

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Frieze

**Modellsysteme für den Nachweis von zirkulierenden und  
disseminierten Tumorzellen aus Blut- und Knochenmarksproben  
beim Mammakarzinom mittels Real-Time RT-PCR und  
Immunzytochemie**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Zebisch

aus

München

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. Ullrich G. Müller-Lisse, M.B.A.  
Professor Dr. med. Ralph Mocikat

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. U. Andergassen, Dr. rer. nat. A.C. Kölbl

Dekan: Professor Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2014



---

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 4 a der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München als kumulative Dissertation gestaltet

---



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren.....	6
1.1.1. Genetische Prädisposition.....	6
1.1.2. Sporadische Disposition.....	7
1.2. Diagnostik.....	8
1.2.1. Etablierte Screening und Diagnosemethoden.....	8
1.2.2. Bedeutung von zirkulierenden (CTCs) und disseminierten (DTCs) Tumorzellen für die Tumordiagnostik.....	9
1.2.3. Immunzytologische Untersuchungsmethoden.....	10
1.2.4. Immunhistologische Untersuchungsmethoden.....	12
1.3. Zielsetzung.....	13
2. Referenzen.....	15
3. Publikationen.....	20
3.1. Publikation 1 --- Biomedical Reports.....	21
3.2. Publikation 2 --- Anticancer Research.....	25
3.3. Publikation 3 --- Future Oncology.....	31
4. Zusammenfassung (deutsch).....	38
5. Zusammenfassung/Summary (english).....	40
6. Anhang.....	42
6.1. Abbildungsverzeichnis.....	42
6.2. Tabellenverzeichnis.....	43
6.3. Abkürzungsverzeichnis.....	44
6.4. Chemikalienverzeichnis.....	46
6.5. Geräteverzeichnis.....	48
6.6. Posterpräsentationen.....	49
6.7. Auszeichnung.....	55
6.8. Veröffentlichungen.....	56
6.9. Danksagung.....	57
6.10. Eidesstattliche Erklärung.....	58

## 1. Einleitung

Die Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert-Koch-Institut veröffentlichen alle zwei Jahre die Publikation „Krebs in Deutschland“.

Im Februar 2012 wurden die gesammelten Daten aus den Jahren 2007/2008 veröffentlicht.

### 1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Statistisch gesehen, erkranken jeder zweite Mann und 43% aller Frauen in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Krebs [1]. Die jeweils höchsten Neuerkrankungsraten weisen bei Männern das Prostatakarzinom, und bei Frauen die maligne Erkrankung der Brustdrüse, auf (Abb. 1). Der Brustkrebs bei Männern spielt mit 520

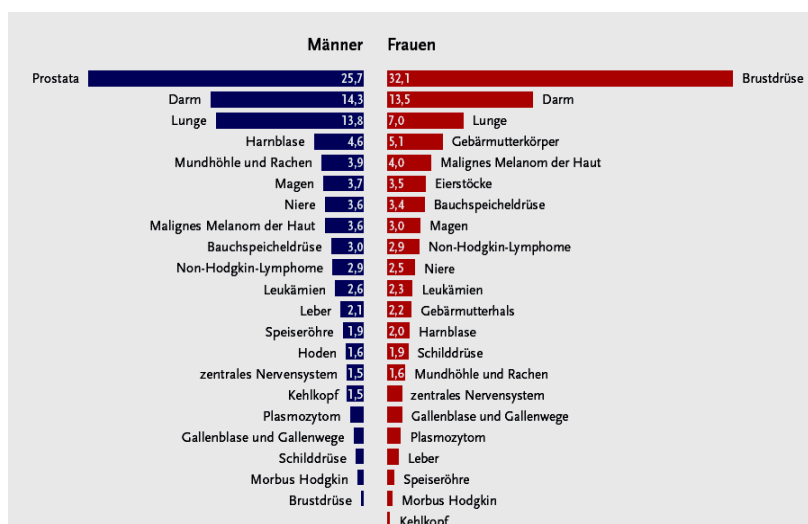


Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008

Neuerkrankungen pro Jahr im Vergleich nur eine untergeordnete Rolle [1]. Die gestiegene Inzidenz und Diagnose des Mammakarzinoms im Laufe der letzten Jahre wird auf stark verbesserte Vorsorgeuntersuchungen, wie beispielsweise dem Mammographie-Screening, und den Einsatz verbesserter diagnostischer Methoden (Mamma MRT) zurückgeführt. Ein Indiz hierfür ist die seitdem hohe diagnostizierte Anzahl an kleinen Tumoren (T1) [2].

