

Expressionsanalyse zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Biol. Veit Zieglschmid

geb. am 30. April 1972 in Wolfsburg

2003

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto

Koreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 14.07.2003

3.6.3.2.	Dynabead®-Selektion für Tumorzellnachweis mittels RT-PCR.....	28
3.6.3.3.	Dynabead®-Selektion für Tumorzellnachweis mittels Immunzytochemie und Immunfluoreszenz.....	29
3.7.	Analyse gefärbter Zellen.....	30
3.7.1.	Fluoreszenzmikroskopie.....	30
3.7.2.	Durchflusszytometrie.....	30
3.8.	Expressionsanalyse mittels RT-PCR.....	31
3.8.1.	Isolierung von mRNA.....	31
3.8.2.	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	32
3.8.2.1.	Reverse Transkription.....	32
3.8.2.2.	PCR.....	32
3.8.3.	DNA-Fragmentanalyse.....	34
3.9.	Identifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente.....	34
3.9.1.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.9.2.	Ligation der DNA-Fragmente.....	35
3.9.3.	Transformation klonierter DNA-Fragmente.....	36
3.9.4.	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
3.9.5.	Sequenzierung.....	37
3.9.5.1.	Sequenzierungs-PCR.....	38
3.9.5.2.	Reinigung der markierten DNA-Fragmente.....	38
3.9.5.3.	Automatische Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese.....	38
3.10.	Tumormarkernachweis im Blutserum.....	39
3.10.1.	ELISA.....	39
3.11.	Tumorzellnachweis in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen.....	39
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Untersuchung der Expression von tumorassoziierten Oberflächenproteinen.....	41
4.1.1.	Phänotypisierung und Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien.....	41
4.1.1.1.	Antikörperauswahl mittels Durchflusszytometrie.....	41
4.1.1.2.	Durchflusszytometrische Darstellung von Tumorzellen im Blut.....	44
4.1.1.3.	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tumorzellen im Blut.....	46
4.1.1.4.	Zytokeratinnachweis in Brustkrebszellen.....	47

4.1.2. Zellzyklusanalyse.....	49
4.2. Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut.....	51
4.2.1. Immunomagnetische Selektion mit verschiedenen Antikörpern.....	51
4.2.2. Nachweis tumorassoziierter Transkripte in Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR.....	53
4.2.2.1. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem MCF7	53
4.2.2.2. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem SKBR3.....	55
4.2.2.3. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem 1590	56
4.2.2.4. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem HNEC.....	58
4.2.3. Immunzytochemischer Nachweis von SKBR3-Zellen nach immunomagnetischer Selektion.....	60
4.3. Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen.....	61
4.3.1. Nachweis disseminierter Tumorzellen in Brustkrebspatientinnen mittels Multiplex-RT-PCR.....	61
4.3.2. Identifizierung des 320 bp-Fragmentes mittels Sequenzvergleich....	66
4.3.3. Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in Brustkrebspatientinnen.....	66
4.3.4. Nachweis von Tumormarkerserumproteinen mittels ELISA...67	
4.3.5. Zusammenfassende Analyse der Untersuchungsergebnisse des Patientinnenkollektiv.....	69
5. Diskussion.....	71
6. Literaturverzeichnis.....	86
Anhang	
Abkürzungsverzeichnis.....	99
Eidesstattliche Erklärung.....	101
Danksagung.....	102
Publikationen.....	103
Lebenslauf.....	104

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein molekulares System für den Nachweis disseminierter Brustkrebszellen entwickelt, welches in der klinischen Diagnostik als „Monitoring“-Verfahren für operierte und unter Chemotherapie-Behandlung stehende Patienten angewendet werden kann. Es besteht aus einer präanalytischen Anreicherung von Tumorzellen mittels einer Kombination von Antikörpern und einer folgenden Multiplex-RT-PCR der vier molekularen Tumormarker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 sowie einer internen AKTIN-Kontrolle. Das Tumorzellnachweissystem wurde zunächst erfolgreich *in vitro* mit etablierten Brustkrebszelllinien und Blut gesunder Spender etabliert und anschließend dazu verwendet, zirkulierende Tumorzellen in peripherem Blut von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs nachzuweisen und anhand ihres Tumormarkerepressionsprofils zu charakterisieren.

Es konnte eine deutliche Heterogenität hinsichtlich des untersuchten Tumormarkerepressionsprofils in zirkulierenden Brustkrebszellen nachgewiesen und somit der Vorteil des verwendeten multimarkerbasierten Nachweissystems demonstriert werden. Im peripheren Blut von 15 der insgesamt 21 (71,4 %) untersuchten Patientinnen konnten Tumorzellen erfolgreich mit dem etablierten System nachgewiesen werden. In einem parallel durchgeführten immunzytochemischen Tumorzellnachweis konnte nur bei sechs der 15 Patientinnen (40 %), bei denen durch Multiplex-RT-PCR Tumorzellen identifiziert wurden, ebenfalls Tumorzellen nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die Spezifität und höhere Nachweissensitivität des Tumorzellnachweises mittels Multiplex-RT-PCR.

Als Vergleich mit der klinischen Routinediagnostik wurde die Konzentration der Proteine CA15.3 und CEA im Serum der Patientinnen mittels ELISA bestimmt. Zirkulierende Tumorzellen wurden hauptsächlich bei Patientinnen mit erhöhten, vereinzelt aber auch bei Patientinnen mit gering oder nicht erhöhten CA15.3- und CEA-Serumkonzentrationen detektiert, was die Effizienz der etablierten Nachweismethode hinsichtlich einer verlässlicheren Diagnose rezidivierenden Brustkrebses gegenüber der Tumormarker-Routinediagnostik hervorhebt. Das in der vorliegenden Arbeit *in vitro* etablierte Verfahren konnte somit in seiner Effizienz bestätigt werden, Tumorzellen auch in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen zu können und deren Expressionsprofil zu charakterisieren.

Schlagworte: Disseminierte Tumorzellen, Multiplex-RT-PCR, Expressionsprofil

Abstract

A molecular detection system for disseminated tumor cells was developed, which could be used to monitor patients after surgery and under chemotherapy treatment.

It consists of a preanalytic immunomagnetic enrichment of tumor cells using a panel of monoclonal antibodies followed by a multiplex-RT-PCR with the four molecular markers GA733.2, MUC1, HER2 and CLAUDIN7 as well as actin as an internal control. The *in vitro* tumor cell detection system was successfully developed using breast cancer cell lines and blood from healthy donors. Subsequently it was applied to detect disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with metastasized breast cancer and to characterize their expression profile.

A heterogeneous expression profile of the four molecular tumor markers could be detected in disseminated breast cancer cells, which proved the usefulness of the utilized multiple marker assay. Tumor cells were successfully detected in peripheral blood of 15 out of 21 patients (71.4 %) by multiplex-RT-PCR. A simultaneously performed tumor cell detection by immunocytochemistry revealed tumor cells in only six of 15 patients (40 %), in whom tumor cells were detected by RT-PCR. The results clearly showed the specificity and higher sensitivity of the tumor cell detection assay by multiplex-RT-PCR.

In order to compare the efficiency of the developed detection assay with routine clinical diagnostic procedures the concentrations of the proteins CA15.3 and CEA in blood serum were determined by ELISA. Disseminated tumor cells were mainly detected in patients with elevated, but sporadically also in patients with no or slightly elevated CA15.3 and CEA concentrations in serum. This demonstrates the efficiency of the tumor cell detection assay in terms of a more reliable diagnosis of relapsing breast cancer in contrast of the clinical routine diagnosis by CA15.3- and CEA-ELISA.

The efficiency of the established *in vitro* tumor cell detection assay was validated by detecting disseminated tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients with high specificity and sensitivity and by characterizing their expression profile.

Keywords: Disseminated tumor cells, multiplex RT-PCR, expression profile

1. Einleitung

Tumorerkrankungen epithelialer Gewebe

Maligne Tumore epithelialer Gewebe stellen die Mehrzahl aller Krebsneuerkrankungen dar und verursachen das Gros aller krebsbezogenen Todesfälle in den westlichen Industrieländern ((Pantel et Otte, 2001), (Pantel *et al.*, 1997)). Epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass Krebserkrankungen kardiovaskuläre Erkrankungen als häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen in der näheren Zukunft ablösen werden (Klein, 2000).

Das Charakteristikum von Tumorerkrankungen, welches auf das Überleben der Patienten den größten Einfluss ausübt, ist die Eigenschaft, Tochtergeschwülste, d. h. Metastasen zu bilden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Mortalität bei Krebserkrankungen zum größten Teil durch Metastasenbildung bedingt ist (Cunnick *et al.*, 2002). Durch Fortschritte in der Chirurgie der epithelialen Tumore wird die Letalität rate zunehmend durch die Anwesenheit von subklinischen Mikrometastasen bereits zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bestimmt ((Pantel et Otte, 2001), (Pantel *et al.*, 1997), (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1996)). Klinisch manifeste Metastasen repräsentieren einen der Hauptgründe für die Ineffektivität einer Therapie (Hill, 2001). Die Metastasierung kann als die letzte Stufe der Tumorprogression betrachtet werden, wobei unterschiedliche Tumortypen auch unterschiedliche Metastasierungsmuster aufweisen (Hill, 2001).

Der Metastasierungsprozess kann in eine Reihe von Einzelschritten unterteilt werden, welcher das Eindringen von Tumorzellen des Primärtumors in den Blutkreislauf („Intravasation“), das Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation, die Auswanderung der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf („Extravasation“), die Migration in den interstitiellen Raum und schließlich die Wachstumsinitiierung mit Bildung eines sekundären Tumors beinhaltet (Abb. 1) (Hill, 2001). Dieser Prozess ist als Metastasierungskaskade bekannt (Cunnick *et al.*, 2002).

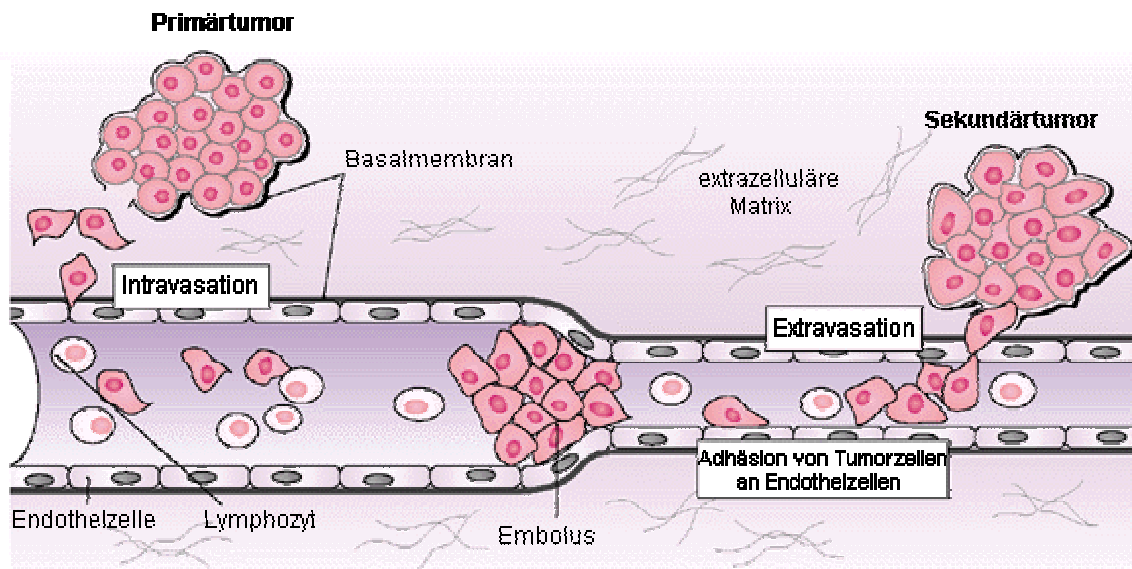


Abbildung 1: Metastasierungskaskade

Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade von soliden Tumoren.

Die Existenz von Tumorzellen im Blutkreislauf kann somit als notwendige Bedingung für die Entstehung klinisch manifester Metastasen angesehen werden (Brandt *et al.*, 2000).

Die meisten Methoden, die für das „Staging“, d. h. die Stadieneinteilung und die Detektion von Krebs verwendet werden, basieren auf bildgebenden Verfahren zur Detektion charakteristischer Läsionen oder auf Antikörperassays zum Nachweis tumorassoziierter Proteine im Blutserum (Burchill et Selby, 2000). Diesen Verfahren ist eine vergleichsweise geringe Nachweissensitivität eigen. Bildgebende Verfahren haben eine Tumorgößenaufösung von 0,5-1 cm und detektieren somit Tumore erst, wenn diese bereits aus 10^7 - 10^8 Zellen bestehen ((Bockmann *et al.*, 2001), (Smith *et al.*, 1999)). Erschwerend kommt hinzu, dass Tumorerkrankungen in der Regel erst Symptome hervorrufen, wenn der Primärtumor bereits eine Zellzahl von 10^{10} Zellen erreicht hat (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1996), d. h. die Diagnose wird meist in einem schon fortgeschrittenen Krankheitsstadium gestellt.

Brustkarzinom

Brustkrebs ist für ein Drittel aller Krebserkrankungen und für 15 % aller Krebstodesfälle bei Frauen in den USA verantwortlich. Im Jahr 2001 zeigte Brustkrebs in den USA nach superfizialem Hautkrebs die höchste Inzidenzrate und stellte die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen dar (Lacey *et al.*, 2002).

Brustkrebs stellt innerhalb der Krebserkrankungen eine Erkrankung dar, welche durch extreme Variabilität gekennzeichnet ist. So zeigen Überlebenskurven von Brustkrebspatienten, welche auf der Grundlage des Tumorstadiums und der Form der Behandlung angefertigt wurden, dass das Erreichen einer Plateau-Phase bis zu 10 Jahren dauern kann. Dieses Phänomen kann durch unabhängig von der Behandlung auftretende variable Rezidivraten erklärt werden. Die Überlebenskurven der meisten anderen Krebserkrankungen erreichen ein Plateau innerhalb von zwei bis fünf Jahren, weshalb Brustkrebs in dieser Hinsicht als eine außergewöhnliche Erkrankung innerhalb der Krebserkrankungen bezeichnet werden kann (Hadden, 1999).

Bisher konnte keine Einzelursache für die Brustkrebserkrankung identifiziert werden. Den stärksten Risikofaktor stellt eine positive Familienhistorie, d. h. eine genetische Prädisposition dar (Cunnick *et al.*, 2002). Bislang wurden drei Tumorsuppressorgene, BRCA1, BRCA2 und p53, identifiziert, welche in mutiertem Zustand die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen. So ist der Träger eines mutierten BRCA1-Gens mit einem bis zu neunzigfachen Lebenszeitrisko belastet, an Brustkrebs zu erkranken (Klaasen et Seeber, 1998). Allerdings führen hereditäre Ursachen nur in 5 % aller Fälle zu einer Brustkrebserkrankung, d. h. 95 % aller Brustkrebserkrankungen werden durch spontane genetische Mutationen ausgelöst (Cunnick *et al.*, 2002). Als umweltbedingte Risikofaktoren sind hauptsächlich die individuelle Östrogenmenge, der ein Individuum ausgesetzt ist, sowie Fettleibigkeit, Alkoholabusus und radiologische Bestrahlung zu nennen (Cunnick *et al.*, 2002).

Fast alle klinisch manifesten Brusttumore sind Adenokarzinome, d. h. Tumore, welche sich aus Drüsenepithelgewebe entwickeln (Hadden, 1999). Pathologisch ist Brustkrebs als invasives Brustkarzinom definiert, wobei unterschiedliche morphologische Typen des invasiven Brustkarzinoms existieren. Die häufigste Form mit einem Anteil von über 65 % ist das invasive duktale Brustkarzinom, gefolgt vom invasiven lobulären Brustkarzinom, welches einen Anteil von 10 % einnimmt (Cunnick *et al.*, 2002).

Die Metastasierung von Brustkrebs wird häufig beobachtet (Cunnick *et al.*, 2002). So zeigen bereits 7 % der Brustkrebspatientinnen bei der primären Diagnose eine weitgestreute Metastasierung (Khonji *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass 20-30 % der Axillarlymphknoten-negativen und 50-60 % der Axillarlymphknoten-positiven Brustkrebspatientinnen, welche zu Beginn der Erkrankung keine klinisch

manifesten Metastasen zeigten und sich einer kurativen chirurgischen Behandlung unterzogen, entfernte Metastasen entwickeln (Cunnick *et al.*, 2002). Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Mikrometastasen bereits bei der Primärdiagnose vorhanden waren und durch die Routinediagnostik nicht erkannt wurden. Aus diesem Grund wird auch von einigen Forschern die Ansicht vertreten, Brustkrebs generell als eine systemische Erkrankung zu betrachten (Cunnick *et al.*, 2002). Klinisch manifeste Fernmetastasen sind in Brustkrebspatienten hauptsächlich in Knochen, Leber und Lunge zu finden, wobei Knochenmetastasen mit einem Anteil von 50 % am häufigsten bei metastasiertem Brustkrebs anzutreffen sind (Khonji *et al.*, 2000).

Die klinische Diagnostik der metastasierenden Brustkrebserkrankung beruht auf bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Kernspintomographie, Skelettszintigraphie, radiologischen Verfahren wie Röntgen-Thorax und Computer-Tomographie (CT) und auf der Konzentrationsbestimmung serologischer Tumormarker (Klaasen et Seeber, 1998).

Serologische Marker, welche hauptsächlich für die Detektion und Verlaufskontrolle von Brustkrebs verwendet werden, sind das karzinoembryonale Antigen (CEA) und das karzinomassoziierte Protein CA15.3. CEA ist der bei verschiedenen Krebserkrankungen in der Diagnostik am meisten verwendete Tumormarker (Zusman et Ben-Hur, 2001). Hohe CEA-Serumkonzentrationen sind mit vielen malignen Erkrankungen wie Brust-, Kolon-, Magen-, Lungen- und Pankreaskrebs assoziiert (Zusman et Ben-Hur, 2001) und zeigen im Verlauf von drei Monaten nach Entfernung des Primärtumors einen starken Abfall (Engaras *et al.*, 1998). Allerdings ist die klinische Signifikanz einer erhöhten CEA-Konzentration im Blut von Brustkrebspatienten gering und schwankt zwischen 27 % und 32 % (Zusman et Ben-Hur, 2001). So werden erhöhte CEA-Konzentrationen bei 74 % von Patienten mit CEA-positivem Primärtumor und bei nur 9 % in Patienten mit CEA-negativen Primärtumor gefunden (Molina *et al.*, 1999). CEA besitzt daher in der Diagnose der Brustkrebserkrankung eine geringe Signifikanz (Zusman et Ben-Hur, 2001). CA15.3, d. h. das im Serum gelöste Protein des MUC1-Gens, ist der für die präklinische Detektion von Rezidiven und das „Monitoring“ von Patienten mit fortgeschrittener Brustkrebserkrankung am meisten verwendete Serummarker (Duffy *et al.*, 2000). In einer prospektiven Studie mit 368 Brustkrebspatienten konnte gezeigt werden, dass hohe präoperative CA15.3-Konzentrationen im Blut sowohl mit einer verkürzten krankheitsfreien Zeitspanne als auch mit einer allgemein verkürzten Überlebenszeit korreliert waren (Shering *et al.*,

1998). Es wird vermutet, dass hohe CA15.3-Konzentrationen im Blut von Brustkrebspatienten die tumorzellenspezifische T-Zell-Aktivität blockieren können und Tumorzellen auf diese Weise der Kontrolle durch das Immunsystem entzogen werden (Duffy *et al.*, 2000). Als Marker für die Detektion von Metastasen wird CA15.3 in Patienten mit Brust-, Kolon- und Ovarialkrebs verwendet. Er ist aber für das „Monitoring“ von Patienten nach Tumorentfernung ungeeignet (Zusman et Ben-Hur, 2001). Weiterhin wurden falsch-positive CA15.3-Konzentrationserhöhungen hinsichtlich der Tumormarkerfunktion nach therapeutischer Gabe von „Granulocyte-colony stimulating factor“ (G-CSF) beobachtet (Ruibal et de La Piedra, 2002).

Die Therapie des Brustkarzinoms ist von einigen Faktoren wie das Tumorstadium bei Erstdiagnose sowie die Existenz von Metastasen abhängig. Die Therapie der Wahl des nicht-metastasierten Primärtumors ist die chirurgische Entfernung. Abhängig vom Befall der Lymphknoten oder weiteren Prognosefaktoren kann eine weiterführende adjuvante Hormon- oder Chemotherapie durchgeführt werden. Sind bei Erstdiagnose bereits klinisch manifeste Fernmetastasen vorhanden, ist eine kurative Therapie des Brustkarzinom nicht mehr möglich.

Zirkulierende Tumorzellen im Blut

Obwohl die moderne Diagnostik von Serumentumormarkern eine frühere Detektion von Rezidiven und residualem Tumorgewebe ermöglicht als bildgebende Verfahren wie Sonographie und Tomographie, erlaubt sie aufgrund fehlender Spezifität in vielen Fällen keine therapeutischen Entscheidungen (Brandt *et al.*, 2001). Der Detektion disseminierter Tumorzellen kommt daher ein hoher Stellenwert zu, da Fernrezidive auf prä- oder perioperativ erfolgte, systemische Disseminierung von Tumorzellen zurückzuführen sind (Pantel *et al.*, 1997). Alle bisher analysierten soliden Tumortypen können Tumorzellen ins Blut disseminieren (Bockmann *et al.*, 2001). Proliferierende Tumorkapillaren, welche im Zuge der Angiogenese gebildet werden, besitzen löchrige Grundmembranen und werden sehr leicht von Tumorzellen überwunden, was eine Disseminierung über den Blutweg erleichtert (Cunnick *et al.*, 2002).

Ein „Tumorzell-Screening“ ist grundsätzlich in vielen Gewebetypen, wie Knochenmark, Lymphknoten oder Blut möglich, wobei das Blut entscheidende Vorteile bietet. Zum einen stellt die Blutentnahme einen vergleichsweise gering invasiven Eingriff dar (Bockmann *et al.*, 2001) und ist unter den Gesichtspunkten des technischen Aufwan-

des und des Patientenwohls der Knochenmarkaspiration oder der Lymphknotenpunktion eindeutig vorzuziehen. Zum anderen stellt die frühe hämatogene Tumorzellaussaat einen bevorzugten Metastasierungsweg dar ((Pantel et Otte, 2001), (Pantel *et al.*, 1997)). Somit kann davon ausgegangen werden, dass disseminierte Tumorzellen bei einer beginnenden oder rezidivierenden Krebserkrankung zuerst im Blut erscheinen und hier in einem sehr frühen Krankheitsstadium nachgewiesen werden können. Auch als „Monitorverfahren“ in der postoperativen Phase einer Karzinomkrankung ist die wiederholte Entnahme von Blutproben der sequentiellen Aspiration von Knochenmark überlegen (Pantel *et al.*, 1997). Die Lymphknotenanalyse ist im Gegensatz zur Analyse von Knochenmark oder Blut lediglich zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs möglich und somit nicht als Monitorverfahren geeignet (Pantel *et al.*, 1997).

Detektionsmethoden zirkulierender Tumorzellen – Immunzytochemischer Zellenachweis

Auf der immunologischen Reaktion von Antikörper mit Antigenen basierende Systeme zum Nachweis von Tumorzellen in verschiedenen Gewebetypen und Körperkompartimenten wurden in der Vergangenheit bereits mit Erfolg eingesetzt und besitzen ihren festen Platz in der heutigen onkologischen Diagnostik. Zu ihnen zählen insbesondere immunhistochemische bzw. immunzytochemische Methoden.

Die immunzytochemische Detektion von disseminierten Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten und Blut von Patienten mit soliden Neoplasien ist die am häufigsten verwendete Nachweismethode und kann als goldener Standard für die Detektion von „minimaler residualer Krankheit“ (MRD) bezeichnet werden ((Kvalheim *et al.*, 1999), (Kostler *et al.*, 2000)). Die Technik basiert auf der Verwendung poly- oder monoklonaler Antikörper, welche gegen gewebespezifische Proteinepitope epithelialer Tumorzellen gerichtet sind. Eine zusätzliche Färbung der Zellkerne mit Haematoxylin erlaubt eine morphologische Analyse der Größe bzw. Kern-Zytoplasma-Ratio und liefert wichtige morphologische Kriterien für die Identifizierung von disseminierten Tumorzellen. Für den Tumorzellenachweis werden hauptsächlich Antikörper gegen Zytokeratine verwendet, da sie uniform in allen Epithelien exprimiert werden und die höchste Spezifität bieten (Kostler *et al.*, 2000). Antikörper oder Mischungen von Antikörpern, welche sowohl gegen saure als auch gegen basische Zytokeratine gerichtet

sind, kann man als Pan-Zytokeratinmarker bezeichnen, welche eine Detektion verschiedener, heterogen exprimierter Zytokeratine in Tumorzellen ermöglichen.

Die Sensitivität der immunzytochemischen Nachweismethode reicht von einer epithelialen Zelle in 10.000 bis zu zwei bis fünf epithelialen Zellen in 1×10^6 hämatopoetischen Zellen (Hawes *et al.*, 2001).

Molekulare Tumorzell-detektion und RT-PCR

Innerhalb der molekularen Detektionsmethoden zirkulierender Tumorzellen nimmt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine zentrale Stellung ein.

Bedingt durch die hohe Sensitivität der Nachweisreaktion ist mit der PCR eine sehr frühe Detektion zirkulierender Tumorzellen und damit eine „molekulare Stadieneinteilung“ solider Tumore möglich (Davis *et al.*, 2002). Die molekulare Identifizierung bzw. Charakterisierung von Tumoren mittels PCR erlaubt die Identifizierung von Patientensubtypen, welche geeignete Kandidaten für eine Krebstherapie darstellen (Davis *et al.*, 2002). Grundlage eines PCR basierten Tumorzellnachweises sind bestimmte Nukleinsäuresequenzen, welche eine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und nicht-entarteten Zellen erlauben.

Zu den molekularen Tumormarkern im weitesten Sinne zählen morphologisch definierte Marker zur Gewebedifferenzierung, Oberflächenmarker hämatologischer Malignome und Marker genetischer Anomalien. Beispiele für diese letztere Art von Tumormarkern sind u. a. Genmutationen (p53, K-ras), Wachstumsfaktor- (EGF, TGF-alpha, TGF-beta, HB-EGF, a/bFGFs, KGF) und Wachstumsfaktorrezeptorveränderungen (EGFR, c-erbB2/3/4) (Lamerz, 1999). So ist die Detektion von Tumorzellen mit K-ras- und p53-Mutationen im Blut, Stuhl oder Galle von Patienten mit Pankreas-karzinom als ein Faktor anzusehen, dem ein prognostischer Wert in der Diagnose dieser Erkrankung zukommt (Friess *et al.*, 1997). Tumorzellen mit mutierten p53-Genen wurden außerdem im Urin von Patienten mit Blasenkrebs, Tumorzellen mit mutierten ras-Genen im Stuhl von Patienten mit Kolonkarzinom, sowie Tumorzellen mit K-ras- und p53-Mutationen im Sputum von Lungenkrebspatienten gefunden (Duffy, 1995). Weiterhin reflektieren genetische Wachstumsfaktor- und Wachstumsfaktorrezeptor-Veränderungen eine zunehmende Tumoraggressivität und so eine schlechtere Prognose, bzw. kürzere Überlebensrate des Patienten (Lamerz, 1999).

Der größte Nachteil eines PCR basierten Assays für DNA-Sequenzanomalien stellt die Tatsache dar, dass auch DNA aus toten Zellen nachgewiesen wird (Hu et Chow, 2000). Eine eindeutige Identifizierung lebender Tumorzellen, welche sich zu klinisch manifesten Metastasen entwickeln könnten, ist somit nicht möglich. Eine weitere Limitierung der Detektion genetischer Anomalien, d. h. Translokationen, Punktmutationen, Allelverluste oder Amplifikationen, ist durch die Tatsache gegeben, dass nur einige Tumortypen konstante genomische Veränderungen zeigen wie z. B. das Philadelphia-chromosom bei chronischer myelotischer Leukämie (CML). In diesen Fällen wird eine hohe Nachweissensitivität nur dann erreicht, wenn die Mutation bzw. genetische Anomalie bekannt ist (Bockmann *et al.*, 2001). Die Detektion spezifischer genomischer Veränderungen in zirkulierenden Tumorzellen solider Tumore ist aufgrund der extremen genetischen Heterogenität sehr komplex (Pantel et Otte, 2001). Ein erfolgreicher Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut auf der Basis von spezifischen Mutationen setzt daher eine Genotypisierung des Primärtumors mit Sequenzanalyse der speziellen Mutationen voraus (Pantel et Otte, 2001). Ein solcher Ansatz wäre aufgrund des vielfach nur bedingt parallel möglichen Nachweises sehr arbeitsintensiv und ist deshalb für die klinische Diagnostik nicht geeignet (Kostler *et al.*, 2000).

Die RT-PCR stellt eine *in vitro*-Methode für die enzymatische Amplifikation definierter RNA-Sequenzen dar (Rappolee *et al.*, 1989). Tumorzellen, welche in einem bestimmten Gewebe entstehen, weisen zum großen Teil das Expressions- und Differenzierungsmuster dieses Gewebes auf und können somit über den Nachweis gewebespezifischer mRNA-Transkripte charakterisiert werden. Die Disseminierung von Tumorzellen führt dazu, dass Tumorzellen, die ein bestimmtes Differenzierungsprogramm aufweisen, in einem Gewebe erscheinen, in dem diese bestimmten Gene nicht exprimiert werden (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1996). Die Basis der RT-PCR für den Nachweis residualer Tumorzellen in peripherem Blut besteht somit in der Detektion tumor- bzw. gewebespezifischer mRNA, welche von den Zellen des Blutes nicht exprimiert wird (Burchill et Selby, 2000). Die Annahme, Tumorzellen direkt über die Detektion von mRNA nachweisen zu können, geht von der Tatsache aus, dass frei im Blut zirkulierende mRNA instabil ist und in kurzer Zeit von der RNasen des Blutes abgebaut wird (Komeda *et al.*, 1995). Mittels RT-PCR ist es möglich, Tumorzellen mit sehr hoher Sensitivität nachzuweisen (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1996).

Molekulare Tumormarker für die RT-PCR

Molekulare Tumormarker für die RT-PCR, d. h. Transkripte epithelialer und tumorspezifischer Gene, sollten nicht in hämatopoetischen Zellen vorkommen bzw. in Tumorzellen epithelialer Ursprungsgewebe in einer im Vergleich mit nicht-entartetem Gewebe größeren Anzahl vorhanden sein. Genexpressionsanalysen (SAGE) mit normalem und entartetem Brustgewebe führten zur Entdeckung einer Vielzahl von Genen, welche in Brustkrebszellen verglichen mit nicht-entartetem Epithel überexprimiert werden (Bertucci *et al.*, 2003). Beispiele für solche Gene sind das HER2-Gen, Gene für epitheliale Marker wie GA733.2 und MUC1 sowie das Gen für das Protein CLAUDIN7.

