDH2	32,44	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	33,41
COL1A2	33,03	N/A	N/A	34,05	N/A	33,49	33,39
COL3A1	31,18	32,92	36,56	36,84	36,08	36,81	32,93
COL5A2	31,6	N/A	N/A	33,45	N/A	N/A	N/A
CTNNB1	34,46	N/A	35,81	N/A	34,64	32,76	34,05
DSC2	N/A	N/A	N/A	32,92	35,61	N/A	N/A
DSP	28,8	32,77	29,23	31,58	26,78	33,17	28,09
EGFR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	31,97	32,71
ERBB3	32,33	N/A	33,09	37,6	31,48	35,14	33,42
ESR1	32,83	N/A	N/A	41	31,64	N/A	33,86
F11R	29,47	32,83	31,13	32,67	29,53	36,28	29,51
FGFBP1	32,21	N/A	N/A	36,24	N/A	N/A	N/A
FN1	32,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
FOXC2	N/A						
FZD7	34,57	N/A	N/A	38,06	N/A	N/A	N/A
GNG11	N/A	N/A	N/A	32,75	N/A	N/A	N/A
GSC	39,22	N/A	37,62	35,18	35,08	34,17	34,51
GSK3B	32,26	N/A	N/A	N/A	33,05	40,3	N/A
IGFBP4	36,21	39,53	37,9	39,42	40,29	38,57	38,87
IL1RN	32,11	N/A	31,35	40,75	35,24	N/A	31,08
ILK	31,72	31,04	31,91	32,69	30,12	30,24	29,94
ITGA5	33,31	N/A	N/A	31,26	N/A	N/A	N/A
ITGAV	31,96	36,33	32,92	N/A	33,55	32,72	N/A
ITGB1	30,48	34,13	36,83	N/A	31,39	N/A	31,61
JAG1	32,66	N/A	N/A	N/A	N/A	32,09	33,47
KRT14	33,64	33,43	37,55	39,29	38,79	35,78	38,01
KRT19	28,03	30,42	30,58	31,06	27,35	28,34	26,36
KRT7	32,1	33,67	33,08	33,54	30,01	31,13	29,33
MAP1B	31,34	N/A	N/A	N/A	33,08	N/A	33,4
MMP2	33,23	40,39	37,55	N/A	38,91	37,28	N/A
MMP3	32,26	N/A	N/A	N/A	N/A	31,41	N/A
MMP9	33,44	N/A	37,61	32,3	37,82	N/A	40,68
MSN	33,62	33,99	33,07	33,74	33,8	33,45	31,31
MST1R	N/A	N/A	N/A	35,74	34,2	N/A	N/A
NODAL	31,19	N/A	N/A	N/A	37,1	32,68	31,69
NOTCH1	38,26	37,68	38,44	39,05	38,43	37,55	36,34
NUDT13	33,02	33,24	32,18	33,76	35,71	33,36	35,19
OCLN	32,3	40,45	34,6	N/A	33,07	N/A	34,51