#### 1.1.1. Genetische Prädisposition

Modifizierbare, sowie nicht modifizierbare Risikofaktoren, spielen bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle, wenngleich die meisten Krebserkrankungen Alterserkrankungen darstellen [3]. 5% der

Erkrankungen der Brustdrüse sind durch genetische Veranlagungen der autosomal dominanten, heterozygoten Mutationen im BRCA1 bzw. BRCA2 Gen bedingt [4]. Mutationen des BRCA1 Gens erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken, um ca. 65%, BRCA2-Mutationen um ca. 45% [5, 6]. Beide Gene sind in die DNA-Reparatur, und damit in die Aufrechterhaltung der Genomstruktur, involviert [7]. Auch haben BRCA1 und BRCA2 Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeiten weiterer Krebserkrankungen, wie Ovarial-, Kolon-, Magen- oder Pankreaskarzinomen [8, 9].

Mutationen im p53-Gen folgen ebenso einem autosomal dominanten Erbgang, und werden mit der Entstehung von Brustkrebs in Verbindung gebracht. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von weiteren Genen, die das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, erhöhen, z.B. PTEN, CDH1, ATM und CHK2 [10].

Mit RAD51C konnte kürzlich ein weiteres Hochrisikogen für die Entstehung von Mammakarzinomen identifiziert werden. Die Häufigkeit dieser Mutation liegt im Schnitt allerdings nur bei 1,5% der Hochrisikofamilien mit genetischer Prädisposition für Mammakarzinom [11, 12].

### 1.1.2. Sporadische Dispositionen

Hormonelle Gegebenheiten beeinflussen zusätzlich die Entstehungen von Brustkrebstumoren. Jede Brustkrebszelle besitzt intrazellulär lokalisierte Proteinsynthese-regulierende Rezeptoren für Estrogen und Gestagen [13], die aufgrund ihrer extragonadalen Wirkung für das Brustwachstum verantwortlich sind [14].

Hormonersatztherapien während und nach der Menopause erhöhen das Brustkrebsrisiko [15-19]. Für die Einnahme von ovulationshemmenden Medikamenten („Pille“) konnte hingegen in neueren Studien bislang kein signifikanter Nachweis einer brustkrebsfördernden Wirkung erbracht werden [20-25]. Als weitere Risikofaktoren für Mammakarzinom gelten allgemein späte Erstschwangerschaften, Kinderlosigkeit, sowie eine sehr früh oder sehr spät einsetzende Menarche [26]. Im Gegenzug verringert sich das Brustkrebsrisiko mit der Anzahl an Geburten [27, 28], und der Häufigkeit und Länge der Stillzeiten [26].

Mäßige, körperliche Aktivität kann zu einer Risiko- und Mortalitätsreduktion bei Krebserkrankungen von bis zu 35% führen (Abb. 2); darüber hinaus wirkt sich diese auch positiv auf andere Krankheiten, wie Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen, aus [29].

Übergewicht bzw. Adipositas erhöhen das Erkrankungs- und Rezidivrisiko, vor allem in der Postmenopause,

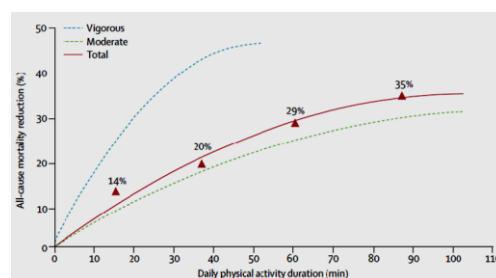


Abbildung 2

Mortalität in Abhängigkeit von körperlicher Aktivität

ebenso wie der übermäßige Konsum von Alkohol. Vor allem die Alkoholmenge ist hier bezüglich des relativen Brustkrebsrisikos ausschlaggebend: 10g Alkohol pro Tag erhöhen das Risiko bereits um 7,1-10% [30, 31].

## 1.2. Diagnostik

Die Therapiechance und Überlebenschance jeder Tumorerkrankung ist eng mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung verknüpft. Generell gilt, dass beide Aspekte prozentual ansteigen, je frühzeitiger eine Diagnose erstellt, und entsprechende therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden können [32].