Das Gen des HER2-Proteins, welches auch als c-erbB2 bezeichnet wird, ist auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert und kodiert einen 185 kDa Tyrosin-Kinase Wachstumsfaktorrezeptor (p185^{HER2-neu}) ((Masood et Bui, 2002), (Tsongalis et Ried, 2001)). HER2 ist ein Mitglied der Typ-I-Subfamilie von Wachstumsrezeptoren, welche u. a. auch den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) einschließt (Tsongalis et Ried, 2001). Es wird angenommen, dass die Zellüberlebensrate, Proliferation, Differenzierung, etc. von Brustgewebszellen durch komplexe Rezeptorheterodimerisierungsmuster der EGF-Familie beeinflusst werden (Tsongalis et Ried, 2001). Eine Verbindung zwischen der HER2-Überexpression und einer schlechteren Überlebensrate von Brustkrebspatienten wurde zuerst 1987 gezeigt und konnte seither von mehreren Arbeitsgruppen für Lymphknoten-negative und -positive Brustkrebspatienten bestätigt werden ((Tsongalis et Ried, 2001), (Molland *et al.*, 1996), (Press *et al.*, 1993), (Kallioniemi *et al.*, 1991) (Slamon *et al.*, 1987)). Eine Überexpression des HER2-Gens, welche sowohl durch Genamplifikation als auch durch verstärkte Transkription erfolgen kann, wird in bis zu 35 % aller sporadisch auftretenden Brustkrebsfälle detektiert (Tsongalis et Ried, 2001). Auf Proteinebene hat die Überexpression von HER2 therapeutische Bedeutung, da sie die Behandlung des Tumors mit monoklonalen humanisierten Antikörpern erlaubt, welche gegen p185^{HER2-neu} gerichtet sind, z. B. HerceptinTM (Masood et Bui, 2002).

Epithelmarker, d. h. Gene und deren Transkripte, welche für charakteristische Proteine epithelialer Gewebe kodieren, sind eine weitere Gruppe molekularer Tumormarker, welche für den Nachweis zirkulierender Brustkrebszellen genutzt werden können. Hier ist insbesondere das GA733.2-Gen zu nennen. GA733.2 kodiert ein homo-

typisches kalziumunabhängiges Zelladhäsionsmolekül, welches auch als epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM), epitheliales Glykoprotein 40 (EGP40) oder 17-1A-Antigen bezeichnet wird. Es wird in den meisten humanen Epithelgeweben und gastrointestinalen Tumoren exprimiert und wurde zuerst durch die monoklonalen Antikörper CO17-1A und GA733 charakterisiert (Trebak *et al.*, 2001). Das GA733.2-Antigen kann als Pan-Epithelmarker bezeichnet werden (Litvinov *et al.*, 1994) und wurde bereits häufig für die Selektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen epithelialer Gewebe verwendet. In den meisten Adenokarzinomen kann eine Expression des GA733.2-Gens in allen Stadien der Tumorentwicklung beobachtet werden (Momburg *et al.*, 1987), d. h. die Funktion des Proteins bleibt hinsichtlich der Regulierung interzellulärer Adhäsionsprozesse während der Tumorentwicklung erhalten (Litvinov *et al.*, 1994). Die durch das GA733.2-Antigen regulierte Zell-Zell-Adhäsion konnte auch in wenig differenzierten Karzinomzelllinien festgestellt werden (Litvinov *et al.*, 1994). Eine Überexpression des GA733.2-Gens wurde vor allem in gastrointestinalen Tumoren beobachtet (Trebak *et al.*, 2001).

Ein anderer Tumormarker, welcher für die molekulare Detektion von zirkulierenden Tumorzellen mittels RT-PCR verwendet werden kann, ist MUC1. Das MUC1-Protein gehört zur Glykoproteinfamilie der Mucine, welche von einer großen Zahl von Epithelgeweben heterogen exprimiert werden und durch eine variable Anzahl von Tandem-Wiederholungen charakterisiert sind (Walsh *et al.*, 2000). Das MUC1-Gen wurde auf Chromosom 1q21-24 lokalisiert und überspannt einen Bereich von 4-7 kb genomischer DNA (Seregini *et al.*, 1997). MUC1, welches auch als Episialin oder polymorphes epitheliales Mucin (PEM) bekannt ist, stellt ein großes Transmembranglykoprotein dar, dessen Struktur den Glykokalyxbereich auf der apikalen Oberfläche von Epithelzellen überragt (Walsh *et al.*, 2000). Es kann als das am besten charakterisierte membrangebundene Mucin bezeichnet werden (Seregini *et al.*, 1997). Obwohl die physiologische Funktion von MUC1 nicht bekannt ist, lassen Untersuchungen vermuten, dass es eine Rolle in der Zelladhäsion spielt, d. h. eine Verminderung von Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen bewirkt (Duffy *et al.*, 2000). Auf diese Weise kann es möglicherweise die Loslösung von malignen Zellen vom Primärtumor erleichtern und so die Bildung von Metastasen unterstützen (Duffy *et al.*, 2000). Eine Überexpression des MUC1-Gens ist in Brustkrebsgewebe und verschiedenen Brustkrebszelllinien beobachtet und mit einer erhöhten Tumoraggressivität assoziiert worden (Walsh *et al.*, 2000). Auf Proteinebene zeigt sich in Brustkrebszel-

len, verglichen mit normalen Brustgewebe, eine veränderte Antigenstruktur u. a. durch neue Kohlenhydratepitope, eine geringere Glykosylierung und eine Expression auf der gesamten Zelloberfläche (Duffy *et al.*, 2000). Im Serum gelöstes MUC1-Antigen wird als CA15.3 in der klinischen Diagnostik bei Brustkrebs verwendet (s.o.). Ein weiteres Gen, welches durch SAGE-Experimente in seiner Bedeutung als molekularer Tumormarker für die Detektion von Brustkrebszellen erkannt wurde, kodiert das Protein CLAUDIN7. Das CLAUDIN7-Antigen gehört zur Gruppe der Claudine, welche mit sog. „tight junction“-Proteinen assoziiert sind (Neville *et al.*, 2002), eine physiologische Funktion in spezialisierten Zell-Zell-Kontakt-Regionen besitzen und besonders in luminalen Epithelzellschichten vorkommen. CLAUDIN7 ist hierbei hauptsächlich in interzellulären Verbindungen von epithelialen Zellen der proximalen Tubuli von Säugetiernephronen lokalisiert (Reyes *et al.*, 2002), wird aber auch in normalem murinen und humanen Epithelgewebe exprimiert. Eine Überexpression des CLAUDIN7-Gens konnte in humanen Brusttumoren gefunden werden (Bertucci *et al.*, 2003). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CLAUDIN7-mRNA im Vergleich zu Zytokeratin-mRNA in einer Reihe von Brusttumoren in einer zehnfach höheren Konzentration vorliegt (Neville *et al.*, 2002).

Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen

Eine molekulare und biologische Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen wird vor allem durch die geringe Anzahl von Tumorzellen im Knochenmark oder Blut erschwert (Pantel et Otte, 2001). So ist bei 70-80 % der Krebspatienten mit MRD nur mit einer Tumorzelle in 2×10^6 Knochenmarkszellen zu rechnen (Pantel et Otte, 2001). Auch bei Krebspatienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium ist eine sehr geringe Anzahl zirkulierender Tumorzellen ($\leq 10^{-6}$) zu erwarten (Kantor *et al.*, 1998).

Anreicherungsverfahren erhöhen die Sensitivität und Spezifität eines RT-PCR basierten Tumorzellnachweises im Blut durch Verringerung der Anzahl unerwünschter Zellen. Prinzipiell kann eine Anreicherung von Tumorzellen durch physikalische Separationsmethoden oder immunologisch basierte Methoden bzw. einer Kombination aus beiden erfolgen. Physikalische Separationsmethoden wie z. B. die Filtration und Dichtegradientenzentrifugation beruhen auf der Annahme, dass sich epitheliale Tumorzellen durch Zellgröße und -dichte von hämatopoetischen Zellen unterscheiden.

Eine sehr häufig verwendete Methode, um Tumorzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut anzureichern, ist die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Ein großer Nachteil dieser Methode stellt allerdings die ungeeignete Dichte von Ficoll für die Anreicherung von disseminierten Tumorzellen dar, was zu einer geringen Wiederfindungsrate von 10-15 % der erwarteten Tumorzellen führt (Pantel et Otte, 2001).

Immunologisch basierte Methoden machen von magnetischen Partikeln mit einer Größe im Nano- bis Mikrometerbereich Gebrauch. Diese sind mit Antikörpern gekoppelt und können durch ein angelegtes Magnetfeld aus einer Flüssigkeitsphase abgetrennt werden. Es lässt sich eine negative und eine positive immunomagnetische Selektion (IMS) unterscheiden. Bei der negativen IMS werden Antikörper gegen Oberflächenantigene auf Leukozyten, z. B. CD45 an die magnetischen Partikel gekoppelt und auf diese Weise Leukozyten von Tumorzellen separiert. Die positive IMS macht von Antikörpern Gebrauch, die gegen Oberflächenantigene von Tumorzellen gerichtet sind. Tumorzellen werden so von den magnetischen Partikeln gebunden und können über ein geeignetes Magnetfeld aus dem Blut isoliert werden.

Die Art des magnetischen Selektionssystem entscheidet ferner, ob eine Tumorzellisolierung direkt aus Blut erfolgen kann oder ob eine schon vorangereicherte mononukleäre Zellfraktion (MNC) vorhanden sein muss. Hierbei ist der direkte Einsatz im Blut vorzuziehen, da ein Zellverlust durch Herstellung der MNC-Fraktion wie z. B. durch Dichtegradientenzentrifugation vermieden werden kann. Eine Modifikation der magnetischen Partikel erlaubt ferner, sie den speziellen Bedürfnissen der weiterführenden Analyse anzupassen. So kann über einen „DNA-Linker“, welcher den bindenden Antikörper mit dem magnetischen Partikel verbindet, eine Abtrennung der Tumorzelle nach positiver IMS durch DNase-Behandlung erfolgen (Kielhorn *et al.*, 2002). Die von dem magnetischen Partikel abgelöste Zelle kann dann der weiteren Analyse wie z. B. einer Expressionsanalyse mittels RT-PCR oder einer immunzytochemischen Färbung zugeführt werden.

Der Erfolg der positiven IMS hängt in starkem Maße von den verwendeten Antikörpern ab (Pantel et Otte, 2001). Aufgrund der bekannten Heterogenität zirkulierender Tumorzellen ist es daher sinnvoll, mehrere Antikörper gegen verschiedene Antigene zu verwenden, um die Ausbeute selektionierter Tumorzellen zu maximieren (Pantel et Otte, 2001).

Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines sensitiven und spezifischen Nachweissystems für frei zirkulierende Tumorzellen in peripherem Blut von Brustkrebspatienten. Eine hohe Sensitivität der Methode soll über eine immunomagnetische Anreicherung zirkulierender Tumorzellen und einem anschließenden Multiplex-RT-PCR-Nachweis erreicht werden.

Das System soll zunächst *in vitro* mit zwei etablierten Brustkrebszelllinien und einer Primärzelllinie etabliert und später an einem Patientenkollektiv von Brustkrebspatientinnen validiert werden.

Durch die Untersuchung eines Patientinnenkollektivs soll die Hypothese überprüft werden, ob Tumorzellen in peripherem Blut von Patientinnen mit klinisch manifesten Fernmetastasen zirkulieren und ob sie nach immunomagnetischer Selektion mittels Multiplex-RT-PCR nachweisbar sind. Weiterhin soll durch den Tumorzellnachweis mittels Multiplex-RT-PCR untersucht werden, inwieweit zirkulierende Brusttumorzellen hinsichtlich der verwendeten Tumormarker ein heterogenes Expressionsprofil zeigen. Eine vergleichende Expressionsanalyse von in Brustkrebspatientinnen nachgewiesenen Tumorzellen soll den erwarteten Vorteil eines multimarkerbasierten gegenüber einem einzelmarkerbasierten Tumorzell-RT-PCR-Nachweises aufzeigen.

Ein eindeutiger Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs soll den potentiellen Nutzen des Nachweissystems in der klinischen Diagnostik zeigen: Ein mögliches Anwendungsgebiet ist das „Monitoring“ von operierten und unter Chemotherapie-Behandlung stehenden Patienten, bei denen der Therapieerfolg der angewandten Maßnahmen durch eine sensitive Detektion zirkulierender Tumorzellen überprüft und überwacht werden kann.

2. Material

2.1. Geräte

- Agilent 2100 Agilent Technologies
- Adapter für Vortex Agilent Technologies
- Chip Priming Station Agilent Technologies
- FACS Calibur BD Biosciences
- Färbeautomat „Nexes“ Ventana Medical Systems
- Fluoreszenz-Mikroskop IX50 Olympus
- Kühlzentrifuge 5417R Eppendorf
- Magnetpartikelkonzentrator (MPC) Dynal
- Megafuge 1.0 Heraeus
- Neubaur-Zählkammer Marienfeld
- Phasenkontrast-Mikroskop CK30 Olympus
- Pipetten: Pipetman P-20, P-200, P-1000 Gilson
- PTC200 Biozym
- Rotor TS-5.1-500 Beckman-Coulter
- Sterile Zellkultur-Bank Kojair Tech Oy
- Thermomixer compact Eppendorf
- Überkopfschüttler CMV
- Vortex Genie-2 Scientific Industries
- Zentrifuge TJ-25 Beckman-Coulter

2.2. Software

- Cell Quest Pro BD
- Excel Microsoft
- NCBI-Software www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
- Word Microsoft

2.3. Materialien

- Glaspipetten (10 ml, 20 ml) Brand
- Kulturflaschen: 75 ml Nunc
- Medien/Zusätze: PBS Invitrogen
- McCoy's Invitrogen
- RPMI Invitrogen
- FBS Invitrogen
- Insulin Invitrogen
- Penicillin/Steptomycin Invitrogen
- PCR-Gefäße (0,2 ml) Sarstedt
- Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips Sarstedt
- Reaktionsgefäße (5 ml) Falcon
- Reaktionsgefäße (1,5 ml) Sarstedt
- Reaktionsgefäße (15 ml) Sarstedt

2.4. Kit-Systeme

- CA15-3 Detection Kit Abbott
- CEA Detection Kit Abbott
- DNA 500 Assay Kit Agilent Technologies
- Dynabeads CELLection Dynal
- Dynabeads mRNA Direct™ Micro Kit Dynal
- DyeEx™ 2.0 Spin Kit Qiagen
- HotStarTaq™ Master Mix Kit; Qiagen
- QiaexII Qiagen
- QIAprep Spin Miniprep Qiagen
- Sensiscript RT-Kit Qiagen
- TOPO TA Cloning-Kit Invitrogen
- Zytokeratin-Färbekit Ventana Medicals Systems

2.5. Chemikalien

- Ampicillin Invitrogen

- **BSA (Fraktion V)** Sigma
- **Hoechst 33342** Merck
- **IGEPAL CA-630** Sigma
- **IPTG** Invitrogen
- **PFA** Merck
- **PI** Pharmingen
- **Terminator Ready Reaction Mix** Applied Biosystems
 - ddATP - Terminator mit Dichloro[R6G] gelabelt
 - ddCTP - Terminator mit Dichloro[ROX] gelabelt
 - ddGTP - Terminator mit Dichloro[R110] gelabelt
 - ddTTP - Terminator mit Dichloro[TAMRA] gelabelt
 - Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
 - AmpliTaq - DNA-Polymerase, FS, mit thermostabiler Pyrophosphatase
 - MgCl₂
 - Tris-HCl - Puffer, pH 9,0
- **X-Gal** Roth GmbH

2.6. Lösungen und Puffer

- **Accutase[®]** PAA
- **Formalin-Lösung 37 %** Merck
- **Medien**
 - LB-Medium Invitrogen
 - McCoys Gibco
 - RPMI 1640 Gibco

- **PBS-Lösung (1x)** Gibco

- **SOC-Medium** Invitrogen

- **TAE-Puffer**
 - 10 x TAE-Puffer: 0,04 M Tris Merck
 - 0,5 M EDTA Sigma
 - 1,14 % Essigsäure Merck
 - pH 8,3

- **Trypanblau-Lösung (0,4 %)** Sigma

2.7. Primer

Primer	Sequenz
GA733.2-sense1	5'-AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA-3'
GA733.2-asense1	5'-TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA-3'
MUC1-sense3	5'-TCAGCTTCTACTCTGGTGCACAAC-3'
MUC1-asense3	5'-TGGTAGTAGTCGGTGCTGGGATCT-3'
HER2-sense4	5'-CCCAGTGTGTCAACTGCAGCCAGT-3'
HER2-asense4	5'-CAGATGGGCATGTAGGAGAGGTCA-3'
CLAUDIN-7-sense3	5'-GTCTTGCCGCCTTGGTAGCTTGCT-3'
CLAUDIN-7-asense3	5'-TGGACTTAGGGTAAGAGCGGGGTG-3'
AKTIN-sense	5'-CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT-3'
AKTIN - asense	5'-ACAGGACTCCATGCCAGGAAGGA-3'

2.8. Antikörper

- Nicht-konjugierte Primärantikörper

Name	Klon	Antikörper	Bezugsquelle
Cadherin-E	36B5	IgG1	Novocastra Laboratories Ltd
CEA	131-13881	IgG1	HISS
CEA	057-10007	IgG1	HISS
EGF-R- gereinigt	ICR10	IgG2b	DPC Biermann
EMA	131-11741	IgG1	HISS
EpCAM (GA733.2)	Ber-EP4	IgG1	DAKO
EpCAM (GA733.2)	MOC-31	IgG1	Novocastra Laboratories Ltd
p185 ^{Her2-neu}	CBE1	IgG2a	Novocastra Laboratories Ltd
p185 ^{Her2-neu}	2G11	IgG1	Bender Med Systems
MUC-1	HMPV	IgG1	PharMingen
MUC1	E29	IgG2a	DAKO
MUC1	GP1.4	IgG1	Novocastra Laboratories Ltd
PSA	131-14234	IgG1	HISS
Tag72	CC49	IgG1	Neomarkers
Zytokeratin	5D3	IgG1	Biogenex

- Konjugierte Primärantikörper

Name	Klon	Antikörper	Hersteller
CD45-APC	HI30	Mouse IgG1, k	PharMingen
EpCAM-FITC	Ber-EP4	IgG1	DAKO
MUC-1-FITC	HMPV	IgG1	PharMingen

- Sekundärantikörper

Name	Serum	Antikörper	Hersteller
IgG-Alexa Fluor 488	Ziege gegen Maus	IgG (H+L)	Molecular Probes
IgG-FITC	Ziege gegen Maus	IgG (H+L)	Caltag

- Nicht-konjugierte Isotypkontrollen

Name	Klon	Antikörper	Hersteller
IgG1	MOPC-21	Mouse IgG1, k	PharMingen
IgG2a	G155-178	Mouse IgG2a, k	PharMingen
IgG2b	C48-4	Mouse IgG2b, k	PharMingen
IgM	G155-228	Mouse IgM, k	PharMingen

- Konjugierte Isotypkontrollen

Name	Klon	Antikörper	Hersteller
IgG1-FITC	DD7	IgG1	Cymbus
IgG1-APC	k.A.	IgG1	PharMingen

k. A.= keine Angabe

2.9. Zelllinien

MCF7 - DSMZ-Nr. ACC 115 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ))

SK-BR3 - ATCC-Nr. HTB-30 ("American type culture collection" (ATCC))

HNEC - Cell-Lining GmbH

3. Methoden

3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Humane Tumorzellen können *in vitro* kultiviert werden, wobei sie gewebespezifische Expressionsmuster beibehalten. In der vorliegenden Arbeit werden humane Tumorzelllinien einerseits für die Überprüfung von Antikörperspezifitäten gegen epitheliale Oberflächenstrukturen und andererseits für den Nachweis tumorspezifischer mRNA verwendet. Für die Etablierung eines *in vitro*-Systems zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen, werden die Zelllinien SKBR3 und MCF7 sowie die Primärzelllinie 1590 verwendet.

MCF7- und 1590-Zellen werden in RPMI 1640-Medium (10 % FKS, 1 mM Natrium Pyruvat, 1 x nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Insulin), SKBR3-Zellen in McCoy's 5A Minimal-Medium (10 % FKS) kultiviert. Alle Zelllinien werden in 75 cm²-Kulturflaschen im Inkubator bei 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C gezüchtet. Eine Passage bzw. ein Ablösen der Zellen erfolgt alle 2 Tage bei subkonfluentem Wachstumszustand.

Das Ablösen der adhärent wachsenden Zellen erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Accutase[®]-Lösung (PAA). Nach 3-5 min Inkubation bei 37 °C im Inkubator lösen sich die Zellen von der Oberfläche ab. Zum Stoppen der Enzymaktivität werden 10 ml frisches Kulturmedium zu den abgelösten Zellen gegeben. Nach Vereinzeln der Zellen durch mehrmaliges Auf- und Niederpipettieren werden 10 µl der Zellsuspension für die Zellzahlbestimmung abgenommen. Anschließend werden 3-4 ml der Zellsuspension in eine neue 75 cm²-Kulturflasche gegeben und mit dem entsprechenden Kulturmedium auf ein Endvolumen von 20 ml gebracht.

3.2. Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung

Die Vitalität der abgelösten Tumorzellen wird durch eine Färbung mit dem Farbstoff Trypanblau überprüft, welcher in tote, nicht aber in lebende Zellen eindringt. Tumorzellen werden hierzu in 1 x PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen an Trypanblaulösung versetzt (Endkonzentration: 0,2 %), gemischt und für 5 min bei RT

inkubiert. Zur Zellzahlbestimmung wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellzahlbestimmung erfolgt durch das Auszählen von 4 Großquadraten und der Bildung des Mittelwertes aus den Ergebnissen. Die Berechnung der Zellkonzentration wird schließlich nach folgender Formel durchgeführt:

Mittelwert der ausgezählten Zellen $\times 10^4 \times$ Verdünnungsfaktor = Zellkonzentration (Zellen/ml)

3.3. Blutentnahme

Blut wird in sterile EDTA-Monovetten der Firma Sarstedt entnommen und bis zur Aufarbeitung auf Eis gehalten. Die Bearbeitung der Blutproben erfolgt innerhalb von 2 h nach der Abnahme.

3.4. Zellpräparation

3.4.1. Erythrozytenlyse

Peripheres Blut wird im zehnfachen Volumen Aqua bidest aufgenommen und nach einer Inkubationszeit von 10 sec mit 1/10 Volumen 10 x PBS gemischt, um eine isotonische Lösung zu erhalten. Nach Zentrifugation für 5 min bei 400 x g und RT wird 1 x mit PBS (1 x) gewaschen und die Zellen nach erneuter Zentrifugation in 1 x PBS/10 % BSA aufgenommen. Die Vitalität und Zellzahl der Leukozyten wird vor der anschließenden Analyse bestimmt (3.1. und 3.2.)

3.4.2. Herstellung von Zytospinpräparaten

Je Zytospinpräparat werden maximal 1×10^6 Zellen in 4 ml 1 x PBS/10 % BSA eingesetzt und mittels Zentrifugation „Hettich Universal 16“ auf „ChemMate™ Capillary Gap Plus Slides“ der Firma DAKO gebracht. Die Zentrifugation erfolgt bei 800 x g für 3 min in der Zytospinzentrifuge „Hettich Universal 16“. Nach Zentrifugation werden die Überstände der Zellsuspension entfernt und die Präparate zum Trocknen erneut zentrifugiert (s.o.). Die Präparate werden ü. N. bei RT getrocknet und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.5. Immunfluoreszenzfärbungen

3.5.1. Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie

3.5.1.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zur Überprüfung der Antikörperbindung an Tumorzellen und Leukozyten

Die Bindung verschiedener Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene auf Brustkrebszelllinien (MCF7 und SKBR3) sowie an Leukozyten wird mit der Durchflusszytometrie überprüft. Insgesamt werden verschiedene Antikörperklone gegen folgende Antigengruppen untersucht:

Antigen	Klone	Anzahl der Klone
EpCAM (GA733.2)	Ber-EP4, MOC-31	2
Cadherin-E	36B5	1
Epitheliales Membranantigen	131-11741	1
Onkofetales Protein	057-10057, 131-13881	2
Wachstumsrezeptor	SM1335P, CBE1, 2G11	3
Mucin 1	E29, GP1.4, HMPV	3
Tumorassoziiertes Antigen	131-14234, CC49	2

Für jeden zu testenden Antikörper werden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Die optimale Antikörpermenge für die Fluoreszenzfärbung wird für jeden Primärantikörper sowie für den Sekundärantikörper und DNA-Farbstoff in einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Je 10^6 Zellen werden in 100 μ l 1 x PBS/0,05 % BSA in einem 5 ml-Röhrchen vorgelegt. Nach Zugabe des Antikörpers wird der Färbeansatz sorgfältig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis, werden die Zellen mit 1 x PBS/0,05 % BSA gewaschen und anschließend für 10 min bei 400 x g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Zellpellet in 100 μ l 1 x PBS/0,05 % BSA mit dem Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC und dem DNA-Farbstoff PI sorgfältig resuspendiert. Die Inkubation erfolgt für 30 min auf Eis im Dunkeln. Die Zellen werden wiederum mit 1 x PBS/0,05 % BSA gewaschen (s.o.) und anschließend in 400 μ l Cellfix sorgfältig resuspendiert.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt mit einem FACS Calibur. Zur Auswertung der Primärdaten wird das Programm „CELL Quest Pro“ verwendet.

3.5.1.2. Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung für die Zellzyklusanalyse

Mittels der Zellzyklusanalyse wird die Bindung der für die Selektion von Tumorzellen verwendeten Antikörper an Tumorzelllinien in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase überprüft. Für die Analyse wird die Bindung der Antikörper gegen epitheliales Antigen (Klon: Ber-EP4) und gegen MUC1 (Klone: GP1.4 und HMPV) an MCF7- und SKBR3-Zellen untersucht.

Es werden 10^6 Zellen in 100 μ l 1 x PBS/0,05 % BSA für jede Analyse verwendet. Nach Zugabe des Antikörpers in geeigneter Verdünnung werden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit 1 x PBS/0,05 % BSA und Zentrifugation bei 500 x g für 5 min bei 4 °C wird der Überstand verworfen und die Zellen des Färbeansatzes mit GP1.4 in 100 μ l 1 x PBS/0,05 % BSA mit Ziege gegen Maus IgG-FITC resuspendiert. Dieser Schritt entfällt bei den Färbeansätzen mit Ber-EP4-FITC und HMPV-FITC. Die Inkubation erfolgt für 30 min auf Eis im Dunklen. Nach Waschen mit 1 x PBS/0,05 BSA (s.o.) werden die Zellen in 100 μ l 1 x PBS aufgenommen. Anschließend erfolgt eine Fixierung der Zellen durch Zugabe von eiskalter 4 %iger PFA-Lösung (Endkonzentration 2 %) und eine Inkubation für 10 min auf Eis. Nach dem Waschen mit 1 x PBS/0,05 % BSA werden die Zellen durch Zugabe von 100 μ l 1 x PBS/0,1 % IGEPAL CA630 (v/v) und 10 min Inkubation auf Eis im Dunklen permeabilisiert. Die Zellen werden erneut gewaschen und anschließend in 400 μ l 1 x PBS mit 50 μ g/ml RNase und 50 μ g/ml PI resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min bei RT im Dunklen werden die Zellen der durchflusszytometrischen Analyse am FACS Calibur zugeführt.

3.5.2. Immunfluoreszenzfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Antikörper, welche in der Durchflusszytometrie eine nachweisbare Bindung an Tumorzellen zeigen, werden verwendet, um Zytospinpräparate aus Tumorzellen und Leukozyten anzufärben. Ziel ist es, eine eindeutige Identifizierung der Tumorzellen mit den ausgewählten Antikörpern zu erreichen. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wird die Bindung der Antikörper, die sich gegen epitheliales Antigen (Klon: Ber-EP4) und gegen MUC1 (Klon: GP1.4 und HMPV) richten, an Zytospinpräparaten von MCF7- und SKBR3-Zellen untersucht. Die optimale Antikörpermenge für die Flu-

oreszenzfärbung wird für jeden Primärantikörper sowie für den Sekundärantikörper und DNA-Farbstoff in einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Der zu testende Antikörper wird auf die Zellen des Zytospinpräparats aufgetragen. Die Inkubation erfolgt bei RT für 30 min in einer feuchten Kammer. Nach 3 x Waschen mit 1 x PBS wird jeder Färbeansatz mit dem signalgebenden Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-Alexa 488 und dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 in 100 µl 1 x PBS/10 % BSA gefärbt. Nach 30 min Inkubation bei RT in einer feuchten Kammer wird 3 x mit 1 x PBS gewaschen. Die Ansätze werden schließlich 10 min mit 1 x PBS/4 % PFA fixiert. Die Präparate werden in Fluoromount G[®] eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop analysiert (3.7.1.).

3.5.3. Immunzytochemische Färbung für die Lichtmikroskopie

Für die Immunzytochemische Färbung von Zytospinpräparaten wird der Färbeautomat „Nexes“ und ein Färbekit der Firma Ventana Medical Systems verwendet. Der Nachweis epithelialer Zellen auf Zytospinpräparaten erfolgt durch Färbung mit dem Antikörper 5D3, welcher spezifisch die Zytokeratine 8, 18 und 19 erkennt. Der Epithelzellcharakter von Brustkrebszellen, welche über immunomagnetische Selektion aus Blut isoliert werden, soll auf diese Weise überprüft werden. Die Bindung des Zytokeratinantikörpers wird über eine Alkalische Phosphatase-Reaktion sichtbar gemacht.

Zytospinpräparate werden 15 min in 3,7 % Formalinlösung fixiert und anschließend 3 x mit 1 x PBS gewaschen. Die Färbung erfolgt bei 37 °C. Der Antikörper 5D3 wird aufgetragen und die Präparate für 16 min inkubiert. Nach dem Waschen mit Waschpuffer wird ein Tropfen Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper (ENH BIOT Ig/VR) aufgetragen und die Präparate für 8 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wird ein Tropfen „Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex“ (ENH SA-AP/VR) aufgetragen und die Präparate für 12 min inkubiert. Überschüssiger „Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex“ wird durch Waschen entfernt, ein Tropfen „Enhancer/VR“ aufgetragen und die Präparate für 4 min inkubiert. Nach Zugabe von einem Tropfen Fast-Red-Färbelösung (ENH FAST RED A) und einem Tropfen Naphthol (ENH NAPHTHOL) werden die Präparate weitere 8 min inkubiert. Es erfolgt die Zugabe von einem Tropfen Fast-Red B-Lösung (ENH FAST RED B). Nach einer Inkubation von 8 min werden die Präparate gewaschen. Schließlich erfolgt die Gegenfärbung

der Zellkerne für 2 min durch einen Tropfen Haematoxylin. Nach dem Waschen werden die Präparate aus dem Färbeautomaten entfernt, für 5 min in Wasser inkubiert und schließlich in Aquatex[®] eingebettet.