Anhang

PDGFRB	N/A	N/A	38,65	N/A	N/A	N/A	N/A
PLEK2	N/A	N/A	N/A	35,41	32,34	N/A	N/A
PPPDE2	30,79	N/A	31,9	33,74	33,53	N/A	32,96
PTK2	32,38	N/A	34,33	35,93	31,46	N/A	33,45
PTP4A1	31,8	38,01	32,01	33,09	40,19	39,42	33,27
RAC1	30,69	32,17	34,22	34,61	30,18	38,48	32,26
RGS2	30,34	N/A	32,99	N/A	N/A	N/A	N/A
SERPINE1	31,87	N/A	N/A	N/A	32,96	N/A	31,76
SIP1	33,17	N/A	32,4	N/A	32,15	40,05	31,27
SMAD2	31,3	N/A	N/A	33,06	31,54	N/A	30,91
SNAI1	38,23	N/A	N/A	37,96	N/A	N/A	37,73
SNAI2	31,83	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	33,68
SNAI3	32,72	38,7	39,04	38,03	38,71	38,69	32,09
SOX10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	40,93
SPARC	32,7	37,21	37,14	36,92	38,07	34,14	33,04
SPP1	34,31	38,85	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
STAT3	32,39	35,91	N/A	31,62	32,2	32,88	34,03
STEAP1	31,9	N/A	36,06	38,21	N/A	N/A	N/A
TCF3	31,71	N/A	33,01	35,18	N/A	N/A	32,44
TCF4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,88
TFPI2	31,93	N/A	N/A	32,25	N/A	N/A	N/A
TGFB1	30,48	N/A	N/A	33,11	N/A	N/A	N/A
TGFB2	31,47	N/A	N/A	31,63	30,61	N/A	31,57
TGFB3	30,67	N/A	31,24	31,53	30,85	33,65	30,49
TIMP1	34,49	35,18	36,32	36,37	32,69	N/A	33,51
TMEFF1	31,72	N/A	N/A	35,34	N/A	N/A	N/A
TMEM132A	33,12	38,44	32,4	39,38	32,76	31,51	35,04
TSPAN13	29,1	30,14	30,03	29,94	27,58	29,91	28,66
TWIST1	N/A						
VCAN	N/A	37,67	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VIM	31,52	39,23	35,73	34,08	39,19	38,39	32,39
VPS13A	32,2	33,83	N/A	N/A	33,64	35,03	N/A
WNT11	37,93	N/A	N/A	38,5	N/A	N/A	38,06
WNT5A	34,06	35,58	35,78	35,75	35,31	35,12	35,49
WNT5B	31,06	N/A	N/A	34,27	N/A	N/A	N/A
ZEB1	31,37	N/A	N/A	33,9	N/A	N/A	N/A
ZEB2	30,65	N/A	N/A	N/A	N/A	37,52	35,01
ACTB	27,66	30,19	28,66	28,99	26,96	27,41	25,55
B2M	28,3	28,76	28,3	30,76	27,36	27,43	26,39
GAPDH	27,23	31,1	29,48	30,05	25,87	28,69	27,27
HPRT1	32,7	N/A	N/A	33,07	32,77	32,62	34,59
RPLP0	25,99	28,17	26,15	28,4	24,56	24,71	25,05

Supplement Tabelle 8.6 Expressionsprofile von CTCs isoliert von einem Prostatakrebspatienten (vergleiche Abbildung 3.11 (1) blaue Pfeile)