### 1.2.1. Etablierte Screening- und Diagnosemethoden

In Deutschland wird, gemäß den Europäischen Leitlinien, das Mammographyscreening in Kombination mit einer Brustsonographie für Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr flächendeckend angeboten. Innerhalb dieses Zeitfensters ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines

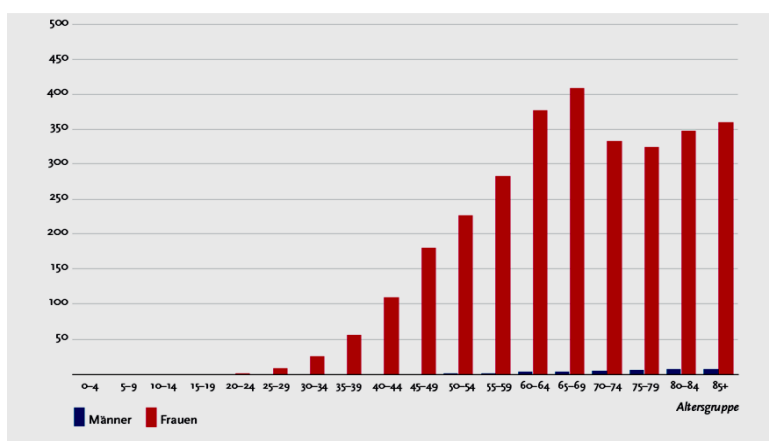


Abbildung 3 Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht ICD-10 C50, Deutschland 2007/2008

Mammakarzinoms am Höchsten (Abb. 3). In randomisierten, kontrollierten Studien konnte gezeigt werden, dass diese Maßnahme zu einer Mortalitätssenkung von 25% führt [33].

Bei Auffälligkeiten in der Bildgebung wie Herdbefunden, Mikrokalzifikationen, Parenchymasymmetrien und Strukturstörungen ist eine weitere brustdiagnostische, meist invasive Abklärung, erforderlich. Bei Hochrisikopatientinnen wie Mutationsträgerinnen ist der Einsatz einer Kernspintomographie, aufgrund ihrer hohen Sensitivität, zu empfehlen [2]. Bei suspekten Befunden ist darüber hinaus eine histologische Abklärung obligatorisch. Hierzu stehen perkutane, interventionelle Diagnoseverfahren, wie ultraschallgesteuerte Core-Cut-Biopsien und vakuumassistierte Stanzbiopsien, zur Verfügung. Diese ermöglichen in der Regel eine sehr sichere, anatomisch-pathologische Abklärung [34, 35]. Die immunhistologische Bestimmung von

Hormonrezeptoren (ER, PgR [Kernrezeptoren; Proteinsynthese regulierende Rezeptoren] und HER2 [Membranrezeptor; Typ: Tyrosinkinase]) findet bei allen invasiven und intraduktalen Karzinomen statt [2]. Die Färbeergebnisse der Immunhistologie (Prozentualität und Farbtintensität) werden durch den Allred-Score (8-stufig) bei ER und PgR wiedergegeben [36]. Bei HER2 dient der IHC Score zur Klassifizierung und kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen [2]. Um die Differenzierung und die proliferative Aktivität des Tumors (G1 bis G3) prognostisch besser einschätzen zu können, wird am Tumorgewebe, im Rahmen der Biopsie, der Proliferationsfaktor Ki-67 bestimmt, da dieser maßgeblichen Einfluss auf das 10 Jahres Gesamtüberleben (OAS) hat [37].

### **1.2.2. Bedeutung von zirkulierenden (CTCs) und disseminierten Tumorzellen (DTCs) für die Tumordiagnostik**

Die Streuung von Tumorzellen (Metastasierung) beruht auf unterschiedlichen Modellvorstellungen. Eine Theorie besagt, dass die Metastasierung in einer Spätphase der Tumorbildung einsetzt, wenn eine bestimmte Tumorgöße erreicht ist, weiteres Tumorwachstum nur noch eingeschränkt durch Angiogenese möglich erscheint, und es sich um einen hoch aggressiven Tumortypus handelt (Lineare Hypothese). Eine andere Theorie geht von einer bereits sehr früh einsetzenden Metastasierung in einem Tumorfrühstadium aus (Parallele Hypothese) [38, 39]. Dies impliziert die Bildung von Tumormetastasen, v.a. in stoffwechselaktiven Organen, gleichzeitig zum primären Karzinom.