Die Analyse der Präparate erfolgt am Mikroskop IX50 im Hellfeld. Gefärbte Zellen werden als Tumorzellen klassifiziert, wenn eine deutliche intrazelluläre Rotfärbung sowie weitere morphologische Charakteristika von Tumorzellen wie z. B. große Zellen und eine hohe Kern-Plasma-Ratio zu erkennen sind. Die Färbung wird mit Positivkontrollen (Tumorzellpräparate) und Negativkontrollen (Präparate, welche mit der entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt werden) verglichen.

3.6. Immunomagnetische Tumorzellselektion

3.6.1. Inokulation von Tumorzellen in peripheres Blut

Adhärent wachsende Zellen der Tumorzelllinien werden mit Accutase[®] abgelöst und die Konzentration der Zellsuspension durch Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer (3.1. und 3.2.) ermittelt. Für die Inokulation von bis zu 100 Zellen ins Blut wird eine Verdünnungsreihe angesetzt. Hierbei wird eine Zellsuspension mit RPMI 1640/1 % FKS auf eine Konzentration eingestellt, welche in 100 µl die gewünschte Zellzahl enthält. Für die Inokulation von weniger als 100 Zellen wird eine Zellsuspension von 1000 Zellen/ml angesetzt, in eine Petri-Schale gegeben und die gewünschte Anzahl von Zellen mit der Pipette unter mikroskopischer Kontrolle entnommen. Zur Kontrolle des Selektionsschrittes werden Tumorzellen in RPMI 1640/1 % FKS inokuliert und zusammen mit den anderen Ansätzen analysiert. Für die Evaluierung des Tumorselektionssystems *in vitro* werden Ansätze von 1 ml und 5 ml Blut mit jeweils 2, 5, 10, 100 und 10.000 Tumorzellen verwendet.

3.6.2. Antikörperkopplung an Dynabeads[®]

Für die Selektion von Tumorzellen aus Blut werden Primärantikörper gegen tumorssoziierte Proteine über eine Antikörperbindung an Magnetpartikel der Firma Dynal (Dynabeads[®]) gekoppelt. Die verwendeten Dynabeads[®] tragen auf ihrer Oberfläche Ziege gegen Maus gerichtete Sekundärantikörper, welche den Fc-Teil muriner Anti-

körper binden. Für die Kopplung werden 0,5 µg des Primärantikörpers pro 1×10^7 Dynabeads[®] eingesetzt.

Dynabeads[®] werden mit 1 x PBS/0,1 % BSA gewaschen und im Ursprungsvolumen mit 1 x PBS aufgenommen. Anschließend werden zu je 1×10^7 Magnetpartikeln 0,5 µg Antikörper gegeben. Die Ansätze werden 30 min bei RT auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert, 3 x mit 1 x PBS gewaschen und wieder im Ursprungsvolumen aufgenommen. Dynabeads[®] werden im Anschluss für die Tumorzellselektion verwendet oder nach Zugabe von 0,05 % NaN₃ bei 4 °C gelagert.

3.6.3. Tumorzellselektion

3.6.3.1. Optimierung der Tumorzellausbeute

Für die Tumorzellselektion werden Antikörper verwendet, welche in der Durchflusszytometrie eine nachweisbare Bindung an Tumorzellen und keine Bindung an Leukozyten zeigen. Die Antikörper werden einzeln und in Kombination miteinander eingesetzt, um eine mögliche Steigerung der Tumorzellselektion hinsichtlich der Tumorzellzahl zu untersuchen. Dazu werden die Antikörper einzeln an Dynabeads[®] gekoppelt (siehe 3.6.2.) und anschließend eine Mischung von gekoppelten Dynabeads[®] zu gleichen Anteilen (Antikörperkombinationsansatz) für die Selektion eingesetzt. Für jede Tumorzellselektion wird die gleiche Dynabead[®]- und Proteinmenge verwendet. Für die Tumorzellselektion mit einem Einzelantikörper wird die im Vergleich zur Kombination der Antikörper fehlende Menge an spezifischem Antikörper durch die entsprechende Isotypkontrolle ersetzt. Für jeden Einzelansatz wird eine Menge von 8×10^6 Dynabeads[®]/ml Blut eingesetzt.

3.6.3.2. Dynabead[®]-Selektion für Tumorzellnachweis mittels RT-PCR

Für die immunomagnetische Selektion von Tumorzellen aus peripherem Blut für den RT-PCR-Nachweis werden „Pan Mouse IgG Dynabeads[®]“ in einer Menge von 8×10^6 Dynabeads[®]/ml Blut verwendet.

Nach Zugabe der Dynabeads[®] ins Blut wird der Ansatz 2 h bei RT auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. An Dynabeads[®] gebundene Tumorzellen werden im

„magnetic particle concentrator“ (MPC) durch eine Inkubation von 3 min aus dem Blut selektioniert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS werden die an Dynabeads[®] gebundenen Tumorzellen in 1 ml 1 x PBS aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Nach 1 min Inkubation im MPC wird der Überstand entfernt und die Lyse der selektionierten Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer herbeigeführt.

Das Lysat kann sofort für die mRNA-Isolierung verwendet werden (siehe 3.8.1.) oder bei - 20 °C gelagert werden.

3.6.3.3. Dynabead[®]-Selektion für Tumorzellnachweis mittels Immunzytochemie und Immunfluoreszenz

Für den Tumorzellnachweis mittels Immunzytochemie werden „CELLlection[™] Pan Mouse IgG Dynabeads[®]“ verwendet, bei welchen der Sekundärantikörper über einen „DNA-Linker“ mit den Dynabeads[®] verbunden ist. Dynabeads[®] werden in einer Menge von 8×10^6 /ml Blut verwendet.

Nach Zugabe der Dynabeads[®] ins Blut wird der Ansatz 2 h bei RT auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. An Dynabeads[®] gebundene Tumorzellen werden im „magnetic particle concentrator“ (MPC) durch eine Inkubation von 3 min aus dem Blut selektioniert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS werden die an Dynabeads[®] gebundenen Tumorzellen in 200 µl RPMI 1640/1 % FKS mit 600 U DNase-I aufgenommen und 60 min bei 37 °C unter Rotation (1250 UpM/min) im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Die Bindung der Tumorzellen an die Magnetpartikel wird anschließend durch starkes Auf- und Niederpipettieren mechanisch gelöst. Nach Inkubation im MPC werden die Tumorzellen im Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Der beschriebene Pipettierschritt wird wiederholt. Die abgelösten Zellen werden anschließend für die Zytospinpräparation verwendet (siehe 3.4.2.).

3.7. Analyse gefärbter Zellen

3.7.1. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Analyse von Tumorzellen, welche zuvor auf einer festen Matrix fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt wurden. Die Färbung kann sowohl über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper, welche spezifische Zellstrukturen erkennen, als auch über DNA-bindende Farbstoffe erfolgen, welche den Zellkern anfärben. Hierbei ist es möglich, in Abhängigkeit von den Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, Zellen gleichzeitig mit verschiedenen Fluoreszenzen zu analysieren. Nach Anregung der Farbstoffe durch eine Lichtquelle wird die Emission eines Fluoreszenzfarbstoffes über die Auswahl spezieller Sperrfilter sichtbar gemacht. Antigene auf Tumorzellen, welche von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gebunden werden, können hierbei durch das Fluoreszenzsignal erkannt und deren Lokalisation auf der Zelle bestimmt werden.

Zur Analyse wird das Fluoreszenzmikroskop IX50 mit einer Quecksilber-Dampflampe zur Erzeugung der Anregungsenergie verwendet. Für den Nachweis des Farbstoffes FITC oder Alexa 488 wird eine Anregungswellenlänge von 460-490 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 510-530 nm verwendet. Für den Nachweis des DNA-Farbstoffs Hoechst 33342 wird eine Anregungswellenlänge von 360-370 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 420-460 nm verwendet.

3.7.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Analyse und Separation von Zellen bzw. einzelnen Partikeln, welche sich in wässriger Suspension befinden. Die Zellen werden hierbei in einem regulierbaren Flüssigkeitsstrom dem Kreuzungspunkt des Flüssigkeitsstrahles mit einem Laserstrahl zugeführt. Einerseits wird das Laserlicht von den Zellen in Abhängigkeit ihrer Oberflächeneigenschaften gestreut und erlaubt durch die Detektion des Streulichtes Aussagen über ihre Größe und Granularität. Andererseits wird durch das Laserlicht eine spezifische Anregung von Fluorochromen ermöglicht, welche sich, in Abhängigkeit von den verwendeten Anwendungen und der Färbetechnik meist als Protein-Fluorochrom-Konjugate, auf oder in den Zellen befinden. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes erfolgt analog zur Analyse bei der Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.7.1.) über Sperrfilter,

lyse bei der Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.7.1.) über Sperrfilter, welche das emittierte Licht auf spezielle Detektoren leiten und eine qualitative Aussage über die untersuchte Eigenschaft der Zelle erlauben.

Zur Analyse wird ein FACS Calibur mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Detektions-Bandpassfilter von 530/30 nm für den Farbstoff FITC sowie mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Detektions-Langpassfilter von 670 nm für den Farbstoff PI verwendet. Für die Detektion des Farbstoffs APC wird eine Anregungswellenlänge von 635 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 661/16 nm verwendet.

3.8. Expressionsanalyse mittels RT-PCR

3.8.1. Isolierung von mRNA

Zur Isolierung von mRNA aus isolierten Tumorzellen werden Magnetpartikel (Dynabeads[®]) mit Oligo-d(T)-Linker der Firma Dynal verwendet.

Zur Vorbereitung der mRNA-Isolierung werden 20 µl der Oligo-d(T)-Dynabeads in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 min im MPC inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Oligo-d(T)-Partikel werden anschließend mit 20 µl Lysis/Binding-Puffer gewaschen, für 1 min im MPC inkubiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Nach Aufnahme in 20 µl Lysis/Binding-Puffer können die Oligo-d(T)-Partikel für die mRNA-Isolierung verwendet werden.

Zu 200 µl Zellysate (siehe 3.6.3.2.) werden 20 µl vorbereitete (s.o.) Oligo-d(T)-Partikel gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wird für 10 min bei RT im Über-Kopf-Schüttler und anschließend für 1 min im MPC inkubiert. Nach Entfernen und Verwerfen des Überstandes wird der Ansatz 2 x mit Waschpuffer A und anschließend 2 x mit Waschpuffer B gewaschen. Der Überstand wird entfernt und der Oligo-d(T)-Partikel/mRNA-Komplex in 100 µl kaltem 10 mM Tris-HCl aufgenommen. Nach Inkubation im MPC und Entfernen des Überstandes wird der Oligo-d(T)-Partikel/mRNA-Komplex in 29,5 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und für 5 min bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Ablösen der RNA wird der Ansatz sofort auf Eis gekühlt.

3.8.2. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten, welche von Mullis entwickelt wurde (Mullis *et al.*, 1986). Mit ihr ist es theoretisch möglich, aus einem einzigen Nukleinsäureabschnitt unter optimalen Bedingungen bis zu 10^{12} identische Moleküle zu erzeugen, welche anschließend mit analytischen Methoden untersucht werden können.

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) benutzt als Matrize mRNA. Da die Ausgangs-mRNA nicht direkt als Matrize von der Taq – DNA-Polymerase genutzt werden kann, muss sie mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RTase) zunächst in eine cDNA umgeschrieben werden.

3.8.2.1. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription der isolierten mRNA wird das „S-RT-Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

Eine Mischung aus dNTPs, Reaktionspuffer, S-RTase und RNasin[®] wird vorbereitet und 10,5 µl in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Zu jedem Ansatz wird 29,5 µl isolierte mRNA gegeben. Die RT-Reaktion wird 1 h bei 37 °C mit einer abschließenden Inaktivierungsreaktion für 5 min bei 93 °C im PCR-Gerät durchgeführt.

RT-Ansatz:

Reagenzien	Volumina
SRT-Mix dNTPs	4,0 µl
Puffer	4,0 µl
SRT	2,0 µl
RNasin	0,5 µl
RNA	29,5 µl
Gesamtvolumen	40,0 µl

3.8.2.2. PCR

Für die PCR wird das „HotStarTaq“-Kit der Firma Qiagen verwendet. Es beinhaltet eine durch Antikörperbindung inaktivierte DNA-Polymerase, welche durch eine initiale Erwärmung für 15 min auf 95 °C aktiviert wird.

Für den Tumormarkernachweis mittels PCR werden 8 µl des cDNA-Ansatzes (3.8.2.1.) verwendet. Jede Reaktion enthält eine interne Positivkontrolle, welche aus der Amplifikation eines AKTIN-cDNA-Fragments besteht. Weiterhin wird für jeden PCR-Ansatz eine Negativkontrolle mitgeführt, welche aus einem PCR-Ansatz ohne hinzugefügte Matrize besteht.

Primer-Master-Mix*:

Marker	Primerend-konz.	Vol. je Primer
AKTIN	0,1 µM	0,1 µl
	0,1 µM	0,1 µl
CLAUDIN7	0,3 µM	0,3 µl
	0,3 µM	0,3 µl
HER2	0,3 µM	0,3 µl
	0,3 µM	0,3 µl
MUC1	0,4 µM	0,4 µl
	0,4 µM	0,4 µl
GA733.2	1,0 µM	1,0 µl
	1,0 µM	1,0 µl

PCR-Ansatz:

Reagenzien	Volumina
Wasser	12,8 µl
Primer-Master-Mix*	4,2 µl*
HotStartTaq-Mix	25 µl
cDNA	8 µl

PCR-Bedingungen:

Temperatur	Zeiten
95°C	15 min
94°C	1 min
60°C	1 min
72°C	1 min
72°C	10 min
7°C	unbegrenzt



35 x

3.8.3. DNA-Fragmentanalyse

Zur Analyse der in der PCR gebildeten DNA-Fragmente wird der 2100 Bioanalyser der Firma Agilent verwendet, welcher DNA-Fragmente in einer Kapillarelektrophorese über DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe auf einem Chip nachweist.

Zur Herstellung des Gel-Farbstoffgemisches werden zu einem kriteigenen Reaktionsgefäß mit einer Gel-Matrix 25 µl DNA-Farbstoffkonzentrat gegeben und sorgfältig gemischt. Das Gemisch wird anschließend auf einen Säulenfilter gegeben und für 15 min bei 2240 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation ist es sofort für die Präparation eines Chips verwendbar oder kann bei 4 °C gelagert werden.

Der DNA-Chip wird mit je 2 x 9 µl und 1 x 5 µl Gel-Farbstoffgemisch in den gekennzeichneten Positionen auf dem Chip in der „priming station“ beladen. In jede Probenposition werden 5 µl eines Laufpuffers eingefüllt. Als Referenzwert zur Bestimmung der Fragmentgrößen dient ein kriteigenes Gemisch definierter DNA-Fragmente („DNA 500 ladder“). Schließlich wird 1 µl des zu untersuchenden PCR-Ansatzes in jede Probenposition pipettiert, der Chip 1 min geschüttelt und zur Analyse in den 2100 Bioanalyser eingesetzt.

3.9. Identifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente

Die in der Multiplex-RT-PCR amplifizierten Fragmente (3.8.) werden durch Agarosegelelektrophorese und QiaexII-Isolierung gereinigt und in einen Plasmidvektor kloniert. Nach Transformation in *E. coli* werden die Plasmide vermehrt, aus *E. coli* durch Minipräparation isoliert und sequenziert. Eine Identifizierung der amplifizierten Fragmente als Tumormarker erfolgt über einen Sequenzvergleich der erhaltenen Sequenz mit publizierten Sequenzen.

3.9.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Durchführung der Agarosegelelektrophorese erfolgt in horizontalen Gelkammern mit 2,5 %igen Gelen. Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer gelöst. Jede Probe wird vor dem Auftrag mit 2 µl 10 x Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei RT und einer Spannung von 100 V/cm. Nach 30-50 min wird die Elektrophorese beendet. Das Gel wird in 1 x TAE mit 2 mg/ml Ethidiumbromid für 10-20 min gefärbt. DNA-

Banden werden bei 312 nm auf einem Transilluminator sichtbar gemacht, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert.

Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gel wird das „Qiaex-Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Zu den ausgeschnittenen Gelbanden wird das dreifache Volumen des Puffers QX1 (NaJ-Lösung) in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Das sind je 100 mg Agarose 0,3 ml QX1-Puffer, welcher eine Auflösung der Agarose bewirkt. Nun werden 15 µl QiaexII-Lösung (Glasmilch-Suspension) in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und der Ansatz kurz gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 50 °C in einem Thermoblock wird der Ansatz 1 min bei 15700 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 0,5 ml QX1-Puffer resuspendiert, wodurch restliche Agarosepartikel entfernt werden. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 15700 x g und vorsichtiger Abnahme des Überstandes wird das Pellet in 0,5 ml PE-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation (s.o.) und Wiederholung des PE-Waschschrtes wird der Überstand nach der letzten Zentrifugation möglichst vollständig entfernt. Man lässt das Pellet ca. 30-45 min an der Luft trocknen, bis es eine schneeweiße Farbe erhält. Zur Lösung der DNA von der getrockneten Glasmilch wird das Pellet nun in 30 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird wieder 1 min bei 15700 x g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wird zur vollständigen Lösung der DNA noch einmal in 20 µl 10 mM Tris-HCl resuspendiert, 5 min bei 50 °C inkubiert und nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wird der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgt durch Absorptionsspektrometrie im Spektralphotometer "Ultraspec. III". Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach der Formel::

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.9.2. Ligation der DNA-Fragmente

Nach Isolierung (3.9.1.) werden die erhaltenen DNA-Fragmente in den Vektor pCR® 2.1. TOPO®, welcher einen pUC-ori, eine Ampicillin- und Kanamycin-

Resistenz, das lacZ-Gen und eine „multiple cloning site“ (MCS) besitzt, ligiert. Hierbei wird das „TOPO TA Cloning“-Kit der Firma Invitrogen verwendet.

Die zu klonierenden DNA-Fragmente werden nach den Angaben von Invitrogen in folgendem Ansatz ligiert:

Reagenzien	Volumina
Gereinigtes Fragment	4 μ l
Puffer	1 μ l
Vektor	1 μ l
Gesamtvolumen	6 μ l

Die Substanzen werden zusammengegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Ansatz sofort auf Eis gestellt und dort bis zur Transformation inkubiert.

3.9.3. Transformation der klonierten DNA-Fragmente

Nach der Ligation der Fragmente in pCR[®] 2.1. TOPO[®], werden kompetente *E. coli* mit den Vektoren transformiert. Hierbei wird der *E. coli*-Stamm „TOP10F' One Shot“ verwendet.

Zu jedem Transformationsansatz werden 1×10^9 - 1×10^{10} kompetente *E. coli* gegeben und 2 μ l des Ligationsansatzes zugefügt. Die Transformationsansätze werden jeweils 5 bis 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock) und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz werden 250 μ l SOC-Medium (RT) pipettiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 1 h bei 37 °C und 200 UpM im Brutschrank geschüttelt. Von jedem Ansatz werden anschließend 50 μ l und 200 μ l auf zwei vorgewärmte LB-Agarplatten (50 mg/ml Ampicillin, 40 mg/ml X-Gal, 100 mM IPTG) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag werden weiße Kolonien, welche klonierte Fragmente im Vektor enthalten, selektiert und in 3 ml Flüssigmedium (50 mg/ml Ampicillin) ü. N. bei 37 °C vermehrt.

3.9.4. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Nach Anzucht der transformierten *E. coli* ü. N. in LB-Medium (50 mg/ml Ampicillin) wird der Vektor mit dem einklonierten DNA-Fragment aus dem Bakterium wieder isoliert. Die Isolierung erfolgt mit dem Kit „QIAprep Spin Miniprep“ der Firma Qiagen. Hierzu werden 1,5 ml der 3 ml-Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und 1 min bei 15700 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Zellpellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 250 µl P2-Lysis Puffer dazu pipettiert und der Ansatz durch mehrmaliges Schwenken des Eppendorf-Reaktionsgefäßes in der Hand gemischt. Die Lösung wird hierbei viskos und klar. Anschließend wird die Lösung mit 350 µl N3-Puffer versetzt und durch sofortiges vier- bis sechsmaliges Invertieren des Eppendorf-Reaktionsgefäßes gemischt, um eine lokale Präzipitation zu vermeiden. Es erfolgt eine zehninminütige Zentrifugation bei 15700 x g. Der DNA-haltige Überstand wird anschließend in ein „QIAprep spin column“ mit einem 2 ml-Sammelgefäß transferiert und 30-60 sec zentrifugiert, wobei die DNA-Fragmente an die Membran binden. Nach zwei Waschrissen mit 500 µl PB- und 750 µl PE-Puffer, bei denen jeweils für 30-60 sec zentrifugiert wird, folgt erneut eine Zentrifugation für 1 min. Das „QIAprep spin column“ wird anschließend in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die DNA mit 50 µl EB-Puffer durch Zentrifugation für 1 min eluiert.

3.9.5. Sequenzierung


Die Sequenz der klonierten Fragmente wird mittels des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger bestimmt (Sanger *et al.*, 1977). Es basiert auf einer enzymatisch katalysierten Synthese von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, welche durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert, nach ihrer Größe kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert werden. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgt in einem der PCR analogen Verfahren, welches als „Cycle Sequencing“ bezeichnet wird. In einem PCR-Temperaturprofil (Denaturierung, Annealing und Extension) werden die erhaltenen Fragmente hierbei über die eingesetzten ddNTPs, welche basenspezifisch an verschiedene dRhodamine (Dichlorrhodamine)-Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt sind, markiert.

3.9.5.1. Sequenzierungs-PCR

Der Reaktionsansatz besteht aus einem Reaktionsmix, welcher u. a. die markierten ddNTPs, dNTPs, die AmpliTaq-DNA-Polymerase, das klonierte cDNA-Fragment im pCR[®] 2.1. TOPO[®]-Vektor und den Sequenzierungsprimer M13-fw bzw. M13-rw enthält. Der Sequenzierungsansatz wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Die DNA-Matrize wird vor Einsatz in die PCR in 7 µl Wasser aufgenommen, für 3 min bei 95 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt.

PCR-Bedingungen:

Temperatur	Zeiten
96 °C	2 min
96 °C	10 sec
48 °C	5 sec
60 °C	4 min
4 °C	unbegrenzt

 30 x

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wird gereinigt (3.9.5.2.) und anschließend analysiert (3.9.5.3.)

3.9.5.2. Reinigung der markierten DNA-Fragmente

Durch die Reinigung der markierten DNA-Fragmente werden kontaminierende Bestandteile, wie unverbrauchte Primer, dNTP, etc. entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mit dem „DyeEx Spin Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Die DNA wird anschließend in 22 µl TRS-Puffer (Auftragspuffer für die Sequenzierung) aufgenommen, welcher eine Renaturierung der einzelsträngigen Fragmente zu Doppelsträngen verhindert. Der Ansatz wird direkt vor dem Einsatz in den ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer für 3 min bei 95 °C auf dem Thermoblock denaturiert.

3.9.5.3. Automatische Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Die kapillarelektrophoretische Auftrennung und Detektion der markierten DNA-Fragmente wird im „ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer“ durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden durch eine mit Polymer gefüllte Glaskapillare nach Größe aufge-

trennt und zu einem „Laser-Fenster“ geleitet, wo die basenspezifisch markierten Fragmente über das unterschiedliche Emissionsspektrum der einzelnen dRhodamin-Farbstoffe nach Anregung durch einen Argon-Ionen-Laser nachgewiesen werden. Anschließend wird die erhaltene Sequenz mit den in der „National Center for Biotechnology Information“-Datenbank (NCBI) zugänglichen Sequenzen verglichen.

3.10. Tumormarkernachweis im Blutserum

Die Serumentumormarker CA15-3 und CEA besitzen in der Diagnose und Verlaufskontrolle der Brustkrebserkrankung die größte Bedeutung und werden in der klinischen Diagnostik ermittelt.

3.10.1. ELISA

Die Bestimmung der CA15.3- und CEA-Serumkonzentrationen erfolgt mit dem Mikropartikel-ELISA-basierten Verfahren (MEIA) der Firma Abbott und mit dem Elecsys 2010-System der Firma Roche. Für die Bestimmung der CA15.3- und CEA-Serumkonzentrationen mit dem Mikropartikel-ELISA-basierten Verfahren (MEIA) der Firma Abbott wird der Analyzer IM_x^{Systems} verwendet. Eine Kalibrierung des Gerätes wird vor jeder Tumormarkerbestimmung durchgeführt. Die Bestimmung mit beiden Systemen erfolgt nach Angaben des Herstellers.

3.11. Tumorzellnachweis in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen

Das etablierte und getestete *in vitro*-Modell zum Nachweis von Brusttumorzellen in Blut wird für den Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen verwendet.

Alle Patientinnen sind in der Frauenklinik der Universität Heidelberg in Behandlung. Alle zu untersuchenden Patientinnen befinden sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und weisen zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch manifeste Metastasen auf. Von jeder Patientin werden mindestens 10 ml peripheres Blut abgenommen und zu gleichen Teilen für den mRNA-Nachweis tumorassoziierter Proteine (3.6.3.2.) und für den immunzytochemischen Tumorzellnachweis (3.6.3.3.) verwen-

det. Die Konzentration von Serumtumormarkern wird aus dem Blutplasma mittels ELISA ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der Expression von tumorassoziierten Oberflächenproteinen

4.1.1. Phänotypisierung und Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien

Tumorzelllinien, welche für die Etablierung eines sensitiven und spezifischen Tumorzellnachweissystems *in vitro* verwendet wurden, konnten durch monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene charakterisiert werden. Die Antikörperspezifität wurde an den etablierten Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3 mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Weiterhin wurde die Nachweisbarkeit der detektierten Antigene in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse bestimmt.

4.1.1.1. Antikörperauswahl mittels Durchflusszytometrie

Eine erfolgreiche Isolierung von Tumorzellen aus Blut von Brustkrebspatienten mittels immunomagnetischer Verfahren (3.6.) erfordert Antikörper, welche spezifisch an Tumorzellen binden. Zu diesem Zweck wurde die Eignung von 14 kommerziell erhältlichen Antikörpern für die Verwendung zur Tumorzellisolierung bzw. -differenzierung von Zellen des Blutes mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Tumorzellen wurden abgelöst und die Vitalität und Zellzahl bestimmt (3.1. und 3.2.). Jeder getestete Antikörper wurde zunächst mit den jeweiligen Brustkrebszelllinien titriert. Gebundener Antikörper wurde mit 1,4 µg signalgebenden Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC nachgewiesen (3.5.1.1.). Um tote von lebenden Zellen zu differenzieren, wurde der DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PI) in einer Menge von 0,5 µg verwendet (3.5.1.1.). Alle Ansätze wurden mit einem FACS Calibur und der Software „Cell Quest Pro“ analysiert.

Die Untersuchung der Antikörper erfolgte an der Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszelllinie MCF7 und der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie SKBR3

(Tabelle 1). Um eine unerwünschte Bindung an Leukozyten erkennen zu können, wurden Zellen des peripheren Blutes ebenfalls gefärbt. Zur Unterscheidung der Tumorzellen von Leukozyten wurde ein Antikörper gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 verwendet.

Tabelle 1: Untersuchung von Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene an den Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3 sowie an Leukozyten.

Die Tabelle zeigt das Ergebnis der Antikörperuntersuchung von 14 kommerziell erhältlichen Klonen gegen auf der Zelloberfläche der Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3 sowie Leukozyten exprimierte tumorassoziierte Antigene. Dargestellt ist die Bezeichnung der Antigene, der Antikörperklon sowie das Ergebnis der Antikörperfärbung an den getesteten Zellen. Eine starke bis sehr starke Bindung der Antikörper ist durch +, bzw. ++ gekennzeichnet.

Antigen	Klon	MCF7	SKBR3	Leukozyten
Cadherin-E	36B5	-	-	-
CEA	057-10057	-	-	-
CEA	131-13881	-	-	-
EGF Rezeptor	SM1335P	-	-	-
EMA	131-11741	++	+	+
EpCAM (GA733.2)	Ber-EP4	++	++	-
EpCAM (GA733.2)	MOC-31	++	++	-
MUC1	HMPV	++	+	-
MUC1	E29	+	+	-
MUC1	GP1.4	++	+	-
p185 ^{Her2-neu}	CBE1	-	-	-
p185 ^{Her2-neu}	2G11	+	++	+
PSA	131-14234	-	-	+
TAG72	CC49	+	+	+
CD45	HI30	-	-	++

Von 14 getesteten Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene zeigten acht eine nachweisbare Bindung an die verwendeten Tumorzelllinien MCF7 und SKBR3. Hierbei wiesen die gegen den Epithelmarker EpCAM (GA733.2) gerichteten Antikörper Ber-EP4 und MOC-31 eine sehr starke Bindung an beide Zelllinien auf. Der gegen epitheliales Membranantigen (EMA) gerichteten Antikörper 131-11741 sowie die gegen Mucin1 gerichteten Antikörper GP1.4 und HMPV zeigten eine sehr starke Bindung an die Zelllinie MCF7 und eine schwächere Bindung an SKBR3. Hierbei wies der Klon 131-11741 jedoch auch eine Bindung an Leukozyten auf. Der Klon 2G11 gegen den Wachstumsfaktor HER2^{neu} und CC49 gegen das TAG72-Protein zeigten eine starke Bindung an alle verwendeten Tumorzelllinien, jedoch ebenfalls an Subpopulationen von Leukozyten. Die Antikörper 36B5 gegen Cadherin-E, 057-10057 und 131-13881 gegen CEA, CBE1 gegen HER2^{neu} und 131-14234 gegen PSA zeigten keine Bindung an die verwendeten Zelllinien. Der Antikörper gegen CD45 zeigte

als Kontrolle erwartungsgemäß keine Bindung an Tumorzellen, jedoch eine sehr starke Bindung an Leukozyten.