	CTC1	CTC2	CTC3	CTC4	CTC5	CTC6	CTC7	CTC8
ACACA	23,92	29,61	25,01	30,41	N/A	26,32	31,43	29,75

Anhang

AKT1	28,15	31,66	26,56	27,83	28	26,42	28,77	29,26
APC	N/A	N/A	25,81	N/A	39,2	N/A	N/A	N/A
AR	24,1	N/A	25,45	30,11	38,36	23,49	31,44	29,75
ARNTL	N/A	33,18	27,68	N/A	N/A	30,3	N/A	N/A
BCL2	24,09	32,64	26,01	33,06	32,72	23,4	32,44	34,97
CAMKK1	N/A	28,8	N/A	N/A	N/A	30,62	40,67	N/A
CAMSAP1	25,4	20,06	22,85	22,87	N/A	24,78	N/A	29,44
CASP3	33,01	27,54	23,94	33,15	N/A	24,77	N/A	24,19
CAV1	N/A	21,89	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CAV2	N/A	40,9	40,7	38,48	N/A	39,08	37,78	N/A
CCNA1	N/A	N/A	33,51	32,55	N/A	N/A	N/A	N/A
CCND1	26,77	29,3	25,11	33,1	N/A	28,21	32,14	28,7
CCND2	29,52	27,87	22,8	N/A	40	22,66	N/A	31,53
CDH1	22,48	23,2	24,3	25,91	39,44	23,7	32,53	24,76
CDKN2A	23,68	20,34	20,4	32,54	28,82	22,53	33,23	30,9
CLN3	23,66	N/A	21,14	24,66	N/A	22,04	N/A	22,61
CREB1	32,94	24,65	23,12	31,88	N/A	N/A	N/A	N/A
DAXX	31,22	40,81	28,09	32,8	38,12	N/A	33,16	N/A
DDX11	27,32	40,69	29,09	38,47	39,54	29,67	N/A	38,72
DKK3	35,39	25,29	32,01	N/A	32,43	N/A	37,94	34,93
DLC1	N/A	N/A	40,06	N/A	32,28	N/A	39,56	N/A
ECT2	23,88	N/A	24,05	36,24	31,75	30,55	34,1	39,08
EDNRB	N/A	19,75	N/A	40,3	N/A	N/A	N/A	N/A
EGFR	25,81	27	40,93	40,11	30,28	33,43	31,28	N/A
EGR3	40,94	23,71	38,7	37,28	37,92	N/A	40,38	N/A
ERG	N/A	N/A	39,19	39,85	N/A	N/A	N/A	N/A
ETV1	30,78	32,57	N/A	31,99	N/A	32,48	N/A	N/A
FASN	26,46	20,69	25,31	30,42	38,66	26,86	28,41	25,61
FOXO1	26,08	21,55	25,68	27,71	36,05	N/A	N/A	26,8
GCA	24,61	N/A	22,12	25,3	N/A	23,92	N/A	30,65
GNRH1	N/A	29,12	N/A	N/A	N/A	30,04	N/A	N/A
GPX3	N/A	N/A	35,11	N/A	N/A	40,03	N/A	34,37
GSTP1	N/A	27,44	N/A	N/A	31,4	37,68	N/A	N/A
HAL	N/A	29,24	32,53	N/A	33,85	35,02	34,4	N/A
HMGCR	22,51	22,26	21,73	24,52	37,38	22,23	32,64	32,21
IGF1	N/A	40,78	N/A	N/A	N/A	40,72	N/A	N/A
IGFBP5	N/A	29,88	N/A	N/A	N/A	39,15	N/A	N/A
IL6	37,33	30,72	N/A	N/A	40,58	39,1	N/A	N/A
KLHL13	27,63	16,45	24,46	39,38	N/A	N/A	N/A	N/A
KLK3	20,86	35,78	18,95	23,74	32,65	20,43	26,89	24,26
LGALS4	32,76	N/A	30,07	N/A	N/A	N/A	N/A	33,45
LOXL1	29,52	N/A	40,2	37,65	38,48	33,6	39,05	40,11
MAPK1	24,12	N/A	23,49	24,82	32,06	27,66	29,33	32,82
MAX	33,23	N/A	29,29	N/A	31,66	30,16	31,12	33,12
MGMT	27,06	23,09	27,23	31,1	31,53	25,84	31,04	29,37
MKI67	N/A	36,31	N/A	31,91	36,8	33,1	38,66	N/A
MSX1	31,95	N/A	28,27	N/A	N/A	36,3	N/A	34,4
MTO1	22,2	N/A	21,64	N/A	36,28	23,31	N/A	21,13
NDRG3	27,28	32,11	N/A	40,59	N/A	25,09	31,69	23,64