Eine weitere Theorie zur Krebsentstehung befasst sich mit der Existenz von Tumorstammzellen. Sie besagt, dass ein Teil des Tumorgewebes Zellen enthält, die charakteristische Eigenschaften von Stammzellen besitzen, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in Kombination mit einem stark ausgeprägten Differenzierungspotential. Diese wenigen Zellen werden für die Entstehung und die Metastasierung von Tumoren, sowie für auftretende Therapieresistenzen und damit verbundene Rezidiverkrankungen, verantwortlich gemacht. [40, 41]

CTCs und DTCs stammen von Zellklonen des Primärtumors ab [42], da sie molekulare Charakteristika der Zellen des Primärkarzinoms aufweisen [43]. Während der Tumorentstehung ist eine kleiner Prozentsatz von Tumorzellen des Primärtumors offenbar in der Lage, bestimmte Merkmale zur Zellinvasion und -migration auszubilden. Dies ermöglicht die Ablösung vom Primärtumor und die Invasion in Blut- und Lymphgefäße [39]. Es gibt Anzeichen, dass diese Mechanismen auf diversen Interaktionen der Tumorzellen und Stromazellen beruhen. Auslösende Impulse für diese Interaktionen können beispielsweise auftretende hypoxische Areale im Bereich des Primärtumors sein. Auch die Gefäßneubildung des Tumors [44], Metalloproteinase-abhängige Invasion in umgebendes Gewebe, sowie der Erwerb von neuen morphologischen Charakteristika bei der

epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die zumindest in einer Subpopulation der Tumorzellen mit vermuteten Stammzell-Eigenschaften auftritt, können ebenso Ursachen hierfür sein [45-47]. Bei der EMT erlangen epitheliale Zellen genetische und morphologische Eigenschaften von mesenchymalen Zellen. Moleküle zur Zelladhäsion werden dabei herunter reguliert, Zell-Zell-Kontakte aufgelöst, und die Zellpolarität geht verloren [45]. Somit sind diese Zellen in der Lage, eine Metastasierung in anderen, meist stoffwechselaktiven Organen wie Leber, Lunge oder Knochenmark, zu bilden, wobei die EMT dann durch den Mechanismus der mesenchymalen-epithelialen Transition (MET) wieder rückgängig gemacht wird [46].

Im Knochenmark können die Zellen über Jahre hinweg in einem zellteilungs-inaktiven Zustand persistieren [48]. Auch die Überexpression von sogenannten „Stress-Response“-Proteinen in DTCs wird diskutiert. Dies hat zur Folge, dass gängige Chemotherapeutika in diesem Zustand unwirksam sind [39, 49]. Ein niedriger KI-67-Wert als Nachweis einer geringen Proliferationsaktivität bei DTCs [50] verdeutlicht zusätzlich die Resistenz gegenüber einer konventionellen, antiproliferativen Chemotherapie [51]. Nach Überwindung dieser inaktiven Phase können DTCs aber erneut zu peripheren Metastasen [44] und zu Zweitkarzinomen führen [52, 53].

Die klinische Relevanz von DTCs ist unstrittig [54, 55], vor allem bei der Prognose des Gesamtüberlebens, sowohl in der metastasierten, als auch in der adjuvanten Situation [56, 57]. Als problematisch zeigt sich jedoch die Probennahme (Biopsie aus den Beckenkämmen), weshalb eine Etablierung in der Routinediagnostik bisher weitestgehend ausgeblieben ist. Im Gegensatz dazu erscheinen CTC-Untersuchungen aus Blutproben von Krebspatienten als geeignetere Variante, da diese einfacher, und in regelmäßigen Abständen zur Verlaufskontrolle, entnommen werden können [39].

### **1.2.3. Immunzytologische Untersuchungsmethoden**

Im Rahmen neuer Studien treten neben den erwähnten Untersuchungsmethoden zunehmend auch zellbiologische und molekulardiagnostische Verfahren in den Vordergrund, vor allem auf dem Gebiet der zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen in Blut- bzw. Knochenmarksproben.

Es gibt zunehmend Anzeichen, dass deren Auftreten mit ungünstigen Prognosen bezüglich des Krankheitsverlaufs einhergeht [39, 58]. Bereits der Nachweis einer einzelnen, zirkulierenden Tumorzelle in einem Blutvolumen von 7,5ml, wird mit einem steigenden Risiko für Metastasierung in Verbindung gebracht [59, 60]. So scheinen zirkulierende, aber auch disseminierte Tumorzellen eine entscheidende Rolle in der Metastasierung von epithelialen Tumoren, wie dem Mammakarzinom, zu spielen [61].