Anhand der ermittelten Ergebnisse wurden die Antikörper Ber-EP4, MOC-31, GP1.4 und HMPV für die Selektion von Tumorzellen aus Blut ausgewählt, da eine Bindung dieser Klone an Tumorzellen nachgewiesen und eine gleichzeitige Bindung an Leukozyten ausgeschlossen werden konnte. Die optimale Antikörpermenge, welche für einen Färbeansatz verwendet wurde ist $0,3 \mu\text{g}$ Ber-EP4, $1 \mu\text{g}$ MOC-31, $0,04 \mu\text{g}$ GP1.4 und $1,25 \mu\text{g}$ HMPV. Der signalgebende Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC und der DNA-Farbstoff PI wurden in einer Menge von $1,4 \mu\text{g}$ und $0,5 \mu\text{g}$ eingesetzt

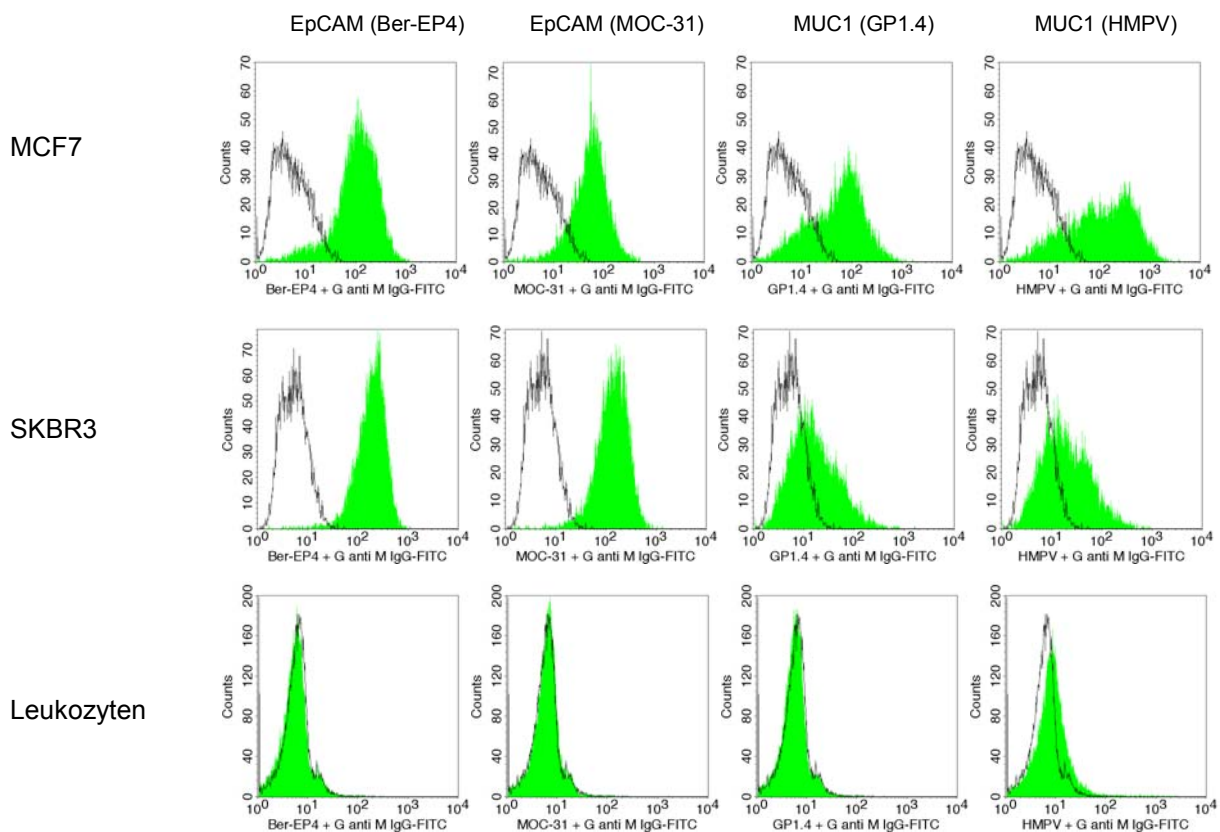


Abbildung 2: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an MCF7- und SKBR3-Zellen sowie an Leukozyten.

Die Abbildung zeigt die Bindung der Antikörper Ber-EP4, MOC-31, GP1.4 und HMPV an MCF7- und SKBR3-Zellen sowie an Leukozyten im Histogramm. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der detektierten Ereignisse. Die Bindung der Antikörper wurde über den Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente die entsprechende Isotypkontrolle, welche schwarz dargestellt ist. Insgesamt wurden 10000 Ereignisse in die Analyse einbezogen. Dargestellt sind nur die lebenden (PI⁺) Zellen. Die Analyse wurde mit einem FACS Calibur und der Software „Cell Quest Pro“ durchgeführt.

Die Antikörperbindung der getesteten Klone zeigt in Bezug auf die Intensität des generierten Fluoreszenzsignals in den getesteten Zelllinien und Leukozyten ein hetero-

genes Bild (Abb. 2). SKBR3-Zellen binden die Antikörper Ber-EP4 und MOC-31 sehr stark, während GP1.4 und HMPV eine schwächere Bindung zeigen. Die Antikörper GP1.4 und vor allem HMPV weisen an MCF7-Zellen eine stärkere Bindung als an SKBR3-Zellen auf, während MOC-31 und Ber-EP4 an MCF7 schwächer gebunden werden als an SKBR3. Die dargestellten Ergebnisse lassen auf die heterogene Expression insbesondere des MUC1-Antigens in den verschiedenen Brustkrebszelllinien schließen. Die Untersuchung der Klone Ber-EP4, MOC-31, GP1.4 und HMPV an Leukozyten zeigt in Bezug auf die Stärke des generierten Fluoreszenzsignals einen vergleichbaren Wert mit der Isotypkontrolle, d. h. die Antikörper binden nicht an Leukozyten.

Als Ergebnis liegt somit eine spezifische Bindung von vier der 14 getesteten Antikörper an Brustkrebszelllinien vor. Diese Antikörper eignen sich, um Tumorzellen von Leukozyten zu unterscheiden.

4.1.1.2. Durchflusszytometrische Darstellung von Tumorzellen im Blut

Nach der Vorauswahl von Antikörpern zur Selektion von Brustkrebszellen durch separate Untersuchung der Klone an MCF7, SKBR3 und Leukozyten (4.1.1.1.) wurde untersucht, ob eine eindeutige Detektion von Brustkrebszellen in einem Hintergrund von Leukozyten möglich ist. Hierzu wurden die Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV ausgewählt, da sie die stärkste Bindung an eine oder beide benutzten Modellzelllinien gezeigt haben (4.1.1.1.). Der Antikörper MOC-31 wurde trotz Bindung an beide Zelllinien nicht weiter verwendet (4.2.1.).

Für die Untersuchung wurden Inokulationsansätze mit jeweils 10000 inokulierten MCF7 oder SKBR3-Zellen/ml Blut angefertigt (3.6.1.). Nach Lyse der Erythrozyten (3.4.1.) wurden die Zellzahl und die Vitalität der Zellen bestimmt (3.2.). Die Ansätze wurden gefärbt (3.5.1.1.) und durchflusszytometrisch analysiert. Die optimale Antikörpermenge, welche für einen Färbeansatz verwendet wurde, ist 0,3 µg Ber-EP4, 0,04 µg GP1.4, 1,25 µg HMPV und 0,5 µg CD45-APC. Der signalgebende Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC und der DNA-Farbstoff PI wurden in einer Menge von 1,4 µg und 0,5 µg eingesetzt.

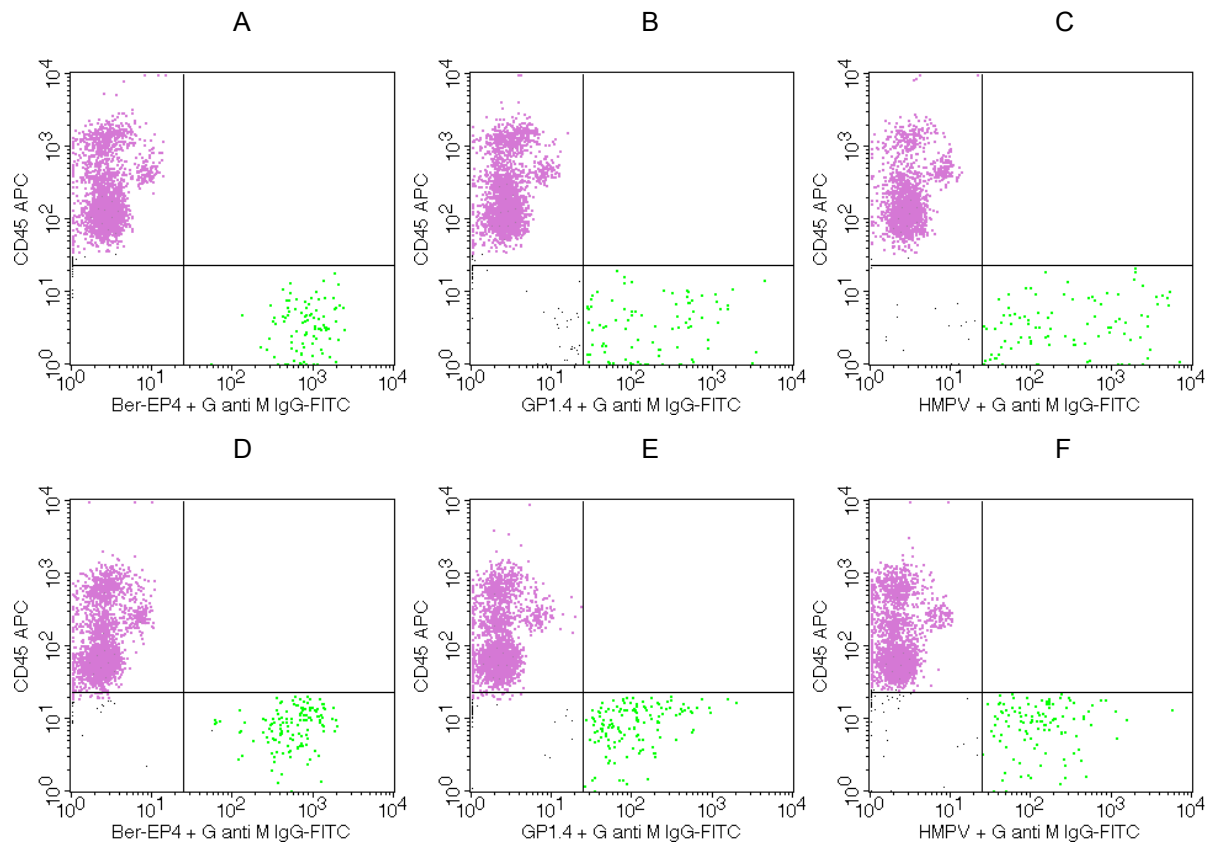


Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse inokulierter Tumorzellen in Blut.

Die Abbildung zeigt die Bindung der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV an inokulierte MCF7 (A-C) und SKBR3-Zellen (D-F) im Blut sowie mit dem Antikörper gegen CD45 angefärbte Leukozyten. Dargestellt sind die Tumorzellen (grün) auf der Abszisse gegen die Leukozyten (violett) auf der Ordinate. Die Bindung der Antikörper an MCF7- und SKBR3-Zellen wurde über den Sekundäntikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC nachgewiesen. Leukozyten wurden mit CD45-APC gefärbt. Als Negativkontrolle diente die entsprechende Isotypkontrolle (nicht gezeigt). Insgesamt wurden 10000 Ereignisse in die Analyse einbezogen. Dargestellt sind nur die lebenden (PI⁻) Zellen. Die Analyse erfolgte mit einem FACS Calibur und der Software „Cell Quest Pro“.

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von inokulierten Brustkrebszellen im Blut zeigt, dass mit den Antikörpern Ber-EP4, GP1.4 und HMPV sowohl mit der Zelllinie MCF7 (Abb. 3, A-C) als auch mit der Zelllinie SKBR3 (Abb. 3, D-F) eine eindeutige Differenzierung von Tumorzellen und Leukozyten erreicht werden konnte. In allen Fällen wurden Leukozyten mit dem Antikörper gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 angefärbt und sind im linken oberen Quadranten violett dargestellt (Abb. 3, A-F). Tumorzellen, welche die jeweiligen Antikörper gebunden haben und mit Sekundäntikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC spezifisch markiert wurden, sind im unteren rechten Quadranten grün dargestellt (Abb. 3, A-F). Es existieren keine Zellen, welche sowohl die zu testenden Antikörper als auch CD45 gebunden haben.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass die ausgewählten Antikörper in Kombination mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45 eingesetzt werden können und eine eindeutige Unterscheidung von Leukozyten erlauben.

4.1.1.3. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tumorzellen im Blut

Antikörper, welche in Durchflusszytometrie eine Bindung an Brustkrebszelllinien gezeigt haben (4.1.1.1.) wurden für die Färbung von Zytospinpräparaten mit MCF7-, bzw. SKBR3-Zellen und Leukozyten verwendet und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Hierbei sollte gezeigt werden, dass die ausgewählten Antikörper analog der durchflusszytometrischen Analyse (4.1.1.2.) eine eindeutige Unterscheidung von Tumorzellen und Leukozyten ermöglichen.

Für die Analyse wurden Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und SKBR3 verwendet, welche nach Ablösen und Vitalitäts- bzw. Zellzahlbestimmung (3.1. und 3.2.) in eine aus peripherem Blut erhaltene Leukozytensuspension (3.4.1.) in einem Verhältnis von 1:10 inokuliert wurden. Nach Zytospinpräparation (3.4.2.) wurden die Inokulate ü. N. getrocknet und mit einer Kombination aus den Antikörpern Ber-EP4, GP1.4 und HMPV gefärbt (3.5.2.). Die optimale Antikörpermenge, welche für einen Färbeansatz verwendet wurde, ist 0,6 µg Ber-EP4, 0,08 µg GP1.4 und 1,25 µg HMPV. Der signalgebende Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-Alexa 488 und der DNA-Farbstoff Hoechst 33342 wurden in einer Menge von 2 µg und 1 µg eingesetzt.

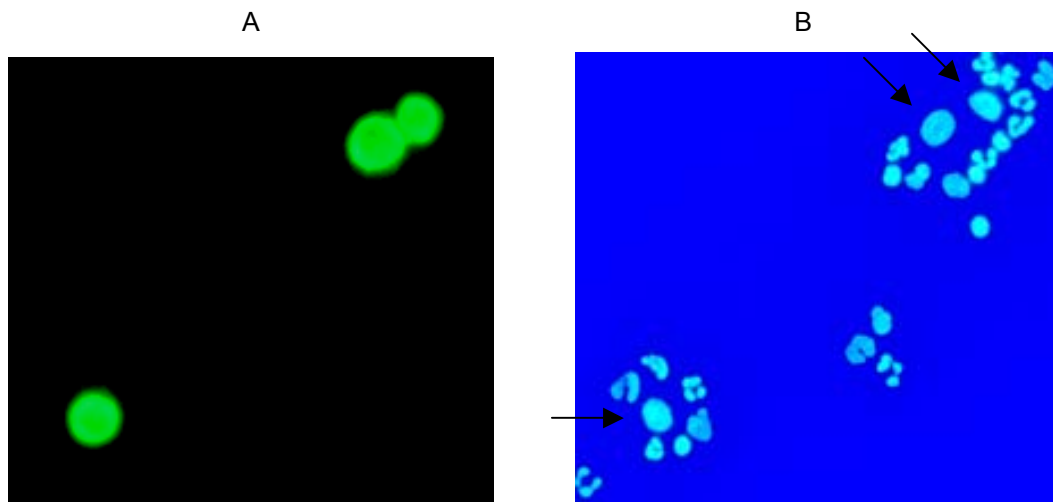


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von SKBR3-Zellen und Leukozyten nach Färbung mit einer Kombination aus Antikörpern gegen tumorassoziierte Proteine.

Abbildung A zeigt SKBR3-Zellen (grün) nach Immunfluoreszenzfärbung mit einer Kombination der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV sowie dem Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-Alexa 488. Abbildung B zeigt den gleichen Bildausschnitt nach DNA-Färbung mit Hoechst 33342. Die Tumorzellen sind mit einem Pfeil markiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop IX50 gemacht (Vergrößerung 400 x).

Tumorzellen der Zelllinie SKBR3 wurden nach Bindung der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV mit Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-Alexa 488 gefärbt und wurden grün dargestellt (Abb. 4 A). Zellkerne von Leukozyten und inokulierten Tumorzellen wurden durch Färbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 blau dargestellt (Abb. 4 B). Der Versuch wurde ebenfalls mit der Zelllinie MCF7 durchgeführt und führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Antikörperbindung von Ber-EP4, GP1.4 und HMPV an Brustkrebszelllinien zeigt, dass analog zur durchflusszytometrischen Analyse mit dem zur Selektion von Tumorzellen aus Blut verwendeten Antikörpern eine eindeutige Unterscheidung von Tumorzellen und Leukozyten möglich ist.

4.1.1.4. Zytokeratinnachweis in Brustkrebszellen

Brustkrebszellen wurden mit dem gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichteten Antikörper 5D3 gefärbt und immunzytochemisch nachgewiesen. Hierbei sollte eine eindeutige Identifizierung von MCF7- und SKBR3-Zellen aufgrund ihrer epithelzellspezifischen Charakteristika vor einem Hintergrund von Leukozyten erreicht werden.

Für die Analyse wurden Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und SKBR3 verwendet, welche nach Ablösen und Vitalitäts- bzw. Zellzahlbestimmung (3.1. und 3.2.) in eine aus peripherem Blut erhaltene Leukozytensuspension (3.4.1.) in einem Verhältnis von 1:10 inokuliert wurden. Nach Zytospinpräparation (3.4.2.) wurden die Inokulate ü. N. getrocknet und immunzytochemisch gefärbt (3.5.3.). Für die Färbung wurde 1 µg 5D3-Antikörper verwendet.

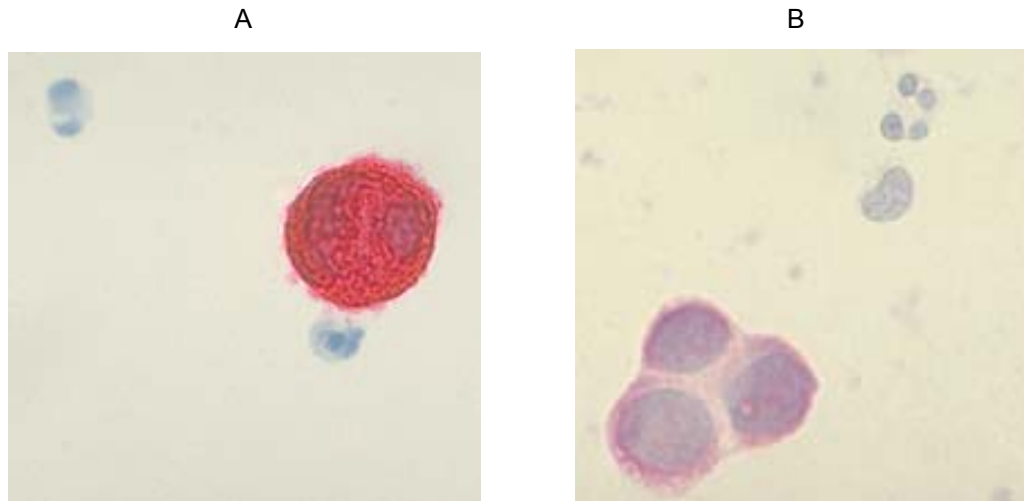


Abbildung 5: Immunzytochemische Färbung von inokulierten MCF7 und SKBR3-Zellen.

Abb. A zeigt eine SKBR3-Zelle, Abb. B MCF7-Zellen nach Färbung mit dem gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichteten Antikörper 5D3. Die Bindung des Zytokeratinantikörpers wurde über eine Biotin-Streptavidin verstärkte Alkalische Phosphatase-Immunfärbung sichtbar gemacht. Gefärbte Tumorzellen erscheinen rot. Zellkerne wurden mit Haematoxylin angefärbt und sind blau dargestellt. Die Hellfeldaufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop IX50 gemacht (Vergrößerung 1000 x).

Inokulierte MCF7- und SKBR3-Zellen konnten nach Färbung mit dem Antikörperklon 5D3 und immunzytochemischer Detektion eindeutig vor einem Hintergrund von Leukozyten identifiziert werden (Abb. 5). Tumorzellen erscheinen hierbei als große, stark rot gefärbte Zellen mit einer großen Kern-Zytoplasma-Ratio. Leukozyten weisen keine Rotfärbung auf und haben im Vergleich zu Tumorzellen einen kleinen Zellkern. Das Ergebnis des immunzytochemischen Nachweises von MCF7- und SKBR3-Zellen zeigt, dass mit dem verwendeten Antikörper 5D3 eine eindeutige Identifizierung von Brustkrebszellen möglich ist. Der Antikörper 5D3 wurde daraufhin für die Identifizierung von Tumorzellen nach immunomagnetischer Selektion verwendet.

4.1.2. Zellzyklusanalyse

Die Expression der von den Antikörpern Ber-EP4, GP1.4 und HMPV erkannten Antigene in den einzelnen Phasen des Zellzyklus wurde durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei sollte bestimmt werden, inwieweit die durch die Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV detektierten Antigene in verschiedenen Phasen des Zellzyklus exprimiert werden. Eine Expression der Antigene in allen Phasen des Zellzyklus erhöht die Wahrscheinlichkeit, Brustkrebszellen im Patienten zu selektionieren.

MCF7- und SKBR3-Zellen wurden nach Ablösen und Vitalitäts- bzw. Zellzahlbestimmung (3.1. und 3.2.) mit den Antikörpern Ber-EP4, GP1.4 und HMPV sowie mit dem DNA-Farbstoff PI gefärbt (3.5.1.2.). Die Zellzyklusphase wurde anhand der generierten PI-Fluoreszenzsignalstärke bestimmt. Die Expression der untersuchten Antigene wurde daraufhin durch Korrelation der Fluoreszenzsignalstärke des jeweiligen Antikörperklons mit der Zellzyklusphase ermittelt. Für einen Färbeansatz wurden 1 µg Ber-EP4-FITC, 0,04 µg GP1.4 oder 1 µg HMPV-FITC verwendet. Der signalgebende Sekundärantikörper Ziege gegen Maus IgG-FITC und der DNA-Farbstoff PI wurden in einer Menge von 1,4 µg und 5 µg eingesetzt.

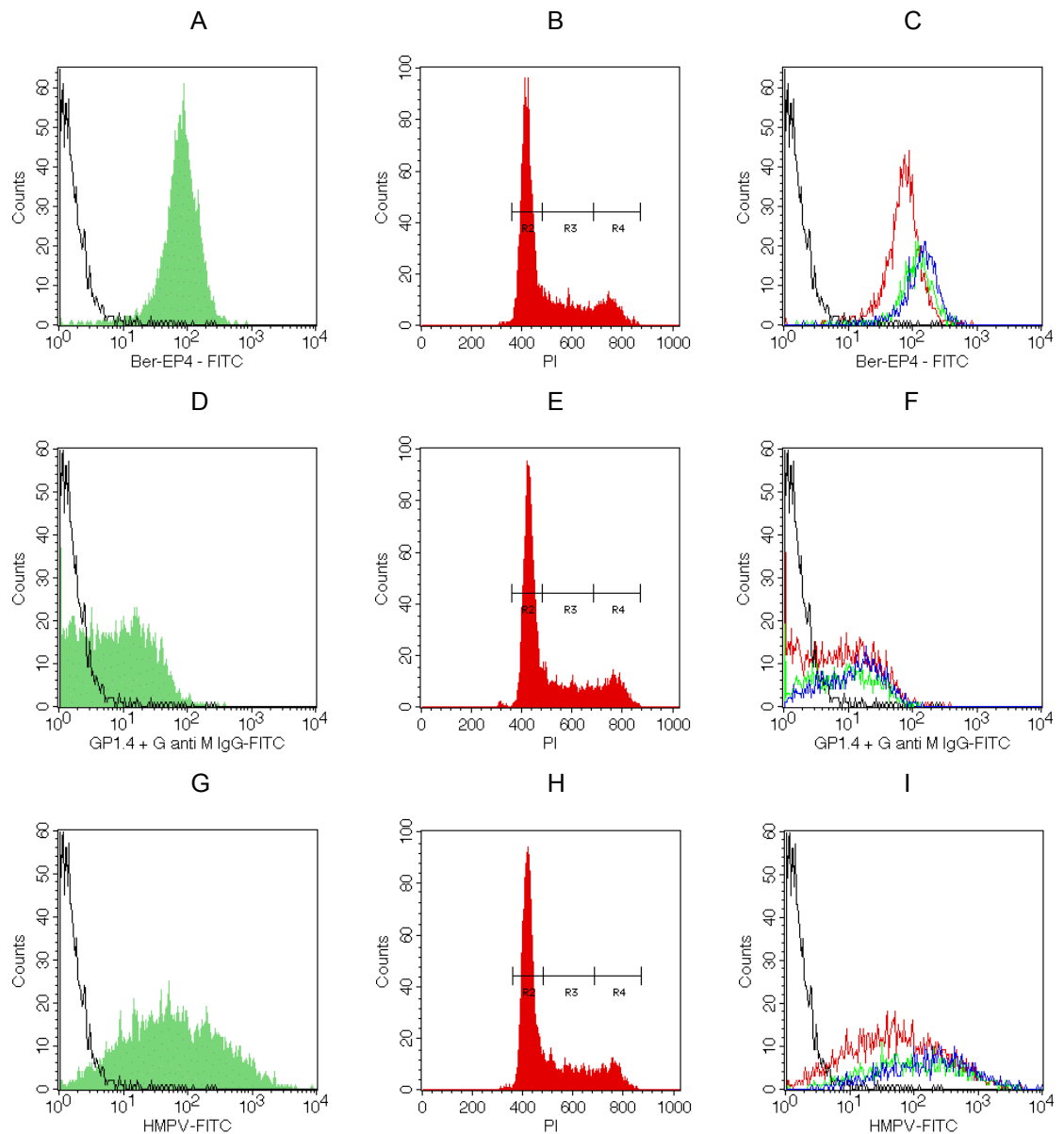


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Darstellung der Expression des Ber-EP4-, GP1.4- und HMPV-Antigens auf MCF7-Zellen in Relation zu den Zellzyklusphasen.

Die Abbildung zeigt die Bindung der für die Selektion von Brustkrebszellen verwendeten Antikörper Ber-EP4 (A-C), GP1.4 (D-F) und HMPV (G-I) an MCF7-Zellen in Relation zu der Zellzyklusphase im Histogramm. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der detektierten Ereignisse. Die Abbildungen A, D und G zeigen im Histogramm die Gesamtheit von Ber-EP4-, GP1.4- und HMPV-positiven MCF7-Zellen (grün dargestellt) im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle (schwarz dargestellt). Die Abbildungen B, E und H stellen die DNA-Mengenverteilung der analysierten Zellen im Zellzyklus (R2=G0/1-Phase, R3=S-Phase, R4=G2/M-Phase) dar. Die Abbildungen C, F und I zeigen die Korrelation der Ber-EP4-, GP1.4- und HMPV-Expression zu den Zellzyklusphasen (R2=rot, R3=grün, R4=blau), welche in den Abbildungen B, E und H gezeigt sind. Insgesamt wurden 10000 Ereignisse in die Analyse einbezogen. Für die Färbung der DNA wurde der Farbstoff PI gewählt. Die Analyse wurde mit einem FACS Calibur und der Software „Cell Quest Pro“ durchgeführt.

Die von den Antikörpern Ber-EP4, GP1.4 und HMPV erkannten Antigene zeigen in den untersuchten Zellzyklusphasen G0/1 (R2), S (R3) und G2/M (R4) hinsichtlich der Expressionsstärke gewisse Schwankungen, sind jedoch in allen Zellzyklusphasen nachzuweisen (Abb. 6). So zeigt sich bei den von Ber-EP4, GP1.4 und HMPV er-

kannten Antigenen in den Zellzyklusphasen S und G2/M eine stärkere Expression als in G0/1 (Abb. 6, C, F und I). Diese Effekt ist sowohl bei der Zelllinie MCF7 als auch bei SKBR3 (Daten nicht gezeigt) nachzuweisen.

Die Zellzyklusanalyse zeigte die Expression der durch Ber-EP4, GP1.4 und HMPV erkannten Antigene in allen Phasen des Zellzyklus.

4.2. Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut

4.2.1. Immunomagnetische Selektion mit verschiedenen Antikörpern

Antikörper gegen epitheliale und tumorassoziierte Transkripte wurden in der Durchflussszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich ihrer Bindung an Tumorzellen verschiedener Zelllinien untersucht (4.1.1.1. und 4.1.1.2.). Anhand der Ergebnisse wurden nur solche Antikörper für die Selektion von Tumorzellen aus Blut verwendet, welche eine eindeutige Bindung an Tumorzellen und keine Bindung an Leukozyten zeigten. Um eine maximale Ausbeute an selektierten Tumorzellen zu erhalten, wurden Antikörper einzeln und in Kombination miteinander eingesetzt. Die Untersuchungen wurden mit der Brustkrebszelllinie SKBR3 durchgeführt. Die Wiederfindungsrate der Tumorzellen wurde hierbei durch das Verhältnis von eingesetzten Tumorzellen zu isolierten Tumorzellen aus Medium (Medium-Kontrolle) und Blut ermittelt.

Die Bestimmung der Tumorzellausbeute wurde in vier Experimenten durchgeführt. Pro Versuch wurden 30 SKBR3-Zellen inokuliert (3.6.1.). Die Tumorzellen wurden mittels der Antikörper Ber-EP4, GP1.4, HMPV und einer Kombination dieser Antikörper isoliert (3.6.3.1.). Nach Selektion aus Medium und Blut (3.6.3.3.) wurden die Tumorzellen mit Ziege gegen Maus IgG-Alexa 488 und Hoechst 33342 (2 µg und 1 µg/Färbeansatz) gefärbt sowie fluoreszenzmikroskopisch analysiert und gezählt (3.7.1.).

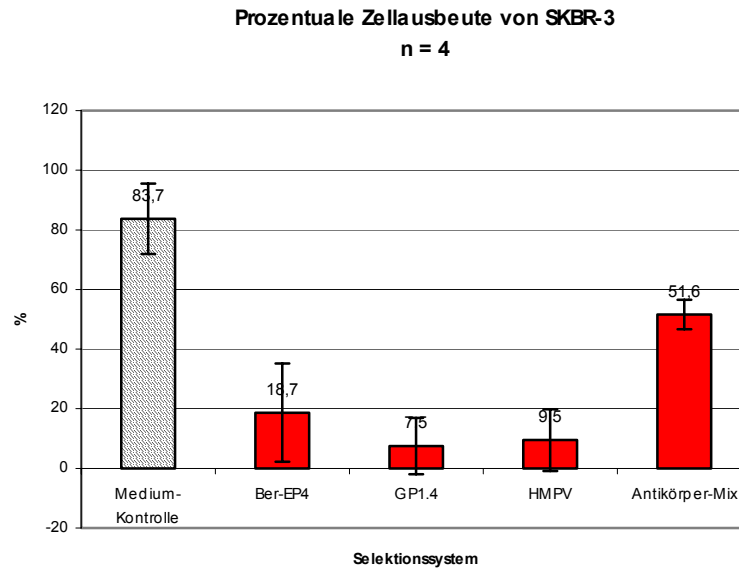


Abbildung 7: Durchschnittliche Tumorzell-Ausbeute der Zelllinie SKBR3 mit verschiedenen Selektionssystemen.