Anhang

NFKB1	23,9	31,62	23,65	26,14	36,64	23,48	N/A	27,22
NKX3-1	17,21	40,07	17,62	23,22	N/A	17,46	31,1	20,18
NRIP1	30,01	27,1	31,44	26	39,39	35,18	32,12	23,66
PDLIM4	34,24	N/A	40,03	37,5	38,57	37,04	N/A	33,33
PDPK1	22,71	20,45	22,69	24,42	N/A	23,32	32,5	29,42
PES1	30,1	N/A	24,41	30,6	N/A	27,4	N/A	24,91
PPP2R1B	25,04	25,55	22,46	27,66	N/A	23,85	32,22	31,45
PRKAB1	N/A	38,28	26,81	N/A	32,25	25,41	N/A	N/A
PTEN	21,9	N/A	21,09	N/A	N/A	21,42	N/A	23,57
PTGS1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	39,86	40,03
PTGS2	33,85	28,02	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
RARB	24,22	N/A	23,6	N/A	N/A	23,3	N/A	N/A
RASSF1	31,72	N/A	31,44	30,24	39,76	36,35	N/A	N/A
RBM39	20,42	N/A	19,2	21,57	40,05	20,85	N/A	22,75
SCAF11	23,59	23,75	22,41	24,28	36,31	25,09	31,33	22,56
Sep7	21,86		21,58	25,7	31,66	23,64	32,17	25,53
SFRP1	35,18	N/A	37,95	40,01	40,75	N/A	34,99	N/A
SHBG	N/A	31,53	34,61	37,72	N/A	N/A	40,13	N/A
SLC5A8	40,22	33,06	N/A	N/A	39,34	N/A	N/A	N/A
SOCS3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	39,04	N/A	N/A
SOX4	39,06	27,43	35,84	N/A	39,43	35,91	N/A	33
SREBF1	28,56	N/A	25,55	27,37	N/A	28,12	33,1	25,87
STK11	31,52	N/A	26,89	32,77	38,86	30,98	35,9	30,91
SUPT7L	22,27	N/A	20,79	23,62	N/A	21,53	30,07	26,92
TFPI2	32,68	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,5
TGFB111	37,12	29,03	35,82	N/A	N/A	37,29	N/A	40,22
TIMP2	22,5	N/A	24,41	27,69	N/A	22,79	32	26,85
TIMP3	32,59	N/A	36,45	35,08	36,97	38,07	40,04	38,06
TMPRSS2	19,76	24,09	17,54	22,7	30,17	17,67	29,99	19,51
TNFRSF10D	N/A	19,77	N/A	N/A	39,89	39,29	N/A	N/A
TP53	29,29	N/A	26,01	N/A	38,08	27,9	32,26	31,25
USP5	25,35	39,25	23,46	32,92	N/A	23,62	N/A	30,15
VEGFA	22,21	35,21	19,37	20,38	40,97	21,01	33,56	25,27
ZNF185	N/A	N/A	N/A	33,17	39,27	N/A	39,17	N/A
ACTB	18,29	22,7	18	21,53	31,35	18,07	25,72	20,73
B2M	20,64	N/A	18,1	21,36	25,41	19,93	25,3	21,34
GAPDH	19,21	22,21	16,79	20,05	25,98	18,41	25,7	20,46
HPRT1	24,04	19,7	23,09	30,45	30,04	26,51	30,24	23,41
RPLP0	15,45	N/A	13,35	17,11	22,57	14,62	21,75	16,3
HGDC	31,71	N/A	33,87	40,27	33,16	34,51	36,81	N/A
RTC	N/A	N/A	N/A	36,38	38,08	N/A	40,21	N/A
RTC	N/A	N/A	N/A	N/A	40,37	N/A	N/A	N/A
RTC	N/A							
PPC	20,33	31,3	19,97	19,93	19,34	20,12	20,17	20,35
PPC	20,34	36,42	19,97	19,87	19,29	20,15	20,18	20,28
PPC	20,54	19,87	20,13	20,03	19,43	20,33	20,34	20,47

Anhang

Supplement Tabelle 8.7 Expressionsprofil von CTCs isoliert von einem Prostatakrebspatienten (vergleiche Abbildung 3.11 (2) graue Pfeile)

	CTC1	CTC2	CTC3	CTC4	CTC6	CTC7	CTC8
AGR2	25,8	26,08	27,28	25,57	29,22	28,31	25,36
AHR	24,79	28,57	26,41	27,79	25,66	N/A	25,02
TUBB	30,39	28,81	34,43	N/A	N/A	N/A	28,4
ACTB	23,68	25,3	26,41	23,89	26,27	24,84	23,35
YWHAZ	24,58	25,07	27,57	26,03	29,16	26,07	25,79
B2M	24,19	23,39	24,48	23,44	26,45	25,01	22,87
UBC	25	23,85	25,27	24,84	26,31	26,37	25,05
TBP	N/A						
AR	26,84	27,78	27,4	28,63	28,43	29,24	26,94
RPLP	21,7	21,96	23,43	22,36	22,52	22,37	22,62
CDH2	N/A						
ANXA2R	31,05	N/A	N/A	N/A	29,44	N/A	N/A
GUSB	N/A	27,31	N/A	30,12	N/A	29,09	N/A
HPRT1	28,6	26,79	29,13	N/A	29,08	26,03	N/A
ADAM17	N/A						
AKT2	28,27	N/A	N/A	N/A	N/A	27,78	N/A
ALDH	N/A						
AURKA	N/A						
CCND1	25,82	28,47	27,73	26,41	27,68	27,09	28,22
CD24L4	25,19	26,64	N/A	24,61	26,9	26,2	N/A
ARV7	29,45	N/A	N/A	29	N/A	N/A	28,81
AKR1C3	N/A						
CYP11A1	N/A						
CYP17A1	N/A						
CD44_all	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	24,32
CDH1_1	25,44	26,62	28,82	26,82	28,07	27,59	N/A
CTSD	28,76	27,98	N/A	28,05	N/A	N/A	27,37
EGFR	30,76	27,92	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
EPCAM	26,09	25,21	26,35	25,24	26,81	26,33	25,36
ERBB2	25,99	27,03	27,43	29,68	N/A	29,26	27,96
ESR1	N/A						
VEGFR1	N/A						
CDH11	N/A						
CYP19A1	N/A						
BCL2	N/A						
DDR1	31,03	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
FOXO	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,71
H2AFZ	24,76	23,98	25,79	25,1	24,41	23,63	23,84
HDAC2	26,64	25,56	N/A	26,33	N/A	25,62	N/A
IBSP_1	N/A						
IGFR	N/A						
KI67	N/A	26,26	N/A	N/A	26,95	25,36	N/A
KIT_1	N/A						
TUBB3	N/A						

Anhang

CXCR4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	26,36
ESR2	N/A						
FOLH1	22,46	23,44	25,2	24,09	25,57	25,21	25,29
NCOA1	N/A						
KRT19	26	26,83	26,27	26,22	N/A	28,31	26,43
MCM4	28,59	28,45	N/A	N/A	N/A	27,41	N/A
MET_1	N/A						
MRP2	N/A						
MRP1	N/A	28,01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MRP4	28,18	25,84	N/A	26,89	29,14	29,83	27,91
MRP5	29,22	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MTOR	N/A	N/A	N/A	28,14	N/A	N/A	N/A
NES	N/A						
KLK3	25,36	27,02	26,88	26,76	28,72	28,9	27,15
MCL1	27,38	26,35	28,56	25,97	27,08	27,64	25,37
MDK	36,83	N/A	N/A	N/A	36,19	33,17	N/A
MUC1	N/A	29,18	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Myc_6	32,77	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	32,11
PARP	26,29	26,23	28,81	29,55	26,75	25,1	26,8
PGR	N/A						
PI3KCA	N/A	N/A	28,87	N/A	N/A	N/A	N/A
PTEN	26,95	N/A	N/A	28,28	N/A	28,42	25,39
CD45 / PTPRC	N/A						
RAD51	N/A	28,68	29,27	N/A	27,41	27,07	N/A
RUNX2	N/A						
SRD5A1	29,12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	28,12
STAT3	27,48	N/A	N/A	27,06	28,08	N/A	25,55
SNAI1	N/A						
SATB1	N/A						
SCGB2A / MAM	N/A						
TOP2A	30,36	N/A	N/A	29,47	26,35	27,27	27,13
TP53	25,73	29,5	28,24	28,54	N/A	27,33	N/A
Twist1	28,16	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
UPA	N/A						
TACSTD2	27,59	28,6	30,17	29,35	29,05	29,62	27,49
VIM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	27,42	23,1
SHH	N/A						
SPINK1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	26,19
PROM1	N/A						
TNFSF11	N/A						
WHSC1L1_L1	N/A						
WHSC1S1_S1	N/A	N/A	N/A	29,31	N/A	27,66	N/A
CCNE2	N/A	N/A	N/A	N/A	27,79	N/A	29
PPIC	29,07	27,68	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SLC6A8	29,59	N/A	N/A	N/A	30,46	N/A	N/A
Hjarp	N/A						
EMP2	28,9	34,85	N/A	N/A	N/A	27,41	N/A
MAL2	27,1	27,08	29,18	26,94	28,18	38,09	26,84
PTCH1	N/A						

Anhang

XIAP	29,34	N/A	N/A	27,98	29,3	N/A	N/A
POU5F1	31,65	N/A	N/A	31,04	27,92	N/A	28,4
PSCA	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Supplement Tabelle 8.8 Expressionsprofil von zwei CTCs isoliert aus einer Brustkrebspatientin (vergleiche Abbildung 3.11 (3) orange Pfeile)