Die Abbildung zeigt die durchschnittliche prozentuale Tumorzellausbeute der Zelllinie SKBR3 aus peripherem Blut und Medium. Die einzelnen Selektionssysteme bestanden aus den Antikörpern gegen EA (Klon: Ber-EP4) und MUC1 (Klon: GP1.4 und HMPV) sowie einer Kombination aus diesen Antikörpern (Antikörper-Mix). Als Positivkontrolle wurde die Selektion von SKBR3-Zellen aus Medium mit dem Antikörper-Mix durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde mit dem Mikroskop IX50 durchgeführt. Die Standardabweichung ist graphisch dargestellt. Die graphische Auswertung wurde mit dem Programm Excel durchgeführt.

Inokulierte Tumorzellen der Zelllinie SKBR3 konnten sowohl mit den einzeln eingesetzten Antikörpern und einer Kombination dieser Antikörper erfolgreich aus Medium und Blut isoliert werden (Abb. 7). Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der Tumorzellen im Medium in vier Experimenten lag hierbei bei 83,7 %. Die Selektion mit dem einzelnen Antikörper gegen EA (Klon: Ber-EP4) zeigte die höchste Zellausbeute mit einem Durchschnittswert von 18,7 %. Die Selektion mit dem Antikörper HMPV und GP1.4 erreichten in vier Experimenten eine durchschnittliche Zellausbeute von 9,5 % bzw. 7,5 %. Die Selektionsrate von SKBR3-Zellen aus Blut erreichte mit der Kombination der verwendeten Antikörper in vier Experimenten einen Durchschnittswert von 51,6 %.

Die prozentuale Zellausbeute von inokulierten SKBR3-Zellen zeigt einen deutlichen Synergieeffekt der verwendeten Antikörperkombination im Vergleich mit den einzeln eingesetzten Antikörpern (Abb. 7).

4.2.2. Nachweis tumorassoziierter Transkripte in Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR

Für den spezifischen und sensitiven Nachweis von Brusttumorzellen in Blut wurde eine Multiplex-RT-PCR entwickelt, welche gleichzeitig den Nachweis der Expressionsprodukte von vier unterschiedlichen tumorassozierten Genen ermöglicht. Hierbei handelt es sich um GA733.2 (384 bp), MUC1 (292 bp), HER2 (265 bp) und CLAUDIN7 (225 bp). Als Modellsystem wurden die Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3, die Primärzelllinien 1590 und die Primärzellpräparation HNEC verwendet. Als interne Kontrolle diente die Amplifikation von AKTIN-mRNA, welche in Leukozyten und den verwendeten Brustkrebszelllinien konstitutiv exprimiert wird. Für die präanalytische immunomagnetische Anreicherung der Tumorzellen wurde eine Kombination der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV verwendet (4.2.1). Die immunomagnetische Selektion mit dem Antikörper MOC-31 führte in Vorversuchen zu einer nicht-sensitiven Tumorzellselektion (Daten nicht gezeigt), weshalb er nicht weiter verwendet wurde. Die DNA-Sequenz der amplifizierten Tumormarkerfragmente wurde durch Sequenzanalyse bestimmt (3.9.).

Tumorzellen wurden in abnehmender Zahl von 1000 bis zwei Zellen in 5 ml Blut einer gesunden Person inokuliert (3.6.1.) und nach immunomagnetischer Selektion (3.6.3.2.) mRNA isoliert (3.8.1.). Die Expressionsanalyse der Marker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 erfolgte mittels RT-PCR (3.8.2.). Als Negativkontrollen wurden ein Ansatz ohne RNA-Matrize (Negativkontrolle der cDNA-Synthese) und ein Ansatz ohne cDNA-Matrize (Negativkontrolle der PCR) sowie ein Ansatz mit 5 ml Blut ohne inokulierte Tumorzellen eingesetzt. Die Positivkontrolle bestand aus 1000 inokulierten Tumorzellen in 5 ml Blut. Amplifikate wurden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt (3.8.3.).

4.2.2.1. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem MCF7

Für die Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte wurde die Östrogenrezeptor-positive Brustkrebszelllinie MCF7 verwendet. Hierbei wurden je 2, 5, 10, 100, und 1000 MCF7-Zellen in 5 ml Blut einer gesunden Person inokuliert.

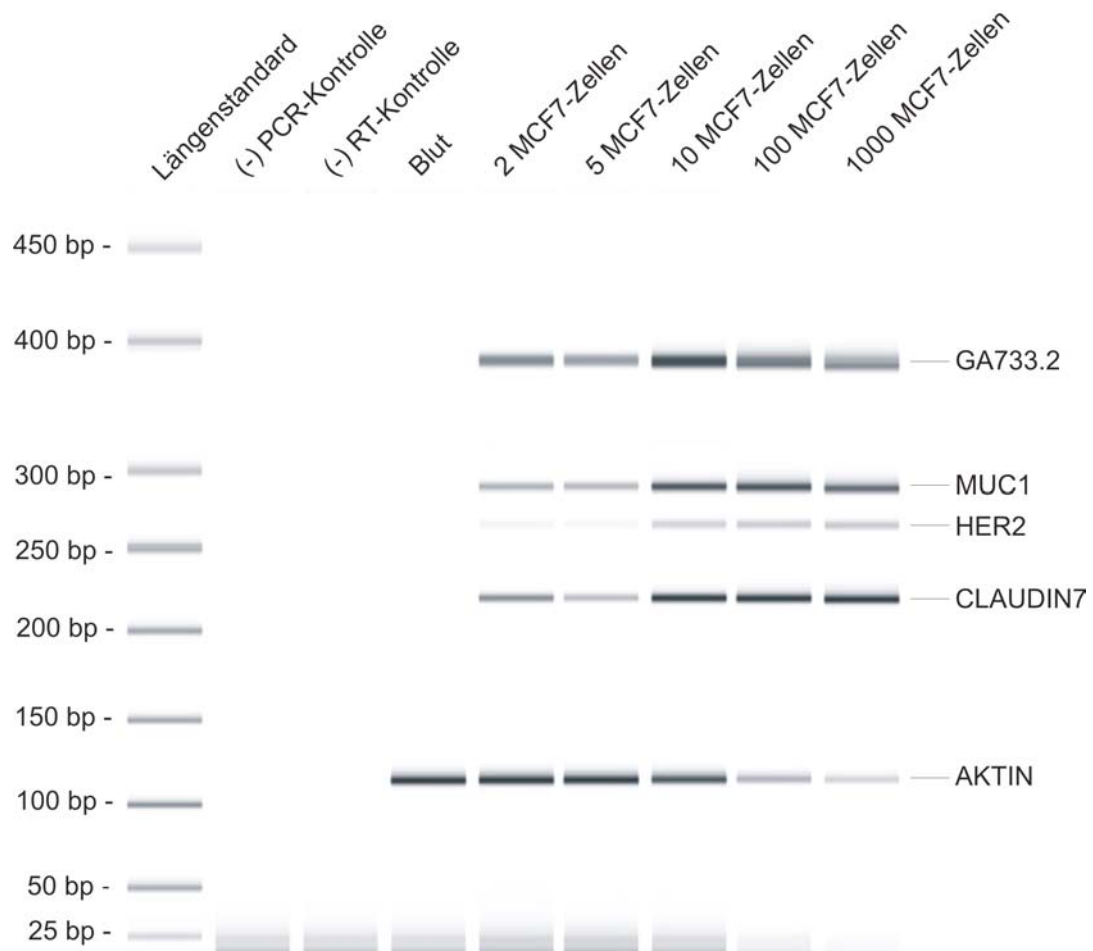


Abbildung 8: Expressionsanalyse der Zelllinie MCF7 mittels Multiplex-RT-PCR.

Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA-Fragmente nach immunomagnetischer Selektion und RT-PCR mit isolierter mRNA aus selektionierten MCF7-Zellen. Dargestellt sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2 (384 bp), MUC1 (292 bp), HER2 (265 bp) und CLAUDIN7 (225 bp) sowie das Amplifikat der internen Kontrolle AKTIN (118 bp). Die Fragmentgrößen des verwendeten Längenstandards sind angegeben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Bioanalyser 2100.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse der tumorassoziierten Transkripte GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 mit MCF7-Zellen (Abb. 8) zeigt bis in den untersten Sensitivitätsbereich, d. h. zwei inokulierten MCF7-Zellen in 5 ml Blut in allen Versuchen die erwarteten Fragmentgrößen von 384 bp (GA733.2), 292 bp (MUC1), 265 bp (HER2) und 225 bp (CLAUDIN7). In Blut ohne inokulierte Tumorzellen konnten keine Tumormarkerfragmente nachgewiesen werden. In allen matrizehaltigen Ansätzen konnte weiterhin das AKTIN-Fragment, d. h. die interne PCR-Kontrolle von 118 bp amplifiziert werden. Ansätze ohne Matrize zeigten keine amplifizierten Fragmente.

4.2.2.2. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem SKBR3

Für die Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte wurde die Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie SKBR3 verwendet. Hierbei wurden je 2, 5, 10, 100, und 1000 SKBR3-Zellen in 5 ml Blut einer gesunden Person inokuliert.

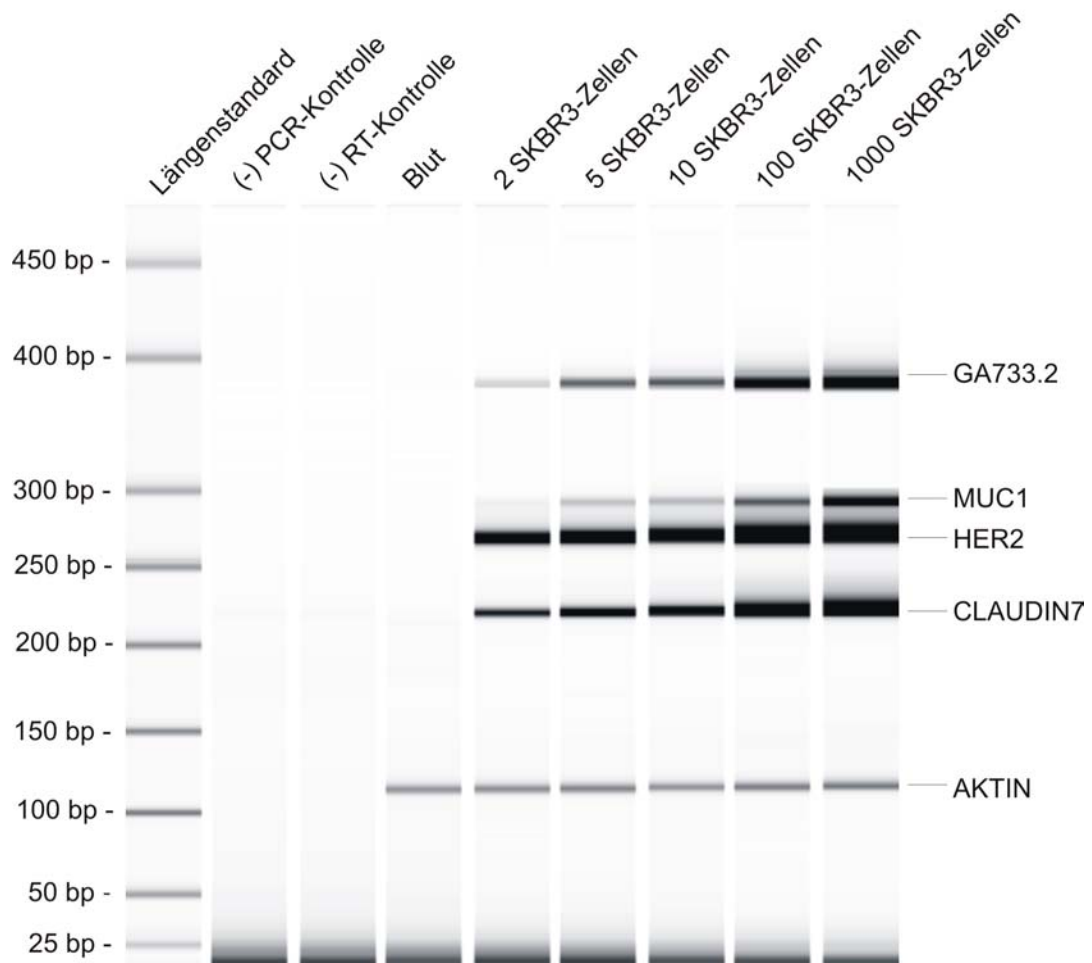


Abbildung 9: Expressionsanalyse der Zelllinie SKBR3 mittels Multiplex-RT-PCR.

Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA-Fragmente nach immunomagnetischer Selektion und RT-PCR mit isolierter mRNA aus selektionierten SKBR3-Zellen. Dargestellt sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2 (384 bp), MUC1 (292 bp), HER2 (265 bp) und CLAUDIN7 (225 bp) sowie das Amplifikat der internen Kontrolle AKTIN (118 bp). Die Fragmentgrößen des verwendeten Längenstandards sind angegeben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Bioanalyser 2100.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse der tumorassozierten Transkripte GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 mit SKBR3-Zellen (Abb. 9) zeigt bis in den untersten Sensitivitätsbereich, d. h. zwei inokulierten SKBR3-Zellen in 5 ml Blut in allen Versuchen analog zu MCF7 die erwarteten Fragmentgrößen von 384 bp (GA733.2), 292 bp (MUC1), 265 bp (HER2) und 225 bp (CLAUDIN7). Die Stärken der amplifi-

zierten Banden korrelieren hierbei mit der Zahl der inokulierten Tumorzellen. Bei zwei inokulierten SKBR3-Zellen ist die 292 bp-MUC1-Bande nur noch schwach aber dennoch deutlich erkennbar. Im peripheren Blut ohne inokulierte Tumorzellen konnten keine Tumormarkerfragmente nachgewiesen werden. In allen matricelhaltigen Ansätzen konnte weiterhin das AKTIN-Fragment, d. h. die interne PCR-Kontrolle von 118 bp amplifiziert werden. Ansätze ohne Matrize zeigten keine amplifizierten Fragmente.

4.2.2.3. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem 1590

Bei der Zelllinie 1590 handelt es sich um eine Primärzelllinie, die aus einer ossären Mikrometastase der Brustkrebspatientin 9 (4.3.1.) entwickelt und freundlicherweise von Herrn Dr. Kaul (Onkologisches Labor der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Expressionsanalyse wurden je 2, 5, 100, und 1000 1590-Zellen in 5 ml Blut einer gesunden Person inokuliert.

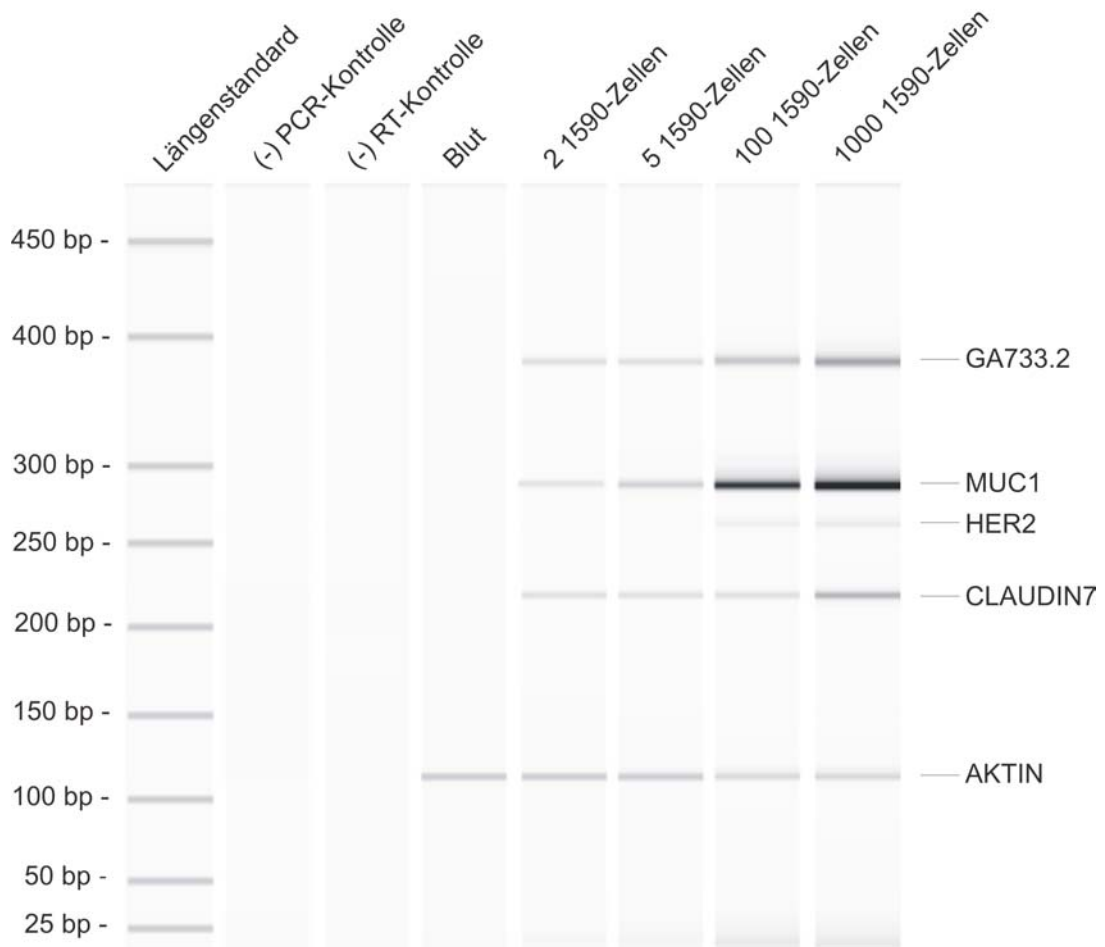


Abbildung 10: Expressionsanalyse der Primärzelllinie 1590 mittels Multiplex-RT-PCR.

Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA-Fragmente nach immunomagnetischer Selektion und RT-PCR mit isolierter mRNA aus selektionierten 1590-Zellen. Dargestellt sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2 (384 bp), MUC1 (292 bp), HER2 (265 bp) und CLAUDIN7 (225 bp) sowie das Amplifikat der internen Kontrolle AKTIN (118 bp). Die Fragmentgrößen des verwendeten Längenstandards sind angegeben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Bioanalyzer 2100.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse der tumorassoziierten Transkripte GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 mit Zellen der Primärzelllinie 1590 (Abb. 10) zeigt bei 100 und 1000 inokulierten 1590-Zellen in 5 ml Blut in allen Versuchen die erwarteten Fragmentgrößen von 384 bp (GA733.2), 292 bp (MUC1), 265 bp (HER2) und 225 bp (CLAUDIN7). Bei zwei und fünf inokulierten Tumorzellen sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2, MUC1 und CLAUDIN7 erkennbar. In peripherem Blut ohne inokulierte Tumorzellen konnten keine Tumormarkerfragmente nachgewiesen werden. In allen matrizehaltigen Ansätzen konnte weiterhin das AKTIN-Fragment, d. h. die interne PCR-Kontrolle von 118 bp amplifiziert werden. Ansätze ohne Matrize zeigten keine amplifizierten Fragmente.

4.2.2.4. Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte: Modellsystem HNEC

Für die Expressionsanalyse tumorassoziierter Transkripte wurde eine Primärzellpräparation humaner Epithelzellen (HNEC) verwendet. Hierbei sollte untersucht werden, ob eine Unterscheidung zwischen Brustkrebszellen epithelialen Ursprungs und nicht-entarteten Epithelzellen möglich ist. Da die in der Expressionsanalyse untersuchten Marker nicht tumorspezifisch, sondern u. a. epithelzellossoziiert sind, war eine geringe Expression der untersuchten Marker in HNEC zu erwarten.

Für die Analyse wurden je 10, 100 und 1000 HNEC in 5 ml Blut einer gesunden Person inokuliert.

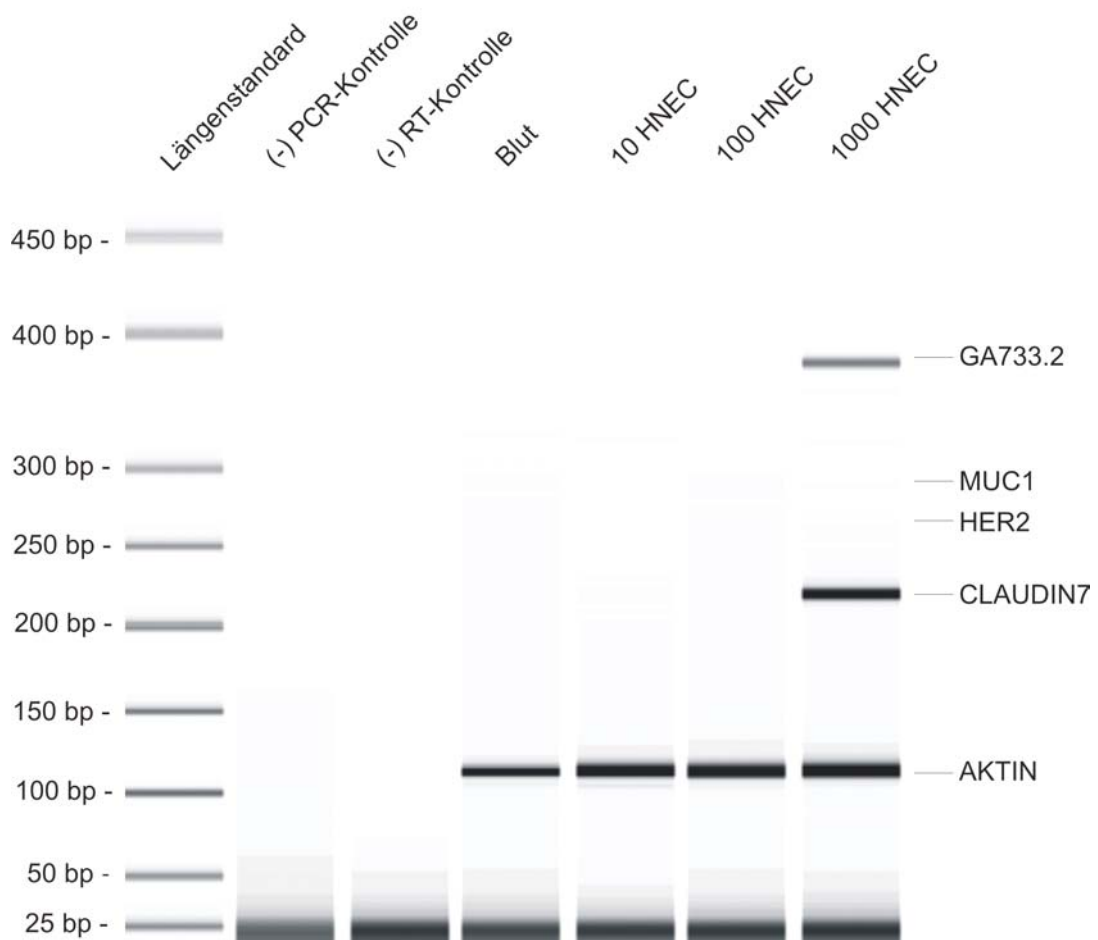


Abbildung 11: Expressionsanalyse der Primärzellpräparation HNEC mittels Multiplex-RT-PCR. Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA-Fragmente nach immunomagnetischer Selektion und RT-PCR mit isolierter mRNA aus selektionierten HNEC. Dargestellt sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2 (384 bp) und CLAUDIN7 (225 bp) sowie das Amplifikat der internen Kontrolle AKTIN (118 bp). Die Fragmentgrößen des verwendeten Längenstandards sind angegeben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Bioanalyser 2100.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse der tumorassoziierten Transkripte GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 mit Zellen der Primärzellpräparation HNEC (Abb. 11) zeigt nur bei 1000 inokulierten HNEC in 5 ml Blut in allen Versuchen amplifizierte Fragmentgrößen von 384 bp (GA733.2) und 225 bp (CLAUDIN7). Die DNA-Fragmente der Marker MUC1 (292 bp) und HER2 (265 bp) wurden nicht amplifiziert. Bei 10 und 100 inokulierten HNEC sowie in Blut ohne inokulierte HNEC wurde kein Tumormarkerfragment amplifiziert. In allen matrizehaltigen Ansätzen konnte weiterhin das AKTIN-Fragment, d. h. die interne PCR-Kontrolle von 118 bp amplifiziert werden. Ansätze ohne Matrize zeigten keine amplifizierten Fragmente.

Der Multiplex-RT-PCR-Nachweis der tumorassoziierten Proteine GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 ist mit den Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3 sowie der aus einer Brustkrebspatientin etablierten Primärzelllinie 1590 gelungen. Hierbei wurde für die Marker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 eine Nachweissensitivität von zwei inokulierten Tumorzellen in 5 ml Blut unter Verwendung von MCF7- und SKBR3-Zellen erreicht. Unterschiede zwischen den Zelllinien zeigten sich beim Marker HER2, welcher bei zwei und fünf inokulierten Tumorzellen der Zelllinie MCF7 nur sehr schwach detektierbar war (Abb. 8) sowie beim Marker MUC1, welcher bei zwei inokulierten Tumorzellen der Zelllinie SKBR3 ebenfalls nur noch schwach zu erkennen war (Abb. 9). Unter Verwendung der Primärzelllinie 1590 konnten die Marker GA733.2, MUC1 und CLAUDIN7 bei zwei inokulierten Tumorzellen in 5 ml Blut nachgewiesen werden (Abb. 10). Bei einem angenommenen durchschnittlichen Leukozytentiter von 3×10^6 /ml bis 1×10^7 /ml Blut entspricht dies einer Sensitivität von einer nachgewiesenen Tumorzelle auf $7,5 \times 10^6$ bis $2,5 \times 10^7$ Leukozyten. Die hohe Nachweissensitivität des Systems hat ebenfalls die Detektion von zwei der untersuchten Tumormarker (GA733.2 und CLAUDIN7) in nicht-entarteten HNEC zur Folge (Abb. 11). Diese wurden jedoch erst ab einer Zellzahl von 1000 in 5 ml Blut nachgewiesen. Eine solch hohe Zellzahl von Tumorzellen ist bisher in der Literatur noch nicht dokumentiert worden. Eine Detektion von nicht-entarteten Epithelzellen im Blut von Brustkrebspatienten kann somit als extrem unwahrscheinlich angenommen werden.

4.2.3. Immunzytochemischer Nachweis von SKBR3-Zellen nach immunomagnetischer Selektion

Brustkrebszellen der Zelllinie SKBR3 wurden mit einer Kombination der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV aus Blut immunomagnetisch isoliert (4.2.1.) und immunzytochemisch nachgewiesen.

SKBR3-Zellen wurden hierbei nach Ablösen und Vitalitäts- bzw. Zellzahlbestimmung (3.1. und 3.2.) in Blut inokuliert (3.6.1.) und nach immunomagnetischer Selektion (3.6.3.3.) auf Objektträger gebracht (3.4.2.). Isolierte Zellen wurden mit dem Antikörper 5D3 gefärbt und nach immunzytochemischer Färbung (3.5.3.) am Lichtmikroskop analysiert.

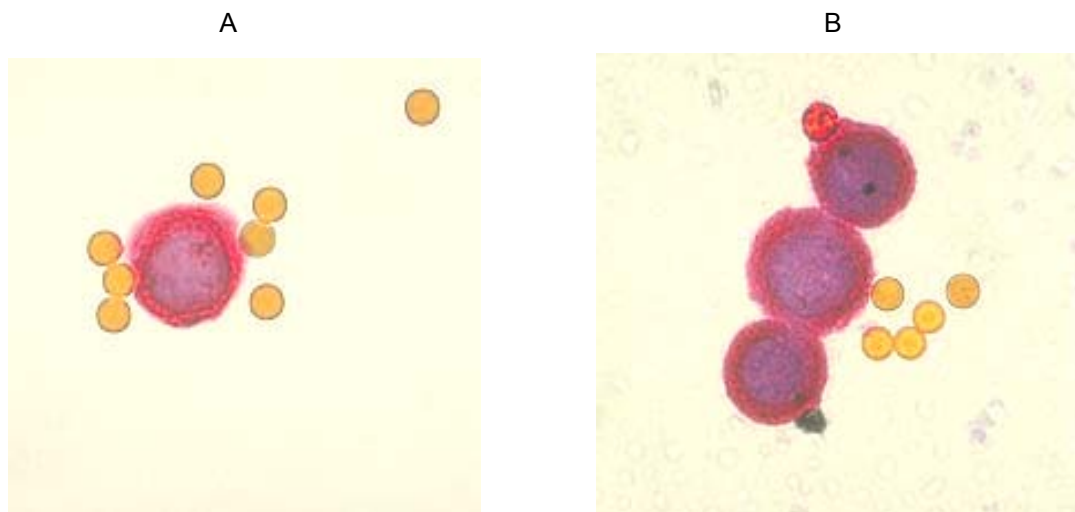


Abbildung 12: Immunzytochemische Färbung von selektionierten SKBR3-Zellen nach immunomagnetischer Selektion.

Die Abbildungen A und B zeigen SKBR3-Zellen nach Dynabead[®]-Selektion aus Blut und Färbung mit dem gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichteten Antikörper 5D3. Die Bindung des Zytokeratinantikörpers wurde über eine Biotin-Streptavidin verstärkte Alkalische Phosphatase-Immunfärbung sichtbar gemacht. Gefärbte Tumorzellen erscheinen rot. Zellkerne wurden mit Haematoxylin angefärbt und sind blau dargestellt. Die Hellfeldaufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop IX50 gemacht (Vergrößerung 1000 x).

Inokulierte SKBR3-Zellen konnten nach immunomagnetischer Selektion mit Dynabeads[®] und immunzytochemischer Detektion eindeutig vor einem Hintergrund von Leukozyten identifiziert werden (Abb. 12). Dynabeads[®] sind als kleine, hell gefärbte Kugeln zu erkennen und beeinflussen die immunzytochemische Färbung nicht (Abb. 12). Gefärbte Zellkerne von Leukozyten sind vereinzelt zu erkennen, d. h. dass Leukozyten durch Dynabeads[®] unspezifisch selektioniert wurden (Daten nicht gezeigt). Eine Differenzierung von Leukozyten und inokulierten SKBR3-Zellen ist auch

nach immunomagnetischer Selektion mittels der verwendeten Färbemethode eindeutig möglich. Unspezifisch selektionierte Leukozyten werden nicht mittels Multiplex-RT-PCR nachgewiesen (4.2.2.) und verringern daher nicht die Nachweisspezifität des Tumorzellnachweises.

Die beschriebene Färbemethode wurde daraufhin zur Identifizierung von Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen benutzt.

4.3. Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 21 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs untersucht (3.11.). Von jeder Patientin wurden mindestens 10 ml peripheres Blut abgenommen und zu gleichen Teilen für den Nachweis von mRNA tumorssoziierter Proteine (3.6.3.2.) und für den immunzytochemischen Nachweis von Tumorzellen verwendet (3.6.3.3.).

4.3.1. Nachweis disseminierter Tumorzellen in Brustkrebspatientinnen mittels Multiplex-RT-PCR

Von jeder Patientin wurden 5 ml peripheres Blut verwendet und nach immunomagnetischer Selektion mRNA isoliert (3.6.3.2. und 3.8.1.). Die Expressionsanalyse der Marker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 erfolgte mittels RT-PCR (3.8.2.). Als Negativkontrollen wurden ein Ansatz ohne RNA-Matrize, (Negativkontrolle der cDNA-Synthese), ein Ansatz ohne cDNA-Matrize (Negativkontrolle der PCR) und ein Ansatz mit 5 ml Blut ohne inokulierte Tumorzellen eingesetzt. Die Positivkontrolle bestand aus 50 inokulierten SKBR3-Zellen in 5 ml Blut. Amplifikate wurden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt (3.8.3.)

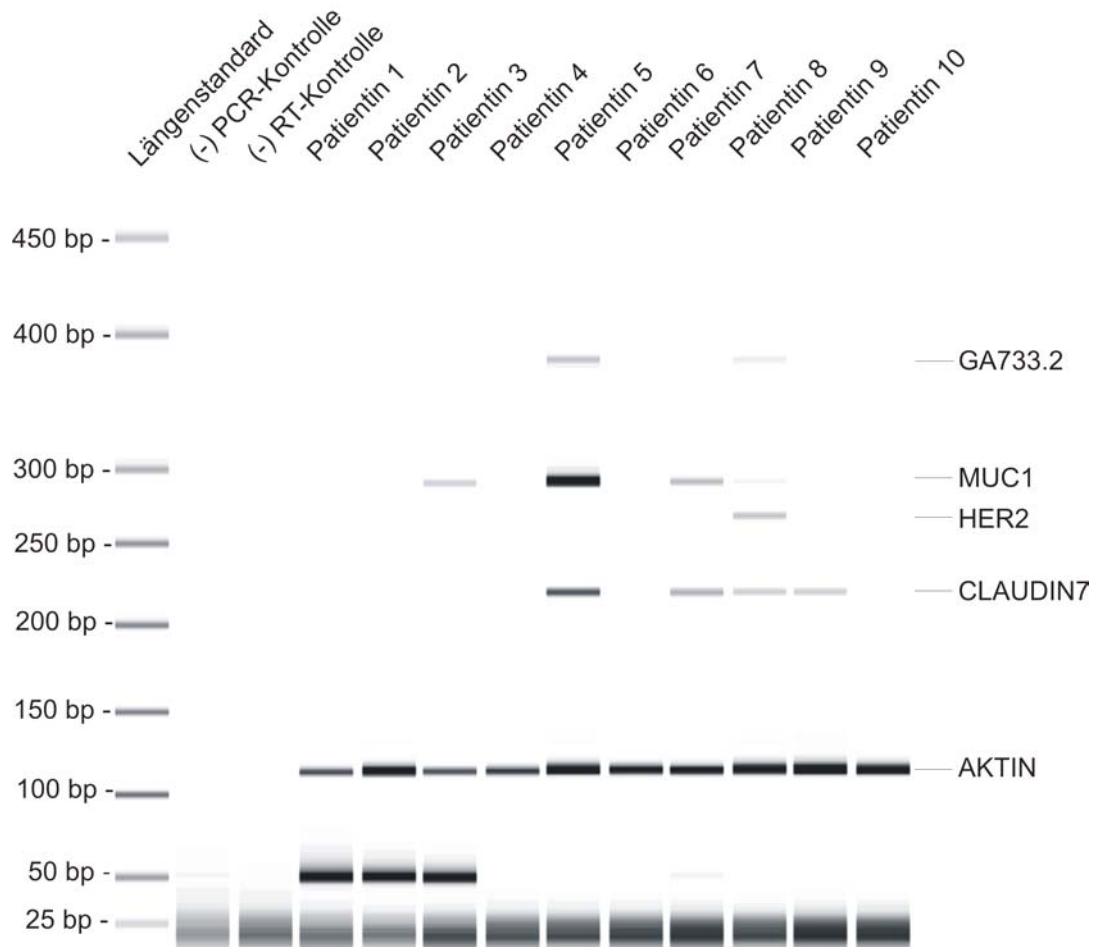


Abbildung 13 a: Multiplex-RT-PCR brusttumorassoziierter Transkripte in zirkulierenden Tumorzellen der Brustkrebspatientinnen 1-10.

Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA-Fragmente nach immunomagnetischer Selektion und RT-PCR mit isolierter mRNA aus selektionierten Tumorzellen der Brustkrebspatientinnen 1-10. Dargestellt sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2 (384 bp), MUC1 (292 bp), HER2 (265 bp) und CLAUDIN7 (225 bp) sowie das Amplifikat der internen Kontrolle AKTIN (118 bp). Die Fragmentgrößen des verwendeten Längenstandards sind angegeben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Bioanalyser 2100.

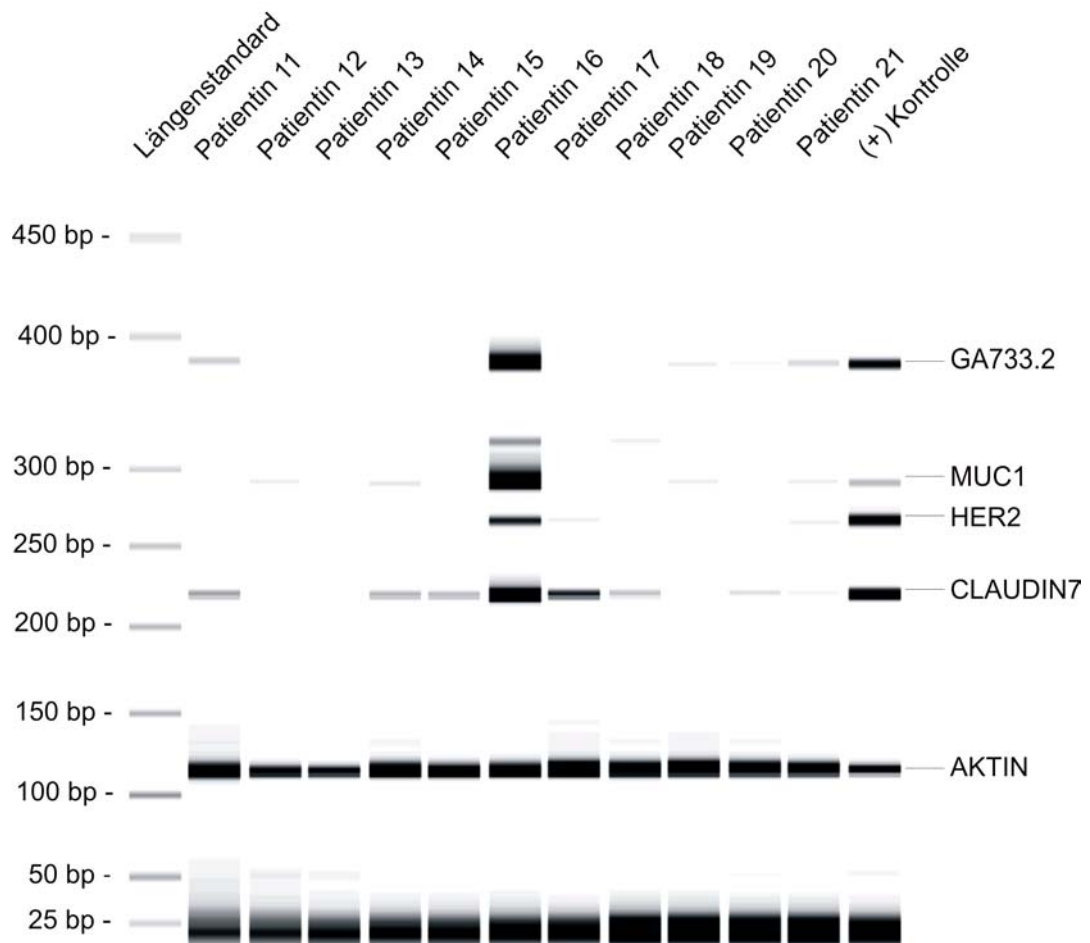


Abbildung 13 b: Multiplex-RT-PCR brusttumorassoziierter Transkripte in zirkulierenden Tumorzellen der Brustkrebspatientinnen 11-21.

Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA-Fragmente nach immunomagnetischer Selektion und RT-PCR mit isolierter mRNA aus selektionierten Tumorzellen der Brustkrebspatientinnen 11-21. Dargestellt sind die Amplifikate der Tumormarker GA733.2 (384 bp), MUC1 (292 bp), HER2 (265 bp) und CLAUDIN7 (225 bp) sowie das Amplifikat der internen Kontrolle AKTIN (118 bp). Die Fragmentgrößen des verwendeten Längenstandards sind angegeben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Bioanalyzer 2100.

Bei Expressionsanalysen der untersuchten Tumormarker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 im peripheren Blut von 21 Brustkrebspatientinnen mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium konnte bei 15 von 21 Brustkrebspatientinnen (71,4 %) mindestens ein Marker erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 13 a und 13 b). Bei sechs der 21 Brustkrebspatientinnen (28,6 %) konnte keiner der untersuchten Tumormarker eindeutig detektiert werden. In allen matrizehaltigen Ansätzen konnte das AKTIN-Fragment, d. h. die interne PCR-Kontrolle von 118 bp amplifiziert werden. Ansätze ohne Matrize zeigten keine amplifizierten Fragmente. Die Positivkontrolle zeigte die erwarteten Bandengrößen der vier nachzuweisenden Tumormarker.

Das GA733.2-Fragment (384 bp) wurde eindeutig bei den Patientinnen 5 und 8 sowie bei den Patientinnen 11, 16, 19, 20 und 21 nachgewiesen. Bei 33,3 % der untersuchten Brustkrebspatientinnen konnte somit GA733.2 nachgewiesen werden. Das MUC1-Fragment (292 bp) konnte eindeutig bei den Patientinnen 3, 5, 7 und 8 sowie bei den Patientinnen 12, 14, 16, 19 und 21 amplifiziert werden, d. h. MUC1 wurde in 42,9 % aller untersuchten Patientinnen nachgewiesen. Das 265 bp-Amplifikat des HER2-Markers wurde eindeutig bei der Patientin 8 und in den Patientinnen 16, 17 und 21, d. h. bei 4 von 21 (19,0 %) Patientinnen detektiert. CLAUDIN7 wurde eindeutig als 225 bp-Bande bei den Patientinnen 5, 7, 8 und 9 sowie bei den Patientinnen 11, 14, 15, 16, 17, 18, 20 und 21 nachgewiesen. Als Einzelmarker konnte CLAUDIN7 somit in 57,1 % der untersuchten Patientinnen detektiert werden.

Eindeutig konnte weiterhin bei den Patientinnen 16 und 18 ein DNA-Fragment amplifiziert, welches zwischen der MUC1- und GA733.2-Bande läuft und eine Größe von 320 bp besitzt. Die Identität des Fragmentes wurde durch Sequenzanalyse und Datenbankabgleich der ermittelten Sequenz bestimmt (4.3.2.).

Die in Abb. 13 a und 13 b gezeigte Heterogenität des Expressionsprofils hinsichtlich der untersuchten Tumormarker ist in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Expressionsanalyse mittels Multiplex-RT-PCR von 21 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs.

Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung der in Abb. 12 a und 12 b dargestellten Ergebnisse der Multiplex-RT-PCR. Dargestellt sind die Patientinnen und die vier untersuchten Tumormarkerfragmente CLAUDIN7, HER2, MUC1 und GA733.2. Der Nachweis eines Tumormarkerfragmentes mittels Multiplex-RT-PCR wird durch ein Plus (+) gekennzeichnet.

Brustkrebs-Patientin	CLAUDIN7 (225 bp)	HER2 (265 bp)	MUC1 (292 bp)	GA733.2 (384 bp)	Anzahl der detektierten Tumormarker
8	+	+	+	+	
16	+	+	+	+	4
21	+	+	+	+	
5	+	-	+	+	3
7	+	-	+	-	
11	+	-	-	+	
14	+	-	+	-	2
17	+	+	-	-	
19	-	-	+	+	
20	+	-	-	+	
3	-	-	+	-	
9	+	-	-	-	
12	-	-	+	-	1
15	+	-	-	-	
18	+	-	-	-	
1	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	0
6	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	

Während bei den Patientinnen 1, 2, 4, 6, 10 und 13 keine Tumormarkerfragmente amplifiziert wurden, konnten in allen anderen untersuchten Patientinnen (71,4 %) Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der detektierten Expressionsmuster von Tumorzellen in den untersuchten Brustkrebspatientinnen führte zu folgendem Ergebnis (Tabelle 2): Detektierte Tumorzellen in den Patientinnen 8, 16 und 21, d. h. 3 von 15 der Patientinnen (20,0 %) mit nachgewiesenen Tumorzellen exprimierten alle untersuchten Marker. Zirkulierende Tumorzellen in Patientin 5 exprimierten die drei Marker GA733.2, MUC1 und CLAUDIN7, was einem Anteil von 6,7 % der Patientinnen mit nachgewiesenen Tumorzellen entspricht. Patientinnen, bei denen zwei der untersuchten Marker

detektiert werden konnten sind Patientin 7 und 14 (CLAUDIN7 und MUC1), Patientin 11 und 20 (CLAUDIN7 und GA733.2), Patientin 17 (CLAUDIN7 und HER2) und Patientin 19 (MUC1 und GA733.2). Dies entspricht einem Anteil von 40,0 % der Patientinnen mit nachgewiesenen Tumorzellen. Tumorzellen, welche nur einen einzigen der untersuchten Marker exprimierten, wurden bei Patientin 3 (MUC1), Patientin 9 (CLAUDIN7), Patientin 12 (MUC1), Patientin 15 (CLAUDIN7) und Patientin 18 (CLAUDIN7) detektiert, d. h. Tumorzellen in 5 von 15 der Patientinnen (33,3 %) mit nachgewiesenen Tumorzellen exprimierten nur einen der untersuchten Tumormarker.

4.3.2. Identifizierung des 320 bp-Fragmentes mittels Sequenzvergleich

Die Sequenz des 320 bp-Fragmentes, welches in Patientin 16 und 18 amplifiziert wurde, konnte durch Sequenzanalyse (3.9.5.) bestimmt werden. Hierbei zeigte ein Datenbankabgleich der ermittelten Sequenz mit publizierten Sequenzen (NCBI), dass es sich um das CLAUDIN7-Fragment (225 bp), inklusive einer amplifizierten Intronsequenz, welche zwischen Exon 4 und Exon 5 liegt, handelt. Es kann postuliert werden, dass es sich hierbei um eine Spleißvariante des CLAUDIN7-Gens handelt, wobei die Intronsequenz zwischen Exon 4 und Exon 5 nicht entfernt wurde.

4.3.3. Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in Brustkrebspatientinnen

Das periphere Blut von 21 Brustkrebspatientinnen wurde analysiert, um zirkulierende Tumorzellen mittels Immunzytochemie nachzuweisen. Von jeder Patientin wurden 5 ml Blut verwendet. Tumorzellen wurden durch immunomagnetische Selektion (3.6.3.3.) isoliert und zur Analyse auf Objektträger gebracht (3.4.2.). Die Zytospinpräparate wurden ü. N. getrocknet und bis zur immunzytochemischen Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Isolierte Tumorzellen wurden mit dem Antikörper 5D3 immunzytochemisch gefärbt und (3.5.3.) am Lichtmikroskop analysiert.

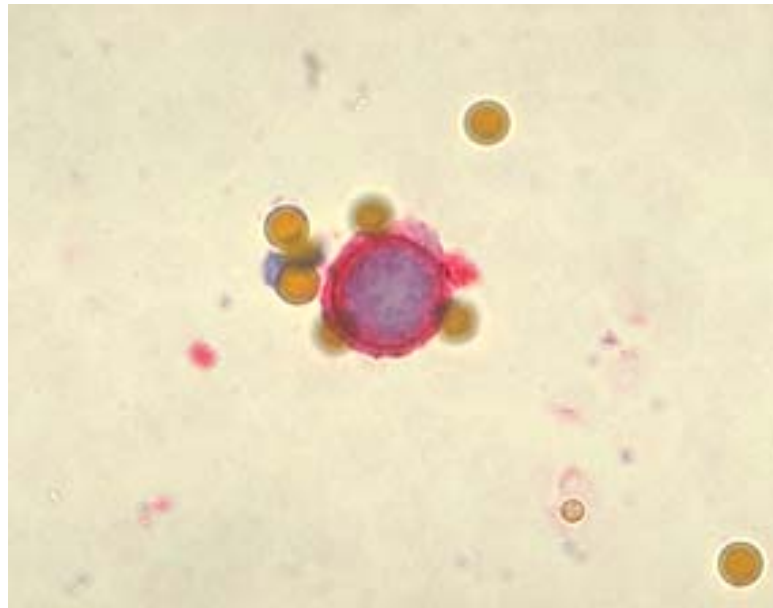


Abbildung 14: Immunzytochemische Färbung einer isolierten Tumorzelle der Brustkrebspatientin 8 nach immunomagnetischer Selektion.

Die Abbildung zeigt eine aus der Brustkrebspatientin 8 isolierte Tumorzelle nach immunomagnetischer Selektion aus Blut und Färbung mit dem gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichteten Antikörper 5D3. Die Bindung des Zytokeratinantikörpers wurde über eine Biotin-Streptavidin verstärkte Alkalische Phosphatase-Immunfärbung sichtbar gemacht. Die gefärbte Tumorzelle erscheint rot. Der Zellkern wurde mit Haematoxylin angefärbt und erscheint blau. Die isolierte Zelle erfüllt durch ihre Größe, Färbung und große Kern-Zytosol-Ratio alle angelegten Kriterien einer Tumorzelle. Die Hellfeldaufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop IX50 gemacht (Vergrößerung 1000 x).

Im Blut der Brustkrebspatientinnen 8, 12, 14, 15, 17 und 20 konnten Tumorzellen immunzytochemisch nachgewiesen werden. Abb. 14 zeigt exemplarisch eine der isolierten Tumorzellen aus Brustkrebspatientin 8. Erkennbar sind das stark rot gefärbte Zytosol sowie der blau gefärbte Zellkern, welcher aufgrund seiner Größe fast den gesamten intrazellulären Raum einnimmt. Dynabeads[®] sind als kleine, hell gefärbte Kugeln zu erkennen, von denen drei noch an die Zelle gebunden sind.

4.3.4. Nachweis von Tumormarkersedimentproteinen mittels ELISA

Die Konzentrationen der Serumproteine CA15.3 und CEA in 21 Brustkrebspatientinnen wurden mit einem ELISA-basierten Verfahren bestimmt. Ein Teil der Daten wurde hierbei mit dem Elecsys 2010-System der Firma Roche an der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg erhoben, der andere Teil mit einem Mikropartikel-ELISA-basierten Verfahren (MEIA) der Firma Abbott (3.10.).

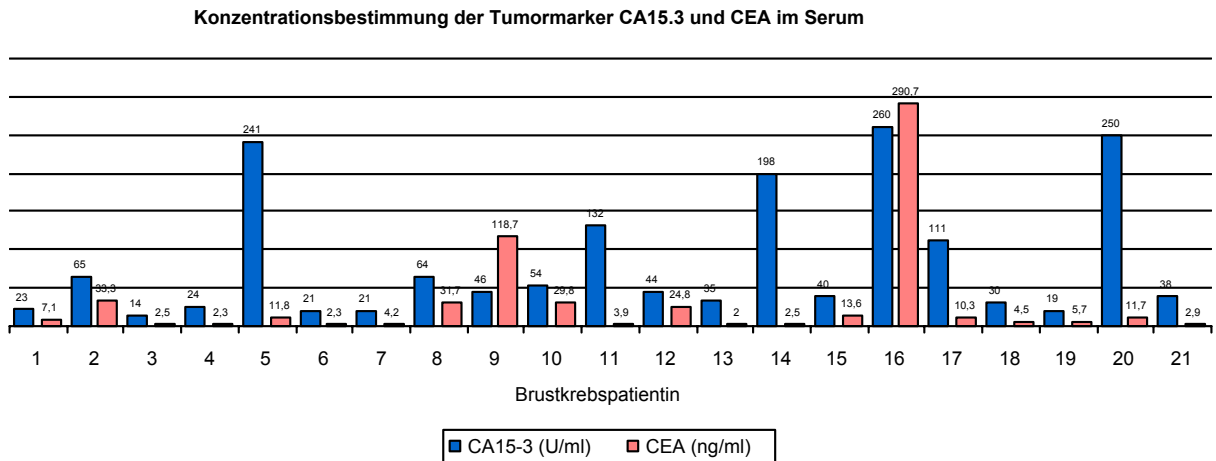


Abbildung 15: Proteinkonzentrationsbestimmung der Tumormarker CA15.3 und CEA im Serum von Brustkrebspatientinnen.

Die Abbildung zeigt die Darstellung der bestimmten CA15.3- (blau) und CEA (rot)-Proteinkonzentrationen im Serum von 21 Brustkrebspatientinnen. Dargestellt sind die Absolutwerte der ELISA-Messung. Die Werte für die Patientin 7, 9, 12, 13, 14 und 20 wurden mit dem MEIA-System der Firma Abbott gemessen. Der Schwellwert für CA15.3 beträgt hier 28 U/ml, für CEA 2,8 ng/ml. Alle anderen Werte wurden mit dem Elecsys 2010-System der Firma Roche bestimmt. Der Schwellwert für CA15.3 beträgt bei diesem System 25 U/ml und für CEA 2,5 ng/ml. Für jede Patientin wurde der CA15.3-Wert und der CEA-Wert numerisch angegeben. Die graphische Auswertung wurde mit dem Programm Excel durchgeführt.

Die ermittelten Proteinkonzentrationen der Tumormarker CA15.3 und CEA im Serum von 21 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs ergaben bei 18 Patientinnen Werte für CA15.3 oder CEA, welche über dem Schwellwert des jeweiligen verwendeten Systems lagen (Abb. 15). So wurden im Serum der Brustkrebspatientinnen 5, 11, 14, 16, 17 und 20 stark erhöhte Werte des Tumormarkers CA15.3 (86 bis 235 U/ml) über dem Schwellwert ermittelt, während bei den Brustkrebspatientinnen 2, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 18 und 21 geringe bis mäßig erhöhte Werte vorlagen (5 bis 40 U/ml). Der Tumormarker CEA zeigte in den Brustkrebspatientinnen 9 und 16 stark erhöhte Werte (115,9 und 288,2 ng/ml), während die Brustkrebspatientinnen 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 18, 19, 20 und 21 gering bis mäßig erhöhte CEA-Werte über dem Schwellwert von CEA (0,4 bis 30,8 ng/ml) aufwiesen.

4.3.5. Zusammenfassende Analyse der Untersuchungsergebnisse des Patientinnenkollektivs

Das periphere Blut von 21 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs wurde analysiert, um zirkulierende Tumorzellen nachzuweisen. Als Untersuchungsmethode wurde hierbei eine hoch sensitive Multiplex-RT-PCR mit vier verschiedenen tumorassozi-

ierten Transkripten verwendet. Eine Identifizierung von Tumorzellen über den Nachweis von Zytokeratinfilamenten in isolierten Zellen aus Blut sowie eine Konzentrationsbestimmung der Tumormarker CA15.3 und CEA im Serum der untersuchten Patientinnen dienten als Vergleichsparameter (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse von 21 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs.

Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung der bisher unter 4.3.1., 4.3.3. und 4.3.4. erhobenen Daten. Dargestellt sind die Ergebnisse des Tumorzellnachweises mittels Multiplex-RT-PCR und ICC-Färbung sowie die CA15.3- und CEA-Konzentrationsbestimmung. Angegeben sind weiterhin Chemotherapeutika, mit denen die untersuchten Patientinnen behandelt wurden.

Patientin	Chemo-Therapie	Multiplex-RT-PCR	Serummarker
8	Trastuzumab	+ *	•
12	Trastuzumab/ Docetaxel	+ *	•
14	Vinorelbin	+ *	•
15	Vinorelbin	+ *	•
17	Trastuzumab/ Docetaxel	+ *	•
20	Pamidronat	+ *	•
5	Vinorelbin	+	•
7	Trastuzumab	+	•
9	Trastuzumab	+	•
11	Pamidronat	+	•
16	Doxorubicin	+	•
18	Gemzitabine/ Trastuzumab	+	•
19	Trastuzumab/ Pamidronat	+	•
21	Pamidronat	+	•
3	Doxorubicin	+	-
1	Mi/Fo/5-FU	-	•
2	Mi/Fo/5-FU	-	•
10	Gemzitabine	-	•
13	Trastuzumab/ Docetaxel	-	•
4	Epirubicin/ Docetaxel	-	-
6	Vinorelbin	-	-

Mi/Fo/5-FU = Mitomycin/Folinat/5-Fluorouracil
 + = Nachweis disseminierter Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR
 +* = Nachweis disseminierter Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR und Immunzytochemie
 • = Erhöhte Konzentration von CA15.3 oder CEA im Serum

Ein positiver immunzytochemischer Tumorzellnachweis gelang bei den Brustkrebspatientinnen 8, 12, 14, 15, 17 und 20 (4.3.3.) und damit ausschließlich bei jenen Patientinnen, bei denen ebenfalls tumorassoziierte Transkripte nachgewiesen werden konnten (4.3.1.). Bei den Brustkrebspatientinnen 3, 5, 7, 9, 11, 16, 18, 19 und 21 wurden zwar eindeutig tumorassoziierte Transkripte nachgewiesen, jedoch

wurden zwar eindeutig tumorassoziierte Transkripte nachgewiesen, jedoch keine Tumorzellen immunzytochemisch. In diesen Fällen ist davon auszugehen, dass die hohe Sensitivität der etablierten Multiplex-RT-PCR einen Tumorzellnachweis durch Amplifikation von Tumormarkertranskripten ermöglichte, während der immunzytochemische Tumorzellnachweis aufgrund der geringeren Sensitivität negativ blieb. Beim Vergleich der ermittelten Serumkonzentrationen der Tumormarker CA15.3 und CEA mit dem Ergebnis des Tumormarkertranskriptnachweises mittels Multiplex-RT-PCR fällt auf, dass alle Patientinnen mit stark erhöhten CA15.3 oder CEA-Werten auch einen positiven Transkriptnachweis zeigten (Tabelle 3, Patientin 5, 9, 11, 14, 16 und 20). Aber auch bei Patientinnen mit nicht oder nur sehr gering erhöhten CA15.3- oder CEA-Serumwerten konnten Tumorzellen nachgewiesen werden (Tab. 3, Patientin 3, 7, 18 und 19), was den Vorteil der etablierten Nachweismethode hinsichtlich einer verlässlicheren Diagnose rezidivierenden Brustkrebses gegenüber der Tumormarkerrouinediagnostik mit CA15.3 und CEA zeigt.

Ein Zusammenhang des Tumorzellnachweises mit der Art der applizierten Chemotherapeutika kann bei Patientin 1 und 2 angenommen werden, welche mit der Kombinationstherapie Mitomycin/Folinat/5-Fluorouracil behandelt wurden und in denen keine Tumorzellen detektiert werden konnten. Ebenfalls konnten bei Patientin 4, welche mit dem Wirkstoff Epirubicin behandelt wurde, keine Tumorzellen nachgewiesen werden. Das Ergebnis kann auf die Effektivität der Chemotherapie hinsichtlich einer effizienten Zerstörung von zirkulierenden Tumorzellen zurückgeführt werden. Bei den mit anderen Chemotherapeutika behandelten Patientinnen lässt sich kein Einfluss auf den Tumorzellnachweis erkennen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein molekulares System für den Nachweis disseminierter Brusttumorzellen entwickelt, welches in der klinischen Diagnostik als „Monitoring“-Verfahren von operierten und unter Chemotherapie-Behandlung stehenden Patienten angewendet werden kann.

Zirkulierende Tumorzellen wurden in peripherem Blut von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs nach immunomagnetischer Selektion mittels Multiplex-RT-PCR eindeutig nachgewiesen und anhand ihres Tumormarkerepressionsprofils charakterisiert. Als Vergleichsparameter wurden Tumorzellen mittels Immunzytochemie nachgewiesen und die Konzentration der Tumormarker CA15.3 und CEA im Serum der Patientinnen mittels ELISA bestimmt.

Klinische Signifikanz von zirkulierenden Tumorzellen im Blut für die Prognose von Krebspatienten

Die als Metastasierung bezeichnete Bildung von Tochtergeschwülsten ist als der Faktor anzusehen, der auf das Überleben von Krebspatienten den größten Einfluss ausübt. Die hämatogene Streuung stellt hierbei den hauptsächlichsten Metastasierungsweg dar, weswegen die Existenz zirkulierender Tumorzellen im Blut als eine notwendige Erscheinung auf dem Weg zur Bildung von Fernmetastasen angesehen werden kann ((Brandt *et al.*, 2000), (Zach *et al.*, 2002)).

Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass der metastatische Prozess im Tiermodell und im Menschen ineffizient verläuft, ist jedoch davon auszugehen, dass ein großer Teil der im Blut zirkulierenden Tumorzellen überlebt und die Blutbahn erfolgreich wieder verlässt ((Jiang *et al.*, 2002), (Weiss, 1990), (Glaves *et al.*, 1988)). Eine Korrelation zwischen der Detektion zirkulierender Tumorzellen und einer schlechten Prognose im Krankheitsverlauf der Krebserkrankung konnte bereits in verschiedenen Arbeitsgruppen, hauptsächlich für Melanoma- und Prostatakrebs, dargestellt werden ((Curry *et al.*, 1999), (Olsson *et al.*, 1996)). Ebenso konnte in Patienten mit metastasiertem Brustkrebs mittels einer quantitativen RT-PCR für Zytokeratin 19 und einem Immunzytochemie (ICC)-Nachweis die Effizienz der Chemotherapie durch Detektion zirkulierender Tumorzellen über einen längeren Zeitraum festgestellt werden (Smith *et al.*, 2000). Eine Veränderung der Anzahl von Tumorzellen im

Blut korrelierte hierbei mit der Regression bzw. Progression der Krankheit. Eine positive Korrelation zwischen der Detektion von Tumorzellen mittels CEA-mRNA-RT-PCR in peripherem Blut und Lymphknoten von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen oder Brustkrebs und dem Auftreten von Tumorrezidiven konnte in einer weiteren Arbeit festgestellt werden (Mori *et al.*, 1998). In einer Pilot-Studie mit 19 Brustkrebspatientinnen wurde das Auftreten von Tumorzellen in peripherem Blut präoperativ und bis 14 Tagen postoperativ verfolgt. Hierbei wurden bei 30 % der Patientinnen Tumorzellen noch 14 Tage nach der Operation nachgewiesen (Krag *et al.*, 1999). Die Autoren folgerten daraus, dass der Tumorzellnachweis in peripherem Blut als Indikator für die Auswahl eines Patientenkollektivs, als Parameter für die Effektivität einer Therapie sowie als Indikator einer Tumorrezidivierung dienen kann.