	CTC CellSearch		CTC Parsortix
ACKR3	N/A		32,09
AICDA	N/A		38,17
BCL2		34,05	32,48
BCL2L1		32,24	31,1
CCL18		33,45	31,64
CCL2		35,79	35,69
CCL20		32,64	31,53
CCL21		36,23	32,5
CCL22	N/A	N/A	
CCL28		38,65 N/A	
CCL4		23,52	18,79
CCL5		28,87	33,31
CCR1		40,81 N/A	
CCR10		33,11	32,87
CCR2		38,46	35,58
CCR4		34,5 N/A	
CCR7	N/A	N/A	
CCR9	N/A		35,01
CD274		35,31 N/A	
CSF1		37,14	32,77
CSF2		34,3	32,48
CSF3		33,05	34,56
CTLA4	N/A		34,23
CXCL1		32,49	29,45
CXCL10		36,04 N/A	
CXCL11		36,22 N/A	
CXCL12		31,15	30,16
CXCL2		36,13	26,73
CXCL5	N/A		35,88
CXCL9		27,12	32,9
CXCR1		34,64	36,45
CXCR2		32,35	31,67
CXCR3	N/A		37,71
CXCR4		38,18 N/A	
CXCR5	N/A		37,88
EGF		33,4	36,37
EGFR		33	30,8
FASLG		33,08	31,07
FOXP3	N/A		30,91
GBP1		33,75	27,21
GZMA	N/A		32,22

Anhang

GZMB		32,45	31,67
HIF1A	N/A		32,38
HLA-A		35,53	36,52
HLA-B		34,35	33,58
HLA-C		23,78	21,91
IDO1		35,27	34,33
IFNG		32,47	30,54
IGF1		32,15	30,43
IL10		31,98	29,33
IL12A	N/A		32,9
IL12B	N/A		37,5
IL13	N/A		32,21
IL15		33,49	24,29
IL17A	N/A		35,13
IL1A	N/A		37,21
IL1B	N/A		22,62
IL2		35,41	34,34
IL23A	N/A		36,24
IL4		34,58	31,92
IL6		34,6	33,29
IL8	N/A		24,89
IRF1		37,44	31,54
KITLG		34,58	N/A
MICA	N/A		N/A
MICB		37,95	30,65
MIF		26,61	22,83
MYC		30,86	24,23
MYD88		32,16	24,12
NFKB1	N/A		29,26
NOS2		33,18	31,27
PDCD1		34,9	33,12
PTGS2	N/A		33,1
SPP1		34,22	31,6
STAT1		26,61	27,28
STAT3	N/A		33,65
TGFB1		35,26	24,45
TLR2		36,04	34,88
TLR3	N/A		32,21
TLR4	N/A		35,1
TNF	N/A		28,1
TNFSF10		30,89	26,1
TP53		32,08	30,43
VEGFA	N/A		23,59
ACTB		25,01	26,75
B2M		23,12	22,76
GAPDH		24,53	24,33
HPRT1		31,32	30,94
RPLP0		22,57	21,03
HGDC	N/A		33,28

Anhang

RTC	N/A	N/A
RTC		37,56 N/A
RTC	N/A	N/A
PPC		21,95 22,12
PPC		21,85 22,12
PPC		22,07 22,29

Supplement Tabelle 8.9 Expressionsprofile von MDA-231, MDA-468 sowie CTC-ITB-01-Zelllinienzellen

Gene	Abkürzung	231	468	CTC-ITB-01
V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	25,25	25,66	24,73
Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	CDH1	31,19	26,03	24,45
Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	CDH2	32,06	40,66	40
Epidermal growth factor receptor	EGFR	25,38	23,37	40
V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	ERBB3	31,06	28,32	26,63
Estrogen receptor 1	ESR1	40	34,49	28,55
Fibronectin 1	FN1	26,33	30,74	34,23
Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	ITGA5	24,18	30,99	28,49
Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	26,26	27,87	26,55
Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	21,01	24,2	22,66
Jagged 1	JAG1	25,47	28,2	31,83
Keratin 14	KRT14	39,31	29,52	34,09
Keratin 19	KRT19	22,04	19,71	19,84
Keratin 7	KRT7	21,85	21,1	20,64
Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	MMP2	38,09	32,17	32,45
Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MMP3	35,17	40	36,43
Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	MMP9	33,7	32,85	34,99
Notch 1	NOTCH1	28,4	30,26	30,62
Vimentin	VIM	19,24	30,26	36
Actin, beta	ACTB	17,63	18,52	18,47

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit ergreifen, all denjenigen zu danken, die zu dieser Arbeit im Wesentlichen beigetragen haben.

Mein größter Dank geht an die Patientinnen und Patienten, die trotz ihrer schweren Krebserkrankung die Bereitschaft zeigten, Blut- und Gewebematerial zu spenden und so die klinische Forschung überhaupt erst ermöglichen!