Die Detektion zirkulierender Tumorzellen kann somit als wichtiger Faktor angesehen werden, welcher die Einteilung von Tumorstadien, die Prognose und die Therapieentscheidung hinsichtlich einer adjuvanten Chemotherapie beeinflusst (Zehentner, 2002).

Molekulare Detektion zirkulierender Tumorzellen mittels RT-PCR und das Problem der illegitimen Transkription

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Detektionssystem entwickelt, welches einen molekularen Nachweis im Blut zirkulierender Brusttumorzellen mittels RT-PCR ermöglicht. Die Methode der RT-PCR für den Nachweis disseminierter Tumorzellen basiert auf der Amplifikation von gewebespezifischer bzw. tumorassoziierter mRNA und wurde verwendet, da sie, verglichen mit anderen Tumorzellnachweismethoden, die höchste Nachweissensitivität erwarten ließ (Bustin, 2000), (Ghossein *et al.*, 1999), (Berois *et al.*, 1997). Der molekulare Tumorzellnachweis durch die Amplifikation von Tumormarkertranskripten mittels RT-PCR ist eine hochsensitive Methode, zirkulierende Tumorzellen in peripherem Blut von Brustkrebspatienten nachzuweisen und wurde zu diesem Zweck bereits in mehreren Arbeiten für die Untersuchung eingesetzt ((Bossolasco *et al.*, 2002), (de Cremoux *et al.*, 2000), (Zach *et al.*, 1999)).

Die Verwendung von tumorassoziierter mRNA als molekularen Tumormarker für eine sensitive und spezifische Tumorzelldetektion in peripherem Blut mittels RT-PCR setzt jedoch eine Reduzierung des „Leukozyten-Hintergrundes“ voraus, um die Spezifität des Tumorzellnachweises nicht durch Amplifikation „illegitimer Transkripte“ in Leuko-

zyten zu beeinträchtigen. Der Terminus „illegitime Transkription“ wurde 1989 geprägt und beschreibt die marginale Expression von gewebespezifisch exprimierten Genen in gewebetypenspezifischen Zellen wie z. B. die Expression von epithelspezifisch exprimierten Genen in hämatopoetischen Zellen (Chelly *et al.*, 1989). Untersuchungen in MNC-Fractionen aus peripherem Blut lassen vermuten, dass das Phänomen der illegitimen Transkription in allen Zellen auftreten kann (Raynor *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass während der DNA-Replikation jeder Promotor minimal durch ubiquitär vorhandene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden kann, was zu einem geschätzten Expressionsniveau von einem Transkript in 500-1000 Zellen führt (Zippelius *et Pantel*, 2000). Hochsensitive Nachweistechiken wie die RT-PCR können illegitime Transkription nachweisen, weswegen dafür gesorgt werden muss, dass die Spezifität des Tumorzellnachweises nicht eingebüßt wird (Raynor *et al.*, 2002).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine präanalytische immunomagnetische Selektion (IMS) mit einer Kombination aus drei monoklonalen Antikörpern verwendet. Eine präanalytische IMS von Brusttumorzellen erhöht gleichzeitig über eine Anreicherung der zu analysierenden Tumorzellen die Sensitivität und über eine Verringerung des Anteils unerwünschter Zellen die Spezifität der anschließenden Analyse (Ghossein *et al.*, 2001).

Immunomagnetische Zellanreicherung

In der vorliegenden Arbeit wurden epitheliale Brusttumorzellen durch die Kombination von drei monoklonalen Antikörpern, welche an magnetische Partikel (Dynabeads[®]) gekoppelt wurden, aus peripherem Blut präanalytisch angereichert. Prinzipiell geht die Verwendung einer Kombination von Antikörpern von der Überlegung aus, dass die Expression tumorassoziierter Antigene in zirkulierenden Tumorzellen in Patienten heterogen sein kann. Durch eine Kombination von Antikörpern gegen verschiedene Antigene wird somit die Wahrscheinlichkeit erhöht, Tumorzellen zu selektionieren. Eine Kombination der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV ermöglichte hierbei mittels RT-PCR eine Nachweissensitivität von zwei inokulierten MCF7- oder SKBR3-Zellen in 5 ml Blut. In Experimenten, bei denen die Wiederfindungsrate von inokulierten Tumorzellen im Blut getestet wurde, konnten mit einer Kombination der Antikörper 51,6 % der inokulierten SKBR3-Zellen nach Abtrennung von den Dynabeads[®]

fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Wiederfindungsraten beim Einsatz von jeweils nur einem Antikörper lagen deutlich niedriger. Hierbei konnte mit dem Antikörper Ber-EP4 die höchste Wiederfindungsrate (18,7 %) erzielt werden. Mit einer Kombination von drei monoklonalen Antikörpern konnten somit 32,9 % mehr Tumorzellen isoliert werden als mit dem Einzelantikörper Ber-EP4, was den Vorteil der verwendeten Antikörperkombination klar verdeutlicht.

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich zirkulierende Tumorzellen in Brustkrebspatienten in aktiven Phasen des Zellzyklus (G1- und S-Phase) befinden (Kubens *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde die Expression der in der vorliegenden Arbeit für die IMS von Brustkrebszellen verwendeten Zielantigene EpCAM (Ber-EP4) und MUC1 (GP1.4 und HMPV) in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus von Brustkrebszelllinien analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das EpCAM-, als auch das MUC1-Antigen in allen Phasen des Zellzyklus der verwendeten Brustkrebszelllinien exprimiert werden. Es kann somit gefolgert werden, dass die Selektion von zirkulierenden Tumorzellen in Brustkrebspatienten mit der verwendeten Kombination von Antikörpern unabhängig von der Zellzyklusphase erfolgt.

Die in der vorliegenden Arbeit für die IMS von Brustkrebszellen verwendeten Zielantigene EpCAM (Ber-EP4) und MUC1 (GP1.4 und HMPV) wurden bereits in vielen Studien für eine effektive Anreicherung von Tumorzellen verwendet. Eine Ber-EP4 basierte IMS konnte die Spezifität und Sensitivität eines CEA-mRNA-Nachweises mittels RT-PCR in zirkulierenden Kolonkarzinomzellen verbessern (Park *et al.*, 2001). In einem direkten Vergleich von vier Methoden zur Isolierung zirkulierender Tumorzellen zeigte eine Ber-EP4 basierte IMS die höchste Anreicherungseffizienz (Sabile *et al.*, 1999). Ein Antikörper gegen das MUC1-Antigen zeigte in einem methodischen Vergleich von ICC, Zytokeratin 19-RT-PCR und IMS-Zytokeratin 19-RT-PCR eine zehnfache Steigerung der Nachweissensitivität von Brustkrebszellen in Knochenmark mit IMS-Zytokeratin 19-RT-PCR im Vergleich zu ICC und Zytokeratin 19-RT-PCR (Zhong *et al.*, 2000). In einer Arbeit über die immunomagnetische Reinigung von Brustkrebszellen aus Kolonkrebszellen konnte mit einem Antikörper gegen MUC1 99,8 % der inokulierten T47D-Zellen aus COLO320-Zellen isoliert werden (Maas *et al.*, 1995).

Eine heterogene Proteinexpression der Antigene EpCAM und MUC1 konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass durch eine Kombination von Antikörpern eine Steigerung der Tumorzellausbeute in Brustkrebspatienten möglich ist. So sind, obwohl die Expression des EpCAM-Antigens in 90-95 % aller epithelialen Neoplasien zu erwarten ist, falsch-negative Tumorzellnachweise mit Ber-EP4 als selektionierendem Einzelantikörper beschrieben worden (Kielhorn *et al.*, 2002). In Inokulationsexperimenten konnte unter Verwendung eines Antikörpers gegen EpCAM und immunomagnetischer Selektion durch das „magnetic activated cell sorter“ (MACS)-System eine durchschnittliche Tumorzellwiederfindungsrate von 24,4 % erzielt werden (Kruger *et al.*, 2000). Dies ist mit der in der vorliegenden Arbeit mit Ber-EP4 als Einzelantikörper gefundenen Wiederfindungsrate von 18,7 % vergleichbar.

Antikörperkombinationen für die IMS wurden in einigen Arbeiten verwendet, brachten jedoch unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine Steigerung der Wiederfindungsrate. Dies steht im Widerspruch mit der in der vorliegenden Arbeit erzielten Steigerungsrate der Tumorzellselektion durch die Verwendung einer Kombination von Antikörpern. So wurden in einer Arbeit die Antikörper Ber-EP4, MOC-31 und 317G5 einzeln und in Kombination miteinander für die Isolierung von Zellen der Brustkrebszelllinie PM1 aus einer Population mononukleärer mesothelialer Zellen durch Dynabead[®]-IMS getestet. Hierbei konnte jedoch keine Erhöhung der Anzahl isolierter Tumorzellen durch Kombination der selektionierenden Antikörper erzielt werden (Naume *et al.*, 1997). Das Ergebnis ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass alle verwendeten Antikörper gegen das gleiche Antigen gerichtet sind und nicht wie in der vorliegenden Arbeit gegen verschiedene Antigene. Außerdem kann vermutet werden, dass die von Naume *et al.* verwendete Krebszelllinie eine homogene Expression des Antigens auf der Oberfläche zeigte, während in der vorliegenden Arbeit zwei etablierte Brustkrebszelllinien sowie eine Primärzelllinie verwendet wurden, welche sich in ihrer Antigenexpression unterscheiden. In einer anderen Arbeit wurden drei Antikörper, welche nach Immunisierung von Mäusen mit Antigenen der Brustkrebszelllinie T47D gewonnen wurden, für die IMS von T47D-Zellen aus PBMNC einzeln und in Kombination miteinander getestet. Auch hier konnte keine Erhöhung der Wiederfindungsrate von T47D-Zellen durch eine Kombination von Antikörpern erzielt werden (Berois *et al.*, 1997). Das Ergebnis wurde von den Autoren auf die gleichzeitige Expression der erkannten Epitope in T47D-Zellen zurückgeführt.

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse reflektieren die Schwierigkeit einer Beweisführung zum Nutzen einer Kombination von Antikörpern, wenn mit homogen exprimierenden Zelllinien gearbeitet wird und machen so auf die Möglichkeit der Verwendung von Antikörpern gegen verschiedene Antigene aufmerksam.

Eine Wiederfindungsrate von 51,6 %, wie sie in der vorliegenden Arbeit mit einer Kombination der Antikörper Ber-EP4, GP1.4 und HMPV unter Verwendung des Dynal-CELLlection-Systems demonstriert wurde, lag in anderen Arbeitsgruppen im Bereich von 50-60 %. So konnten nach immunomagnetischer Anreicherung mit einer Kombination nicht näher beschriebener Antikörper gegen Brustkrebszellen und Dynabeads eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 58,7 % inokulierter CAMA-1-Zellen in 10^8 mononukleären mesothelialen Zellen gefunden werden (Umiel *et al.*, 2000). Unter Verwendung des CELLlection-Systems konnten 60 % der inokulierten Kolonkarzinomzellen aus mononukleären mesothelialen Zellen isoliert werden (Werther *et al.*, 2000). In derselben Arbeit wurde ebenfalls beobachtet, dass Tumorzellen nach DNase-Behandlung und Abtrennung auch noch in der Dynabead®-Fraktion vorhanden waren. Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Daten nicht gezeigt). Es ist somit nicht auszuschließen, dass Tumorzellen durch unvollständigen Verdau des „DNA-Linkers“ nicht von den Dynabeads® abgetrennt und somit in der Analyse nicht erfasst worden sind. Hieraus kann geschlossen werden, dass der Anteil selektionierter Zellen prinzipiell höher ist, als der nach dem DNase-Schritt noch detektierbare Anteil von 51,6 %.

Dieses Problem kann jedoch durch einen nachfolgenden RT-PCR-Nachweis von Tumorzellen ausgeschlossen werden, da hier die Tumorzellen an den Dynabeads lysiert werden und somit keine Abtrennung durch DNase nötig ist. Für die Untersuchung des Patientenkollektivs wurde somit u. a. eine Methode gewählt, welche die höhere Nachweissensitivität gewährleistete.

Sensitiver *in vitro*-Nachweis zirkulierender Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR

Die Tumorzelldetektion durch Amplifikation eines molekularen Tumormarkertranskripts mittels RT-PCR geht von der Annahme aus, dass alle zirkulierenden Tumorzellen diesen Marker exprimieren. Disseminierte Brusttumorzellen zeigen jedoch sowohl

hinsichtlich ihrer Mutationshäufigkeit diverser Gene, als auch hinsichtlich ihres Expressionsprofils eine starke Heterogenität ((Bertucci *et al.*, 2003), (Klein *et al.*, 2002), (Braun *et al.*, 1999), (Kuukasjarvi *et al.*, 1997)). Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass nicht alle zirkulierenden Tumorzellen nur einen einzigen Zielmarker exprimieren. Ein Tumorzellnachweis mittels Einzelmarker-RT-PCR kann somit zu falsch-negativen Ergebnissen führen und geringe Tumorzell-detektionsraten erklären. Die Tatsache, dass der nur auf einem Tumormarker basierte Tumorzellnachweis zu geringen Detektionsraten führen kann, führte in der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung einer Multiplex-RT-PCR, um die Sensitivität des Tumorzellnachweises aufgrund der erwarteten heterogenen Tumormarkerexpression zu maximieren.

Die immunomagnetische Selektion mit einer Kombination von drei monoklonalen Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene und dem nachgeschalteten Multiplex-RT-PCR-Nachweis der vier Tumormarker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 wurde in der vorliegenden Arbeit mit den etablierten Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3 sowie der Primärzelllinie 1590 etabliert. Brustkrebszelllinien zeigen untereinander, sowie im Vergleich mit disseminierten Brustkrebszellen, eine beachtliche Heterogenität hinsichtlich des Expressionsniveaus von molekularen Tumormarkern. Daher sind mehrere Zelllinien bei der Etablierung eines Nachweissystems vorzuziehen (Raynor *et al.*, 2002). Die Nachweissensitivität und -spezifität wurde durch Inokulationsversuche von Tumorzellen unterschiedlicher Anzahl (2-1000) in 5 ml Blut gesunder Spender bestimmt. Hierbei konnte eine reproduzierbare Nachweissensitivität von zwei Tumorzellen in 5 ml Blut erreicht werden. Bei einer angenommenen Leukozytenzahl von 3×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml Blut entspricht dies einem Nachweis von einer Tumorzelle in $7,5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$ Leukozyten. Die etablierte Immunobead-Multiplex-RT-PCR stellt somit eine hochsensitive Methode dar, um disseminierte Brustkrebszellen im Blut nachzuweisen.

Den größten Einfluss auf die Effizienz des Tumorzellnachweissystems hat die Auswahl der molekularen Tumormarker, welche über ihr Expressionsniveau in disseminierten Brustkrebszellen bzw. Leukozyten die Sensitivität und Spezifität des Systems entscheidend beeinflussen. Alle ausgewählten molekularen Tumormarker zeigen eine nachgewiesene Überexpression in Brusttumorgewebe ((Bertucci *et al.*, 2003), (Bosma *et al.*, 2002), (Wasserman *et al.*, 1999)).

So wurde der Pan-Karzinommarker GA733.2 bereits in einigen Studien mit Erfolg als molekularer Marker für die Detektion von Tumorzellen epithelialer Gewebe eingesetzt. In einer Untersuchung von Tumorzellen aus pleuralen und peritonealen Waschungen konnten nach IMS GA733.2-Transkripte mit einer Sensitivität von einer Tumorzelle in 10^6 mesothelialen Zellen mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Sakaguchi *et al.*, 1999). In einer anderen Studie wurde GA733.2 für den Nachweis von Brustkrebszellen in peripherem Blut und Lymphknoten verwendet und konnte ebenfalls mit hoher Sensitivität detektiert werden (Bostick *et al.*, 1998). Die Expression von GA733.2 in Brustkrebszellen wurde bei Untersuchung von Primärtumoren in 100 % der untersuchten Fälle (n=44) nachgewiesen (Bosma *et al.*, 2002). Die Evaluation von GA733.2-mRNA als Marker für die Detektion von Brustkrebszellen in peripherem Blut und Knochenmark führte in einer weiteren Studie zu einem sensitiven Nachweis von einer Tumorzelle in 10^7 PBMNC mittels eines nested-PCR basierten Versuchsansatzes (Zhong *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem molekularen Tumormarker GA733.2 zwei Tumorzellen in 5 ml Blut nachgewiesen werden.

Ein anderer molekularer Marker, der in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen verwendet wurde, ist MUC1. Dies ist ein Marker, welcher in epithelialen Brustzellen exprimiert wird und in DNA-Array basierten Genexpressionanalysen eine Überexpression in primären Brusttumoren und Metastasen zeigte (Bertucci *et al.*, 2003). Eine hohe Nachweissensitivität von einer Brusttumorzelle in 5 ml Blut wurde in einer Studie nach IMS und quantitativer PCR-Analyse erreicht (de Cremoux *et al.*, 2000). Als molekularer Marker für die Brustkrebszelldetektion in Lymphknoten wurde MUC1 erfolgreich in 15 von 50 Lymphknoten nachgewiesen und erzielte damit eine höhere Nachweissensitivität als der parallel durchgeführte Immunhistochemie (IHC)-Nachweis (Noguchi *et al.*, 1994). In einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte mit einem RT-PCR basierten MUC1-Nachweis einer Tumorzelle in 10^5 Lymphknotenzellen detektiert werden (Noguchi *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem molekularen Tumormarker MUC1 zwei Tumorzellen in 5 ml Blut nachgewiesen werden.

Das c-erbB2-Gen kodiert das Protein p185^{Her2-neu}, welches als Wachstumsrezeptor auf der Zelloberfläche von ca. 30 % aller Brustprimärtumore verstärkt exprimiert wird und die Proliferation des Tumors positiv beeinflusst. Eine Überexpression des Gens korreliert hierbei mit der Bildung des immunhistochemisch nachweisbaren Proteins

(Leone *et al.*, 2001). Eine verstärkte Proteinexpression des Wachstumsrezeptors wurde in mehreren Untersuchungen als ungünstiger Prognosefaktor hinsichtlich der Überlebensrate von Brustkrebspatienten erkannt (Wasserman *et al.*, 1999). Als molekularer Tumormarker konnte c-erbB2-mRNA in einem seminested-RT-PCR-Assay in zwölf von zwölf (100 %) Brusttumoren nachgewiesen werden, während in 33 Blutproben gesunder Spender keine c-erbB2-mRNA nachgewiesen wurde (Wasserman *et al.*, 1999). In einer anderen Untersuchung wurde c-erbB2-mRNA in einem quantitativen Echtzeit-RT-PCR-Assay in 13 von 13 (100 %) primären Brusttumoren und in fünf etablierten Brustkrebszelllinien nachgewiesen (Leone *et al.*, 2001). Die Verwendung des c-erbB2-Transkriptes als molekularen Tumormarker ermöglichte in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Detektion von zwei Brustkrebszellen in 5 ml Blut. Der vierte molekulare Tumormarker, der in dieser Arbeit für eine Multiplex-RT-PCR eingesetzt wurde, ist CLAUDIN7. Er ist ein mit der Gruppe der „tight junctions“-Proteine assoziiertes Protein, welches, genauso wie MUC1, in DNA-Array basierten Genexpressionsanalysen eine Überexpression in primären Brusttumoren und Metastasen zeigte (Bertucci *et al.*, 2003). Eine Verwendung von CLAUDIN7 als molekularer Tumormarker in einem RT-PCR basierten Tumorzellnachweisassay konnte trotz intensiver Literatursuche nicht gefunden werden und stellt somit eine Neuerung dar. Mit dem molekularen Tumormarker CLAUDIN7 konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Tumorzellen in 5 ml Blut nachgewiesen werden.

Nachweis disseminierter Tumorzellen in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen mittels Multiplex-RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden zirkulierende Tumorzellen in peripherem Blut von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs mittels Multiplex-RT-PCR analysiert. Die Multiplex-RT-PCR bestand aus der Amplifikation der vier Tumormarkertranskripte GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7. Hierbei konnten in 15 von 21 Patientinnen (71,4 %) Tumorzellen durch Amplifikation von mindestens einem molekularen Tumormarker mittels Multiplex-RT-PCR nachgewiesen werden.

Die Heterogenität des Expressionsprofils der verwendeten Tumormarker GA733.2, MUC1, HER2 und CLAUDIN7 konnte in der vorliegenden Arbeit deutlich demonstriert werden. So konnte das GA733.2-Fragment bei sieben von 21 Patientinnen (33,3 %), das MUC1-Fragment bei neun von 21 Patientinnen (42,9 %), das HER2-Fragment

bei vier von 21 Patientinnen (19,1 %) und das CLAUDIN7-Fragment bei zwölf von 21 Patientinnen (57,1 %) amplifiziert werden. Bei insgesamt drei von 15 der tumormarkerpositiven Patientinnen (20 %) konnten alle vier Tumormarker detektiert werden, bei einer von 15 Patientinnen (6,7 %) konnten drei Tumormarker detektiert werden, bei sechs von 15 Patientinnen (40 %) wurden zwei und bei fünf von 15 Patientinnen (33,3 %) wurde nur ein Tumormarker detektiert. Die Sensitivität des Tumorzellnachweises konnte in der vorliegenden Arbeit von 57,1 % durch die Verwendung eines Markers auf 71,4 % durch die Verwendung des Multiplex-Ansatzes erhöht werden.

Selbst innerhalb der Metastasenpopulation einer untersuchten Brustkrebspatientin konnte ein heterogenes Expressionsprofil festgestellt werden: Während in der Primärzelllinie 1590, welche von einer ossären Mikrometastase der Patientin 9 abstammt, alle vier getesteten Tumormarker nachgewiesen wurden, konnten im peripheren Blut derselben Patientin nur Tumorzellen nachgewiesen werden, welche den Tumormarker CLAUDIN7 exprimierten.

Die gefundenen Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen. In einer Arbeit über die Detektion zirkulierender Brusttumorzellen konnten in 33 von 103 Patienten (32 %) mit metastasiertem Brustkrebs Tumorzellen in peripherem Blut mittels quantitativer Echtzeit-PCR der Marker p1B, pS2, CK19 und EGP2 nachgewiesen werden. Eine heterogene Expression der verwendeten Marker konnte hierbei in Brustkrebspatienten festgestellt werden (Bosma *et al.*, 2002). In einer anderen Untersuchung wurde peripheres Blut von Brustkrebspatienten mittels eines RT-PCR basierten multimolekularen Assays mit den Tumormarkern β -HCG, c-Met, β -1-4-N-acetylgalactosaminyl-Transferase und MAGE-3A analysiert. Von 65 untersuchten Blutproben zeigten 2 % eine Expression von vier, 3 % eine Expression von drei, 15 % eine Expression von zwei, 49 % eine Expression von einem und 31 % keine Expression der verwendeten molekularen Marker. Durch die Verwendung verschiedener Marker konnte die Tumorzellnachweissensitivität in dieser Untersuchung um 32 % gesteigert werden (Taback *et al.*, 2001). Auch zeigte ein RT-PCR basierter Multimarkerassay zur Detektion von Brustkrebszellen in Lymphknoten in 27 von 27 (100 %) Brustkrebsprimärtumoren und in 50 von 50 (100 %) pathologisch-positiven Lymphknoten eine Expression von mindestens einem der verwendeten Tumormarker Mammaglobin, GABA _{π} , B305D und B726P. Mammaglobin allein konnte dagegen nur

bei 17 von 27 (63 %) der untersuchten Primärtumore nachgewiesen werden (Zehentner *et al.*, 2002).

Andere Arbeitsgruppen konnten Detektionsraten von 48 % in Kolonkarzinom und 45 % in Lungenadenokarzinom für disseminierte Tumorzellen im Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium erzielen ((Wyld *et al.*, 1998) (Peck *et al.*, 1998)).

In der vorliegenden Arbeit konnten bei sechs von 21 untersuchten Patientinnen (28,6 %) keine Tumorzellen nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine Tumorzellen in der Blutbahn an der Abnahmestelle zirkulierten, d. h. über die Existenz von zirkulierenden Tumorzellen im gesamten Blutkreislauf kann keine Aussage gemacht werden (Ghossein *et al.*, 2000). Das Ausschütten von Tumorzellen des Primärtumors in die Blutbahn ist unregelmäßig (Ghossein *et al.*, 1999). So können Tumorzellen im Blut zum Zeitpunkt der Probenentnahme trotz progredientem Krankheitsverlauf und klinisch nachgewiesenen Metastasen fehlen.

Nachweis disseminierter Tumorzellen in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen mittels Immunzytochemie

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorzellen in einem separaten Ansatz aus peripherem Blut der 21 Brustkrebspatientinnen isoliert und als Einzelzellen dargestellt. Hierzu wurden durch Dynabeads[®] isolierte Tumorzellen mittels Zytospinpräparation auf Objektträger gebracht, mit einem Antikörper gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 immunzytochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Hierbei konnten in sechs von 21 Patientinnen (28,6 %) Tumorzellen isoliert und dargestellt werden. Es konnte eine Korrelation zum Multiplex-RT-PCR basierten Tumorzellnachweis hergestellt werden, da nur bei jenen Patientinnen Tumorzellen dargestellt werden konnten, bei denen auch Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR nachgewiesen wurden.

Das gefundene Ergebnis steht im Widerspruch zu einer anderen Untersuchung, in der ein Vergleich zwischen dem Tumorzellnachweis mittels Zytokeratin 19-Immunzytochemie und einem RT-PCR-Nachweis verschiedener Marker (p1B, pS2, CK19 und EGP2) in peripherem Blut von 38 Brustkrebspatientinnen mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium gezogen wurde. Hier konnten bei zwei von 38 Patientinnen (5 %) morphologisch Tumorzellen dargestellt werden, während mindestens einer der

verwendeten Tumormarker bei 16 der 38 Patientinnen (42 %) amplifiziert werden konnten. Zytokeratin 19-mRNA (CK19) konnte hierbei in neun der 16 tumormarkerpositiven Patientinnen (56 %) nachgewiesen werden (Bosma *et al.*, 2002). Die Autoren konnten keine Übereinstimmung der beiden Techniken finden und folgerten, dass der RNA basierte Assay eine höhere Nachweissensitivität für zirkulierende Tumorzellen ermöglicht. Von einer höheren Tumorzellnachweissensitivität mittels RT-PCR gegenüber Immunhistochemie (IHC) oder Immunzytochemie (ICC) basierten Techniken wurden ebenfalls in einer Reihe anderer Arbeiten berichtet ((Lopez-Guerrero *et al.*, 1999), (Schoenfeld *et al.*, 1997)). Detektionsraten zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut von Brustkrebspatienten in einem frühen Krankheitsstadium liegen zwischen 0 und 27 % mit einem RT-PCR basiertem Nachweis ((Schoenfeld *et al.*, 1997), (Datta *et al.*, 1994)) und zwischen 0 und 5 % mit einem ICC-Nachweis ((Aihara *et al.*, 1997), (Schoenfeld *et al.*, 1997)).

Die dargestellten Ergebnisse anderer Arbeiten lassen den Schluss zu, dass RT-PCR basierte Tumorzellnachweistechiken eine höhere Nachweissensitivität ermöglichen als ICC basierte, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Tumorzellnachweisrate von 28,6 % konnte in einer weiteren Arbeit über die Detektion zirkulierender Tumorzellen in peripherem Blut von Patienten mit metastasiertem Brustkrebs mittels IMS und ICC unter Verwendung des gleichen experimentellen Ansatzes nahezu mit gleicher Rate bestätigt werden. Hier wurden zirkulierende Tumorzellen bei acht von 29 Patientinnen (27,6 %) nachgewiesen (Kim *et al.*, 2001).

Konzentrationsbestimmung der Serummarker CA15.3 und CEA in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration der Tumormarker CA15.3 und CEA im Serum von 21 Brustkrebspatientinnen mittels ELISA bestimmt. CA15.3 und CEA werden in der klinischen Diagnostik der Brustkrebserkrankung eingesetzt. Insgesamt wurde in 18 von 21 Patientinnen (85,7 %) eine erhöhte CA15.3- oder CEA-Konzentration festgestellt. Da die Menge eines sezernierten Tumormarkers im Serum eine direkte Korrelation mit der Tumormasse erlaubt, ist bei Patienten mit erhöhten Konzentrationen von Tumormarkern im Serum eine größere Tumormasse anzunehmen, als in Patienten mit gering oder mäßig erhöhten Serumkonzentrationen

(Lamerz, 1994). Starke Differenzen zwischen der Erhöhung der Tumormarker CA15.3 und CEA fanden sich bei den Brustkrebspatientinnen 5, 11, 14, 17 und 20, wo der CA15.3-Wert stark erhöht und der CEA-Wert nicht, bzw. nur gering erhöht war. Der umgekehrte Fall trat bei Patientin 9 auf, bei der ein stark erhöhter CEA-Wert neben einem CA15.3-Wert detektiert wurde, der nur wenig über dem Schwellenwert lag. Die beschriebenen Differenzen hinsichtlich der sezernierten Tumormarker CA15.3 und CEA zeigen die erwartete Heterogenität von Brusttumoren bzw. Metastasen in verschiedenen Patienten und machen den Nutzen mehrerer Tumormarker für die klinische Diagnostik von Brustkrebs deutlich.

In der vorliegenden Arbeit konnten zirkulierende Tumorzellen hauptsächlich bei jenen Patientinnen detektiert werden, welche auch eine Erhöhung eines der untersuchten Serummarker zeigten. Da die Menge eines Tumormarkers im Serum aber mit der Tumormasse im allgemeinen korreliert ist (Lamerz, 1994), erlaubt sie somit keinen direkten Rückschluss auf das Vorhandensein von lebenden zirkulierenden Tumorzellen in peripherem Blut. Ein positiver Tumorzellnachweis, gekoppelt mit einer erhöhten Serummarkerkonzentration muss aus diesem Grund noch keine gemeinsame Ursache haben und kann folglich voneinander abweichen. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass ein stark fortgeschrittenes Krankheitsstadium, d. h. eine progrediente Tumorzellzunahme im Primärtumor oder in Metastasen, ein Auftreten von zirkulierenden Tumorzellen im Blut wahrscheinlich macht.

Bei Patientin 3 konnten trotz einer nicht erhöhten Serummarkerkonzentration Tumorzellen nachgewiesen werden. Dies besagt, dass die verwendete Multiplex-RT-PCR-Methode eher als die Serummarkerwerte auf eine Progredienz des Krankheitszustandes hinweisen konnten, was die Effektivität der etablierten Nachweismethode unterstreicht.