Ein sehr großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, der es mir ermöglichte meine Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können. Ich kann mir keinen anderen Arbeitsplatz vorstellen an dem ich die Möglichkeit gehabt hätte an so vielen hoch relevanten Themengebieten zu arbeiten sowie eine verantwortungsvolle Rolle in der Projektkoordination übernehmen zu können. Darüber hinaus möchte ich mich für die spannenden Diskussionen, interessanten Fragestellungen und hilfreichen Ratschläge bedanken.

Ein besonders großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Tobias Gorges, der mich während meiner Promotion bestmöglich unterstützte, mir motivierend beiseite stand und stets offen für Fragen und Anregungen war. Ich konnte sehr viel von seinen innovativen Ideen und wertvollen Hilfestellungen lernen, was die Qualität der Ergebnisse meiner Doktorarbeit maßgeblich beeinflusst hat. Neben der guten Zusammenarbeit möchte ich Dir auch für eine sehr schöne Zeit, viele lustige Momente und persönliche Gespräche danken, an die ich mich gerne zurück erinnere.

Mein nächster Dank geht an PD Dr. Sabine Riethdorf, die durch ihr beeindruckendes Fachwissen und innovativen Ideen und Vorschläge eine große Hilfestellung während meiner Promotion war. Ich konnte von ihrem großen Erfahrungsschatz profitieren und fühlte mich stets gut aufgehoben und betreut.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Prof. Dr. Julia Kehr, die sich bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit als Gutachter zu betreuen und mich bei Fragen und Anliegen stets unterstützte. Prof. Dr. Wim Walter möchte ich für die Bereitschaft danken, als Mitglied meiner Prüfungskommission an meiner Disputation teilzunehmen.

Ein großer Dank gilt auch den vielen Kooperationspartnern, ohne die, die Erstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Dabei möchte ich die enge Zusammenarbeit mit der Martiniklinik (Prof. Dr. Thorsten Schlomm, Dr. Burkhard Beyer, Dr. Sandra Prues, Dr. Pierre Tennstedt und Frau Marion Sommer) und mit Prof. Dr. Volkmar Müller aus der Frauen-Tagesklinik, für die Bereitstellung der Patientenproben, besonders hervorheben. Zusätzlich möchte ich den Kooperations-

Danksagung

partnern der TRANSCAN-Studie für die tolle Zusammenarbeit und interessanten Diskussionen auf internationalen Kongressen danken.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Tumorbilogie für eine tolle Zeit in lockerer Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Conny, Antje, Malgorzata und Oliver für ihre Hilfe und Unterstützung aber auch für viele schöne und lustige Momente. Ganz besonders bedanke ich mich bei unserer UKE-Crew Claudia, Anna, Katharina, Tobias und Simon für die Hilfbereitschaft & Unterstützung, witzige Abende und die besten Ausflüge zu Elenas. Ohne euch wär meine Zeit hier nur halb so schön gewesen. Danke Team-A,C&A für die vertrauten Gespräche, aufbauenden Worte und tollen Momente.

Ein ganz großer Dank geht an meine Familie und Freunde, die immer für mich da waren, mich bestärkt und aufgebaut oder sich mit mir gefreut haben. Es ist schön zu wissen, dass man sich immer auf euch verlassen kann! Vielen Dank Jenice, Anka, MeliM, Gesa, MeliS, Samy, Alisha und dem Rest der Girls für ein sehr abwechslungsreiches Alternativprogramm zum Labor und die tolle Zeit mit euch.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andra Kuske
 Geburtsdaten: 02.02.1988 Groß-Gerau
 Nationalität: Deutsch
 Familienstand: Ledig

Ausbildung

Mai 2013 – heute Doktorandin an der Universität Hamburg
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für
 Tumorbologie, Direktor Prof. Dr. Klaus Pantel

*„Detektion, molekulare und funktionale Charakterisierung
 zirkulierender Tumorzellen von Patienten mit Prostata-
 oder Mammakarzinom“*

- CellSearch®-System, GILUPI CellCollector®,
 EPISPOT-Assay, IFA, IHC, ICC
- Multiplex-RNA-Analysen von Einzelzellen
- Mutationsanalysen
- Primärkultur

Feb. – Dez. 2012 Masterarbeit Beiersdorf AG, Hautforschung, Labor
 Molekular-biologie (1,0) (extern)