Einfluss von Chemotherapeutika auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen mittels Multiplex-RT-PCR in peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Brustkrebspatientinnen wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit Chemotherapeutika behandelt, welche im 2- bis 4-Wochen-Rhythmus appliziert wurden. Die Blutentnahme zum Nachweis disseminierter Tumorzellen erfolgte hierbei unmittelbar vor Applikation des jeweils nächsten Zyklus.

lus. Die Behandlungsschemata variierten hinsichtlich der eingesetzten Chemotherapeutika.

Bei einer Gegenüberstellung der Tumorzelldetektion und den jeweils applizierten Chemotherapeutika fällt auf, dass bei Patientin 1 und 2, welche beide mit der Wirkstoffkombination Mitomycin/Folinat/5`-Fluorouracil behandelt wurden, keine Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. In diesen Fällen scheint die Therapie mit den angegebenen Chemotherapeutika hinsichtlich einer Zerstörung von Tumorzellen im Blut erfolgreich gewesen zu sein. Bestätigt wird dieser Befund durch eine Untersuchung über die Wirkung von Chemotherapeutika, bei der eine starke Abnahme zirkulierender epithelialer Zellen mit der Effektivität der Chemotherapie in Verbindung gebracht werden konnte (Terstappen *et al.*, 2000). Dies könnte ein Grund für den fehlenden Tumorzellnachweis in den Patientinnen 1 und 2 sein. Eine zusätzliche Erklärung bietet der Wirkmechanismus von Mitomycin, das als alkylierendes Agens DNA-Stränge untereinander vernetzt und auf diese Weise auch die Genexpression unterbindet. Eine Unterdrückung der Genexpression ist ebenfalls für den Wirkstoff Epirubicin bekannt. Bei Patientin 4, welche mit Epirubicin behandelt wurde, konnten ebenfalls keine Tumorzellen nachgewiesen werden, was diese Beobachtung unterstreicht. Da die Genexpression einen essentiellen Faktor für das Überleben von Zellen darstellt, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass selbst eventuell nicht detektierte Tumorzellen sich nicht zu klinisch manifesten Metastasen entwickeln werden. Die Chemotherapeutika Vinorelbin, Docetaxel, Trastuzumab, etc. besitzen einen Wirkmechanismus, welcher eine direkte Beeinflussung der Genexpression sehr unwahrscheinlich macht. Einzig das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin besitzt einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Epirubicin, da es in DNA-Stränge interkaliert. Ein Einfluss des Medikamentes auf den Tumorzellnachweis konnte jedoch bei den untersuchten Brustkrebspatientinnen nicht festgestellt werden. So wurden bei den mit Doxorubicin behandelten Patientinnen 3 und 16 Tumorzellen eindeutig nachgewiesen.

Ausblick

Mit der in der vorliegenden Arbeit etablierten Nachweisteknik wurde ein System für die hochsensitive Detektion zirkulierender Tumorzellen in Brustkrebspatienten geschaffen. Die Hauptfrage, ob und in welcher Weise der etablierte Multiplex-RT-PCR-gestützte Nachweisassay mit den vier molekularen Tumormarkern GA733.2, MUC1,

HER2 und CLAUDIN7 einen verlässlichen Voraussagewert für die Metastasenbildung darstellt, sollte durch weitreichende Analysen großer Patientengruppen geklärt werden. Hierbei könnte die Sensitivität und der prognostische Wert des Systems durch Maßnahmen, wie mehrmalige Blutentnahme bei einem Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten verbessert werden (Campana et Pui, 1995).

Die Tumorzelldetektion mittels der entwickelten Multiplex-RT-PCR könnte für die Behandlung von Brustkrebspatienten von großem Nutzen sein und vielfältige Einsatzmöglichkeiten haben. Einerseits könnten Patienten für eine effektive systemische Krebstherapie in einem früheren Stadium der Erkrankung mit noch wenigen Metastasen im Blut ausgewählt werden (Johnson *et al.*, 1995). Andererseits könnte diese Technik die präoperative Stadieneinteilung ergänzen und somit helfen, unnötige radikale Therapiemaßnahmen zu vermeiden. Weiterhin könnte die Tumorzelldetektion mittels Multiplex-RT-PCR als Effektivitätsparameter in der Verlaufskontrolle einer Therapie eine wichtige Rolle spielen. Eine andere Einsatzmöglichkeit liegt in der Nachsorge der Krebserkrankungen, welche durch die Möglichkeit einer in regelmäßigen Abständen durchführbaren Tumorzelldetektion im Blut mutmaßlich geheilter Patienten eine notwendige Bereicherung erfahren und bei einem positiven Befund sofort geeignete Maßnahmen nach sich ziehen könnte. Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium haben eine größere „Tumorfracht“ als Patienten in frühem Stadium. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit als höher anzusehen, Tumorzellen zu einem gegebenen Zeitpunkt im Blut zu detektieren, was ein effektives „Monitoring“ des Therapieerfolges ermöglicht (Smith *et al.*, 2000). Es kann spekuliert werden, dass die in dieser Arbeit etablierte Nachweisteknik einen großen Einfluss auf die Prognose und Behandlung von Brustkrebspatienten haben wird.

6. Literaturverzeichnis

Aihara, T., Noguchi, S., Ishikawa, O., Furukawa, H., Hiratsuka, M., Ohigashi, H., Nakamori, S., Monden, M., and Imaoka, S. (1997). "Detection of pancreatic and gastric cancer cells in peripheral and portal blood by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction", *Int J Cancer* 72, 408-11.

Berois, N., Varangot, M., Osinaga, E., Babino, A., Caignault, L., Muse, I., and Roseto, A. (1997). "Detection of rare human breast cancer cells. Comparison of an immunomagnetic separation method with immunocytochemistry and RT-PCR", *Anti-cancer Res* 17, 2639-46.

Bertucci, F., Viens, P., Hingamp, P., Nasser, V., Houlgatte, R., and Birnbaum, D. (2003). "Breast cancer revisited using DNA array-based gene expression profiling", *Int J Cancer* 103, 565-71.

Bockmann, B., Grill, H. J., and Giesing, M. (2001). "Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors", *Biomol Eng* 17, 95-111.

Bosma, A. J., Weigelt, B., Lambrechts, A. C., Verhagen, O. J., Pruntel, R., Hart, A. A., Rodenhuis, S., and van 't Veer, L. J. (2002). "Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes", *Clin Cancer Res* 8, 1871-7.

Bossolasco, P., Ricci, C., Farina, G., Soligo, D., Pedretti, D., Scanni, A., and Deliliers, G. L. (2002). "Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene", *Cancer Detect Prev* 26, 60-3.

Bostick, P. J., Huynh, K. T., Sarantou, T., Turner, R. R., Qi, K., Giuliano, A. E., and Hoon, D. S. (1998). "Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR", *Int J Cancer* 79, 645-51.

Brandt, B., Schmitt, H., Feldner, J. C., Lelle, R. J., Semjonow, A., and Beckmann, A. (2000). "Blood-borne cancer cells--quo vadis?" *Int J Biol Markers* 15, 111-3.

Brandt, B. H., Schmidt, H., de Angelis, G., and Zanker, K. S. (2001). "Predictive laboratory diagnostics in oncology utilizing blood-borne cancer cells--current best practice and unmet needs", *Cancer Lett* 162 *Suppl*, S11-S16.

Braun, S., Hepp, F., Sommer, H. L., and Pantel, K. (1999). "Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease", *Int J Cancer* 84, 1-5.

Burchill, S. A., and Selby, P. J. (2000). "Molecular detection of low-level disease in patients with cancer", *J Pathol* 190, 6-14.

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays", *J Mol Endocrinol* 25, 169-93.

Campana, D., and Pui, C. H. (1995). "Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance", *Blood* 85, 1416-34.

Chelly, J., Concordet, J. P., Kaplan, J. C., and Kahn, A. (1989) "Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8 (86) , 2617-21.

Cunnick, G. H., Jiang, W. G., Gomez, K. F., and Mansel, R. E. (2002). "Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis", *Histol Histopathol* 17, 863-70.

Curry, B. J., Myers, K., and Hersey, P. (1999). "MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases", *J Clin Oncol* 17, 2562-71.

Datta, Y. H., Adams, P. T., Drobyski, W. R., Ethier, S. P., Terry, V. H., and Roth, M. S. (1994). "Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse- transcriptase polymerase chain reaction", *J Clin Oncol* 12, 475-82.

Davis, E. G., Chao, C., and McMasters, K. M. (2002). "Polymerase chain reaction in the staging of solid tumors", *Cancer J* 8, 135-43.

de Cremoux, P., Extra, J. M., Denis, M. G., Pierga, J. Y., Bourstyn, E., Nos, C., Clough, K. B., Boudou, E., Martin, E. C., Muller, A., *et al.* (2000). "Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction", *Clin Cancer Res* 6, 3117-22.

Duffy, M. J. (1995). "Can molecular markers now be used for early diagnosis of malignancy?" *Clin Chem* 41, 1410-3.

Duffy, M. J., Shering, S., Sherry, F., McDermott, E., and O'Higgins, N. (2000). "CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer", *Int J Biol Markers* 15, 330-3.

Engaras, B., Kewenter, J., Wedel, H., and Hafstrom, L. (1998). "Effects of surgery on serum levels of CEA, CA 50 and CA 242 in individuals without malignant disease followed for twelve month", *J Tumor Marker Oncol* 13, 53-59.

Friess, H., Kleeff, J., Gumbs, A., and Buchler, M. W. (1997). "Molecular versus conventional markers in pancreatic cancer", *Digestion* 58, 557-63.

Ghossein, R. A., Bhattacharya, S., and Coit, D. G. (2001). "Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of melanoma-related transcripts in the peripheral blood and bone marrow of patients with malignant melanoma. What have we learned?" *Recent Results Cancer Res* 158, 63-77.

Ghossein, R. A., Bhattacharya, S., and Rosai, J. (1999). "Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors", *Clin Cancer Res* 5, 1950-60.

Ghossein, R. A., Carusone, L., and Bhattacharya, S. (2000). "Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in melanoma prostatic and breast carcinomas", *In Vivo* 14, 237-50.

Glaves, D., Huben, R. P., and Weiss, L. (1988). "Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas", *Br J Cancer* 57, 32-5.

Hadden, J. W. (1999). "The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update", *Int J Immunopharmacol* 21, 79-101.

Hawes, D., Neville, A. M., and Cote, R. J. (2001). "Detection of occult metastasis in patients with breast cancer", *Semin Surg Oncol* 20, 312-8.

Hill, R. P. (2001). *The Biology of Cancer*. In *Clinical Oncology: A Multidisciplinary Approach For Physicians And Students*, P. Rubin, ed. (Philadelphia, W.B. Saunders Company), pp. 32-45.

Hu, X. C., and Chow, L. W. (2000). "Detection of circulating breast cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)", *Eur J Surg Oncol* 26, 530-5.

Jiang, W. G., Martin, T. A., and Mansel, R. E. (2002). "Molecular detection of micro-metastasis in breast cancer", *Crit Rev Oncol Hematol* 43, 13-31.

Johnson, P. W., Burchill, S. A., and Selby, P. J. (1995). "The molecular detection of circulating tumour cells", *Br J Cancer* 72, 268-76.

Kallioniemi, O. P., Holli, K., Visakorpi, T., Koivula, T., Helin, H. H., and Isola, J. J. (1991). "Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer", *Int J Cancer* 49, 650-5.

Kantor, A. B., Gibbons, I., Miltenyi, S., and Schmitz, J. (1998). "Magnetic Cell Sorting with Colloidal Superparamagnetic Particles", *Cell Separation Methods and Applications*, 153-173.

Khonji, N., Clarke, D., and Mansel, R. E. (2000). "Breast cancer metastasis, Kluwer Academic Publishers).

Kielhorn, E., Schofield, K., and Rimm, D. L. (2002). "Use of magnetic enrichment for detection of carcinoma cells in fluid specimens", *Cancer* 94, 205-11.

Kim, S. J., Ikeda, N., Shiba, E., Takamura, Y., and Noguchi, S. (2001). "Detection of breast cancer micrometastases in peripheral blood using immunomagnetic separation and immunocytochemistry", *Breast Cancer* 8, 63-9.

Klaasen, U., and Seeber, S. (1998). Mammakarzinom. In *Therapiekonzepte Onkologie*, S. Seeber, and J. Schütte, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 1068-1104.

Klein, C. A. (2000). "The biology and analysis of single disseminated tumour cells", *Trends Cell Biol* 10, 489-93.

Klein, C. A., Blankenstein, T. J., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., and Riethmuller, G. (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer", *Lancet* 360, 683-9.

Komeda, T., Fukuda, Y., Sando, T., Kita, R., Furukawa, M., Nishida, N., Amenomori, M., and Nakao, K. (1995). "Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood", *Cancer* 75, 2214-9.

Kostler, W. J., Brodowicz, T., Hejna, M., Wiltschke, C., and Zielinski, C. C. (2000). "Detection of minimal residual disease in patients with cancer: a review of techniques, clinical implications, and emerging therapeutic consequences", *Cancer Detect Prev* 24, 376-403.

Krag, D. N., Ashikaga, T., Moss, T. J., Kusminsky, R. E., Feldman, S., Carp, N. Z., Moffat, F. L., Beitsch, P. D., Frazier, T. G., Gaskin, T. A., *et al.* (1999). "Breast Cancer Cells in the Blood: A Pilot Study", *Breast J* 5, 354-358.

Kruger, W., Datta, C., Badbaran, A., Togel, F., Gutensohn, K., Carrero, I., Kroger, N., Janicke, F., and Zander, A. R. (2000). "Immunomagnetic tumor cell selection--implications for the detection of disseminated cancer cells", *Transfusion* 40, 1489-93.

Kubens, B. S., Feldner, J. C., Brandt, B., and Zanker, K. S. (2002). "Migrating and circulating breast carcinoma cells are within active phases of the cell cycle", *Anticancer Res* 22, 899-903.

Kuukasjarvi, T., Karhu, R., Tanner, M., Kahkonen, M., Schaffer, A., Nupponen, N., Pennanen, S., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., and Isola, J. (1997). "Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer", *Cancer Res* 57, 1597-604.

Kvalheim, G., Naume, B., and Nesland, J. M. (1999). "Minimal residual disease in breast cancer", *Cancer Metastasis Rev* 18, 101-8.

Lacey, J. V., Jr., Devesa, S. S., and Brinton, L. A. (2002). "Recent trends in breast cancer incidence and mortality", *Environ Mol Mutagen* 39, 82-8.

Lamerz, R. (1994). Tumormarker. In *Internistische Onkologie*, W. Wilmanns, D. Huhn, and K. Wilms, eds., pp. 107-113.

Lamerz, R. (1999). "Role of tumour markers, cytogenetics", *Ann Oncol* 10, 145-9.

Leone, F., Perissinotto, E., Viale, A., Cavalloni, G., Taraglio, S., Capaldi, A., Piacibello, W., Torchio, B., and Aglietta, M. (2001). "Detection of breast cancer cell contamination in leukapheresis product by real-time quantitative polymerase chain reaction", *Bone Marrow Transplant* 27, 517-23.

Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1994). "Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule", *J Cell Biol* 125, 437-46.

Lopez-Guerrero, J. A., Gilabert, P. B., Gonzalez, E. B., Sanz Alonso, M. A., Perez, J. P., Talens, A. S., Oraval, E. A., de la Rubia Comos, J., and Boix, S. B. (1999). "Use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for carcinoembryonic antigen, cytokeratin 19, and maspin in the detection of tumor cells in leukapheresis

products from patients with breast cancer: comparison with immunocytochemistry", *J Hematother* 8, 53-61.

Maas, R. A., Bruning, P. F., Breedijk, A. J., Top, B., and Peterse, H. L. (1995). "Immunomagnetic purification of human breast carcinoma cells allows tumor-specific detection of multidrug resistance gene 1-mRNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction in fine-needle aspirates", *Lab Invest* 72, 760-4.

Masood, S., and Bui, M. M. (2002). "Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer", *Microsc Res Tech* 59, 102-8.

Molina, R., Jo, J., Filella, X., Zanon, G., Farrus, B., Munoz, M., Latre, M. L., Pahisa, J., Velasco, M., Fernandez, P., *et al.* (1999). "C-erbB-2, CEA and CA 15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence of breast cancer patients", *Anticancer Res* 19, 2551-5.

Molland, J. G., Barraclough, B. H., Gebiski, V., Milliken, J., and Bilous, M. (1996). "Prognostic significance of c-erbB-2 oncogene in axillary node-negative breast cancer", *Aust N Z J Surg* 66, 64-70.

Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Moller, P. (1987). "Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues", *Cancer Res* 47, 2883-91.

Mori, M., Mimori, K., Ueo, H., Tsuji, K., Shiraishi, T., Barnard, G. F., Sugimachi, K., and Akiyoshi, T. (1998). "Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas", *J Clin Oncol* 16, 128-32.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-73.

Naume, B., Borgen, E., Beiske, K., Herstad, T. K., Ravnas, G., Renolen, A., Trachsel, S., Thrane-Steen, K., Funderud, S., and Kvalheim, G. (1997). "Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood", *J Hematother* 6, 103-14.

Neville, M. C., Blackmann, B., Foo, J., and Sawicki, V. (2002). Expression of Claudin 7 in the mouse mammary epithelium (University of Colorado Health Sciences Center), pp. P2-18.

Noguchi, S., Aihara, T., Motomura, K., Inaji, H., Imaoka, S., and Koyama, H. (1996). "Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification", *Am J Pathol* 148, 649-56.

Noguchi, S., Aihara, T., Nakamori, S., Motomura, K., Inaji, H., Imaoka, S., and Koyama, H. (1994). "The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction", *Cancer* 74, 1595-600.

Olsson, C. A., de Vries, G. M., Raffo, A. J., Benson, M. C., O'Toole, K., Cao, Y., Buttyan, R. E., and Katz, A. E. (1996). "Preoperative reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen predicts treatment failure following radical prostatectomy", *J Urol* 155, 1557-62.

Pantel, K., and Otte, M. (2001). "Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells", *Semin Cancer Biol* 11, 327-37.

Pantel, K., von Knebel Doeberitz, M., Izbicki, J. R., and Riethmuller, G. (1997). "[Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies]", *Chirurg* 68, 1241-50.

Park, S., Lee, B., Kim, I., Choi, I., Hong, K., Ryu, Y., Rhim, J., Shin, J., Park, S. C., Chung, H., and Chung, J. (2001). "Immunobead RT-PCR versus regular RT-PCR

amplification of CEA mRNA in peripheral blood", *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 489-94.

Peck, K., Sher, Y. P., Shih, J. Y., Roffler, S. R., Wu, C. W., and Yang, P. C. (1998). "Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients", *Cancer Res* 58, 2761-5.

Press, M. F., Pike, M. C., Chazin, V. R., Hung, G., Udove, J. A., Markowicz, M., Danyluk, J., Godolphin, W., Sliwkowski, M., Akita, R., and et al. (1993). "Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease", *Cancer Res* 53, 4960-70.

Rappolee, D. A., Wang, A., Mark, D., and Werb, Z. (1989). "Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells", *J Cell Biochem* 39, 1-11.

Raynor, M., Stephenson, S. A., Walsh, D. C., Pittman, K. B., and Dobrovic, A. (2002). "Optimisation of the RT-PCR detection of immunomagnetically enriched carcinoma cells", *BMC Cancer* 2, 14.

Reyes, J. L., Lamas, M., Martin, D., del Carmen Namorado, M., Islas, S., Luna, J., Tauc, M., and Gonzalez-Mariscal, L. (2002). "The renal segmental distribution of claudins changes with development", *Kidney Int* 62, 476-87.

Ruibal, A., and de La Piedra, C. (2002). "[Secreted tumor markers and breast cancer]", *Rev Esp Med Nucl* 21, 65-76.

Sabile, A., Louha, M., Bonte, E., Poussin, K., Vona, G., Mejean, A., Chretien, Y., Bougas, L., Lacour, B., Capron, F., *et al.* (1999). "Efficiency of Ber-EP4 antibody for isolating circulating epithelial tumor cells before RT-PCR detection", *Am J Clin Pathol* 112, 171-8.

Sakaguchi, M., Virmani, A. K., Ashfaq, R., Rogers, T. E., Rathi, A., Liu, Y., Kodagoda, D., Cunningham, H. T., and Gazdar, A. F. (1999). "Development of a sensitive,

specific reverse transcriptase polymerase chain reaction-based assay for epithelial tumour cells in effusions", *Br J Cancer* 79, 416-22.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

Schoenfeld, A., Kruger, K. H., Gomm, J., Sinnett, H. D., Gazet, J. C., Sacks, N., Bender, H. G., Luqmani, Y., and Coombes, R. C. (1997). "The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19", *Eur J Cancer* 33, 854-61.

Seregini, E., Botti, C., Massaron, S., Lombardo, C., Capobianco, A., Bogni, A., and Bombardieri, E. (1997). "Structure, function and gene expression of epithelial mucins", *Tumori* 83, 625-32.

Shering, S. G., Sherry, F., McDermott, E. W., O'Higgins, N. J., and Duffy, M. J. (1998). "Preoperative CA 15-3 concentrations predict outcome of patients with breast carcinoma", *Cancer* 83, 2521-7.

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene", *Science* 235, 177-82.

Smith, B. M., Slade, M. J., English, J., Graham, H., Luchtenborg, M., Sinnett, H. D., Cross, N. C., and Coombes, R. C. (2000). "Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques", *J Clin Oncol* 18, 1432-9.

Smith, T. J., Davidson, N. E., Schapira, D. V., Grunfeld, E., Muss, H. B., Vogel, V. G., 3rd, and Somerfield, M. R. (1999). "American Society of Clinical Oncology 1998 update of recommended breast cancer surveillance guidelines", *J Clin Oncol* 17, 1080-2.

Taback, B., Chan, A. D., Kuo, C. T., Bostick, P. J., Wang, H. J., Giuliano, A. E., and Hoon, D. S. (2001). "Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical stage of disease", *Cancer Res* 61, 8845-50.

Terstappen, L. W., Rao, C., Gross, S., and Weiss, A. J. (2000). "Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast", *Int J Oncol* 17, 573-8.

Trebak, M., Begg, G. E., Chong, J. M., Kanazireva, E. V., Herlyn, D., and Speicher, D. W. (2001). "Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion", *J Biol Chem* 276, 2299-309.

Tsongalis, G. J., and Ried, A., Jr. (2001). "HER2: the neu prognostic marker for breast cancer", *Crit Rev Clin Lab Sci* 38, 167-82.

Umiel, T., Prilutskaya, M., Nguyen, N. H., Moss, T. J., Schaeffer, A., Burgess, J., Griffith, M., and Mills, B. (2000). "Breast tumor contamination of peripheral blood stem cell harvests: increased sensitivity of detection using immunomagnetic enrichment", *J Hematother Stem Cell Res* 9, 895-904.

von Knebel Doeberitz, M., Gebert, J., and Herfarth, C. (1996). "[Effect of molecular diagnostic procedures on surgical therapy of malignant diseases]", *Chirurg* 67, 967-79.

Walsh, M. D., Luckie, S. M., Cummings, M. C., Antalis, T. M., and McGuckin, M. A. (2000). "Heterogeneity of Muc1 expression by human breast carcinoma cell lines in vivo and in vitro", *Breast Cancer Res Treat* 58, 255-266.

Wasserman, L., Dreilinger, A., Easter, D., and Wallace, A. (1999). "A seminested RT-PCR assay for HER2/neu: initial validation of a new method for the detection of disseminated breast cancer cells", *Mol Diagn* 4, 21-8.

- Weiss, L. (1990). "Metastatic inefficiency", *Adv Cancer Res* 54, 159-211.
- Werther, K., Normark, M., Hansen, B. F., Brunner, N., and Nielsen, H. J. (2000). "The use of the CELlection kit in the isolation of carcinoma cells from mononuclear cell suspensions", *J Immunol Methods* 238, 133-41.
- Wyld, D. K., Selby, P., Perren, T. J., Jonas, S. K., Allen-Mersh, T. G., Wheeldon, J., and Burchill, S. A. (1998). "Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse- transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20", *Int J Cancer* 79, 288-93.
- Zach, O., Kasparu, H., Krieger, O., Hehenwarter, W., Girschikofsky, M., and Lutz, D. (1999). "Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA", *J Clin Oncol* 17, 2015-9.
- Zach, O., Kasparu, H., Wagner, H., Krieger, O., and Lutz, D. (2002). "Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients", *Acta Med Austriaca* 29, 32-4.
- Zehentner, B. K. (2002). "Detection of disseminated tumor cells: strategies and diagnostic implications", *Expert Rev Mol Diagn* 2, 41-8.
- Zehentner, B. K., Dillon, D. C., Jiang, Y., Xu, J., Bennington, A., Molesh, D. A., Zhang, X., Reed, S. G., Persing, D., and Houghton, R. L. (2002). "Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes", *Clin Chem* 48, 1225-31.
- Zhong, X. Y., Kaul, S., Eichler, A., and Bastert, G. (1999). "Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow", *Arch Gynecol Obstet* 263, 2-6.

Zhong, X. Y., Kaul, S., Lin, Y. S., Eichler, A., and Bastert, G. (2000). "Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19", *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 212-8.

Zippelius, A., and Pantel, K. (2000). "RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors. An overview", *Ann N Y Acad Sci* 906, 110-23.

Zusman, I., and Ben-Hur, H. (2001). "Serological markers for detection of cancer (Review)", *Int J Mol Med* 7, 547-56.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin	
bp	Basenpaare	
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinder-Serumalbumin)	
°C	Grad Celsius	
CA15.3	Carcinoma Antigen 15.3	
cDNA	„complementary desoxyribonucleic acid“ (komplementäre DNA)	
CEA	„carcino embryonic antigen“ (Karzinoembryonales Antigen)	
cm	Zentimeter	
CT	Computer-Tomographie	
dd	didesoxy	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)	
DNase	Desoxyribonuklease	
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure	
EGFR	„epidermal growth factor receptor“ (Epidermaler Wachstumsrezeptor)	
EMA	Epitheliales Membranantigen	
EpCAM	„epithelial cell adhesion molecule“ (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül)	
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>	
EtBr	Ethidiumbromid	
FACS	„Fluorescent activated cell sorter“ (Durchflusszytometer)	
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat	
FKS	Fötales Kälberserum	
GA733.2	„gastrointestinal tumor-associated antigen 733.2“ (Gastrointestinales tumorassoziiertes Protein 733.2)	
G anti M	„Goat anti Mouse“ (Ziege gegen Maus)h	Stunde
HNEC	„human nasal epithelial cells“ (humane nasale Epithelzellen)	
ICC	„immuncytochemistry“ (Immunzytochemie)	
IHC	„immunhistochemistry“ (Immunhistochemie)	
IMS	„immunomagnetic selection“ (Immunomagnetische Selektion)	
IPTG	Isopropyl-thio-beta-D-galactosid	
kb	Kilobase(n)	

LB	Luria Broth
MCS	„multiple cloning site“ (Multiple Klonierungsstelle)
Mi/Fo/5-Fu	Mitomycin/Folinat/5-Fluorouracil
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MNC	„mononuclear cells“ (Mononukleäre Zellen)
MPC	„magnetic particle concentrator“ (Magnetpartikelselektionierer)
MRD	„minimal residual disease“ (Minimale residuale Krankheit)
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“ (Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen)
nm	Nanometer
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PBMNC	„peripheral blood mononuclear cells“ (Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut)
PFA	Paraformaldehyd
PI	„propidium iodide“ (Propidiumjodid)
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAGE	„serial analysis of gene expression“ (Serielle Genexpressionsanalyse)
sec	Sekunden
s. o.	siehe oben
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ü. N	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
$x g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Veit Zieglschmid

Hannover, den 03.06.2003

Danksagung

Für die Übernahme des Referates möchte ich Prof. Dr. Bernd Otto vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung Hannover und für die Übernahme des Koreferates Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover danken.

Ich danke Dr. Stefanie Waschütza für die Möglichkeit, diese Promotion bei der AdnaGen AG anfertigen zu können.

Für die kompetente Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit möchte ich vor allem Dr. Christiane Hollmann, Dr. Andreas Krehan und Dr. Oliver Böcher danken, die mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Bertha Gutierrez für die technische Unterstützung und Hilfe bei Etablierung der Multiplex-RT-PCR.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich besonders Dr. Oliver Böcher, Dr. Christiane Hollmann, Silke Zimmermann und Runhild Zieglschmid danken.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Kaul vom onkologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg für die Bereitstellung der Primärzelllinie 1590.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Firma Adnagen AG Dr. Winfried Albert, Holger Berthel, Kati Bischoff, Dr. Oliver Böcher, Constanze Budnick, Kerstin Buttler, Axel Deuring, Erik Franzke, Nicole Goldhorn, Verena Grzeschik, Tania Grafe, Bertha Gutierrez, Dr. Sigfried Hauch, Mirco Heisinger, Dr. Christiane Hollmann, Dr. Guelinard Iakoubov, Dr. Andreas Krehan, Dr. Silke Lankiewicz, Dr. Michael Lustig, Dr. Andrea Mehles, Maren Mönkemeyer, Katrin Preuß, Dr. Stefan Razik, Dr. Stefan Stachelhaus, Pia Steffens, Dr. Eckart Schnakenberg, Thomas Simon, Dr. Monika Stefan, Dr. Stefanie Waschütza, Dr. Lutz Wehmeyer und Silke Zimmermann für die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit..

Publikationen

„Work shop“ – Präsentationen

„Tumor cell detection in peripheral blood of patients with testicular cancer“
(Paris 2001).

“Sensitive detection of tumor cells in peripheral blood of colorectal patients by a reverse transcription PCR Method” (Düsseldorf 2002).

Publikationen

“High sensitivity detection of tumor cells in peripheral blood of carcinoma patients by a reverse transcription PCR method.”

Bertha Gutierrez, Veit Zieglschmid, Christiane Hollmann, Winfried Albert, Stefanie Waschütza, Oliver Böcher, Agilent Application Note (in press).

Lebenslauf

Veit Zieglschmid

Diplom-Biologe

geb.: 30.04.1972 in Wolfsburg

Lohmeyerhof 11

30459 Hannover

☎ 0511/7682888

Familienstand:

Verheiratet, ein Kind

Studium

2000-2003

Promotionsarbeit, AdnaGen AG

Thesis: Expressionsanalyse zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen

1999-2000

Diplomarbeit, AdnaGen AG

Thesis: Detektion im Blut zirkulierender Tumorzellen mittels RT-PCR: Entwicklung eines spezifischen genetischen Detektionssystems mittels des Tumormarkers AFP

1994-1999

Studium der Biologie, Universität Hannover

Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfach: Genetik

Berufsausbildung vor dem Studium

1993-1994

Ausbildung zum Rettungsassistenten (Deutsches Rotes Kreuz)

Zivildienst

1992-1993

Rettungsdienst RSH, Lehre

Schule

1992

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1985-1992

Theodor-Heuss-Gymnasium, Wolfsburg

1983-1985

Orientierungsstufe, Rühren

1979-1983

Grundschule, Rühren-Brechtorf