- *Anti-Aging* Forschung: Molekularbiologische
 Methoden (*real-time* PCR, Western Blot, IFA, IP)

Okt. 2010 – Dez. 2012 Master of Science der Biowissenschaften (Schwerpunkt
 Molekulare Biomedizin) an der Westfälischen
 Wilhelmsuniversität Münster Ø 1,1

Okt. 2007 – Aug. 2010 Bachelor of Science der Biowissenschaften an der
 Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster Ø 1,7

Aug. 1998 – Juli 2007 Allgemeines Abitur Ø 1,8
 Gymnasium Remigianum Borken

Auslandserfahrung

Aug. 2009 – Feb. 2010 Auslandsstipendium über das Europäisches
 Studienaustausch-programm (ERASMUS) in Alicante
 (Spanien) an der “Universidad de Alicante“

- genética, fisiología animal, inmunología

Praktische Erfahrungen

- Mai 2013 – heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Tumorbiologie, Direktor Prof. Dr. Klaus Pantel
- Projektmanagement
 - Koordination einer multizentrischen internationalen klinischen Studie (TRANSCAN)
- Okt. 2011 – Dez. 2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter Beiersdorf AG, Skin Research, Labor Molekularbiologie
- *Anti-Aging* Forschung: Molekularbiologische Methoden (*real-time* PCR, Western Blot, IFA, IP)
- Aug. – Sept. 2007 Qualitätskontrolle in der Abteilung Clinical Products Miltenyi GmbH

11 Publikationen

Publikationen

- Kuske, A.**, T. M. Gorges, P. Tennstedt, A. Tiebel, R. Pompe, F. Preißer, S. Prues, M. Mazel, A. Markou, E. Lianidou, S. Peine, C. Alix-Panabières, S. Riethdorf, B. Beyer, T. Schlomm and K. Pantel (2016). "Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients" Scientific Reports. [provisionally accepted]
- Gorges, T. M.*, **A. Kuske***, K. Rock, O. Mauermann, V. Muller, S. Peine, K. Verpoort, V. Novosadova, M. Kubista, S. Riethdorf and K. Pantel (2016). "Accession of Tumor Heterogeneity by Multiplex Transcriptome Profiling of Single Circulating Tumor Cells." Clin Chem. [ahead of print] *equal contribution
- Gorges, T. M., S. Riethdorf, O. von Ahsen, P. Nastaly, K. Rock, M. Boede, S. Peine, **A. Kuske**, E. Schmid, C. Kneip, F. König, M. Rudolph and K. Pantel (2016). "Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells - a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer." Oncotarget. [ahead of print]
- Chen, S., A. El-Heliebi, G. Tauber, T. Langsenlehner, M. Pötscher, K. Kashofer, Z. T. Czyż, B. Polzer, S. Riethdorf, **A. Kuske**, G. Leitinger, K. Pantel, T. Kroneis and P. Sedlmayr (2016). "Characterization of circulating tumor cells isolated using a functionalized in vivo detector: from enumeration to single cell analysis" IJMCM [submitted Sept. 2016]
- Scharsack, J. P., F. Franke, N. I. Erin, **A. Kuske**, J. Buscher, H. Stolz, I. E. Samonte, J. Kurtz and M. Kalbe (2016). "Effects of environmental variation on host-parasite interaction in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*)." Zoology (Jena) 119(4): 375-383.
- Dittmar, J., H. Janssen, **A. Kuske**, J. Kurtz and J. P. Scharsack (2014). "Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*)." J Anim Ecol 83(4): 744-757.

Kongressbeiträge

- Kuske et al.: Comparison of different approaches for the detection and characterization of circulating tumor cells in high-risk prostate cancer patients. International Symposium on Minimal Residual Cancer (ISMRC) Hamburg, Deutschland
- Kuske et al.: The GILUPI CellCollector - a new *in vivo* approach for the isolation of circulating tumor cells in cancer patients. Advances in Circulating Tumour Cells (ACTC) 2014, Kreta, Griechenland
- Kuske et al.: Comparison of different approaches for the enumeration and molecular characterization of circulating tumor cells (CTCs) as novel biomarkers in cancer patients. Congress for Personalized Medicine (Permedicon) 2014, Köln, Deutschland

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den



Andra Cleuske

Unterschrift