Der Erkenntnisgewinn aus CTC-Analysen wird jedoch allgemein als geringer angesehen, als der von DTC-Analysen [56], da bisher keine einheitlichen, und somit vergleichbaren Diagnosemethoden für beide Zelltypen zur Verfügung stehen [39], und aufgrund dessen erhebliche Detektionsdiskrepanzen die Folge sind. Interessanterweise sind diese Unterschiede am Höchsten nach erfolgter, adjuvanter Chemotherapie [62]. Zusätzlich steht das Problem im Raum, dass nicht jede detektierte zirkulierende Tumorzelle auch tatsächlich eine existenzfähige, zur Metastasierung fähige, Tumorzelle darstellt [39]. Bisher hat lediglich das Cell Search<sup>®</sup> - System (Veridex, LLC<sup>®</sup>), das auf der Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus Blutproben von Patienten mit epithelialen Tumoren (Mamma-, Pankreas- und Prostatakarzinom; jeweils in der metastasierten Situation) durch molekulare Markierung charakteristischer epithelialer Oberflächenantigene (EpCAM+, CD45-, CK 8, 18/19+) beruht, eine Zulassung durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA erhalten. Dieses Verfahren ermöglicht die Isolierung von CTCs mittels halbautomatischer, magnetischer Separation und anschließender fluoreszenzbasierter Quantifizierung [63].

Am Campus Innenstadt der Universitätsfrauenklinik München wurde innerhalb der deutschlandweit durchgeführten SUCCESS-Studien mit Hilfe des Cell Search<sup>®</sup> - Systems bei nahezu 10% aller 1500 teilnehmenden Brustkrebspatientinnen zirkulierende Tumorzellen bereits zum Zeitpunkt der Primärdiagnose, und somit noch vor Durchführung einer adjuvanten Systemtherapie, detektiert. Im Rahmen der SUCCESS A Studie wurden die Patientinnen mit einer Taxan-freien, systemischen Polychemotherapie behandelt, und eine CTC-Analyse vor und nach Abschluss der Therapie, im Rahmen der Verlaufskontrolle bzw. bei auftretendem Rezidiv, untersucht. Verglichen mit CTC-negativen Patientinnen wiesen diese Frauen mit positivem CTC-Befund eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens (OAS) auf. Patientinnen, die nach adjuvanter Chemotherapie noch detektierbare CTCs aufwiesen, zeigten ebenso eine schlechtere Prognose, als das Kollektiv, das nach der Chemotherapie CTC-frei war [64, 65].

Somit ist die vielleicht vielversprechendste Anwendung der CTC-Detektion im klinischen Routinebereich derzeit die Überprüfung der Ansprechraten auf bestimmte Therapieregime [39], sowie die Abschätzung von klinisch relevanten, prognostischen Informationen [66]. Ebenso scheinen detektierte CTCs nach vorangegangener Chemotherapie Hinweise auf ein Therapieversagen geben zu können [67, 68]. So ist es Ziel verschiedener aktueller Studien (SWOG S0500, GEPARQuattro, TreatCTC, ADAPT, DETECT III) herauszufinden, ob auf Basis der bisherigen CTC-Diagnostik individuelle, patientenspezifische Therapieoptionen getroffen werden können.

### 1.2.4. Immunhistologische Untersuchungsmethoden

Etabliertere Methoden zum selektiven Nachweis von zellulären Antigenstrukturen bietet die Immunhistologie.

Das Prinzip beruht auf der spezifischen Erkennung von Antigen-Zielstrukturen durch Primär-Antikörper und anschließender Signalverstärkung durch Zweitantikörper, an die ein Enzym gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Substrats, das vom Enzymkomplex umgesetzt wird, kann das Antigen detektiert werden. Bei der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) wird das Antigen von einem Primärantikörper erkannt, biotinylierte Sekundärantikörper und Avidin werden anschließend hinzugegeben. Im Folgenden wird ein Biotin-Enzymkomplex zugesetzt. Durch Zugabe eines Substrats, das vom Enzym umgesetzt wird, entsteht eine spezifische Farbreaktion zur Detektion [69]. Ähnlich funktioniert auch die APAAP-Methode. Ein Primärantikörper wird von einem Brückenantikörper erkannt. Durch Zugabe des APAAP-Komplexes (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase; Enzym-Anti-Enzym-Komplex) findet eine Enzym-Substrat-Reaktion statt, mit der zelluläre Antigenstrukturen markiert und detektiert werden können [70]. Diese Methode wird bei der Detektion von DTCs aus Knochenmarksbiopsien erkrankter Mammakarzinompatientinnen routinemäßig eingesetzt. Die Suche nach malignen Zellen epithelialen Ursprungs unter einem Pool von mesenchymalen Zellen in Knochenmarksproben ist die derzeit am besten evaluierteste Methode [71]. Als zu detektierende, zelluläre Antigenstrukturen dienen am häufigsten Zytokeratinstrukturen: die Zytokeratine 8, 18 und 19 sind hier von entscheidender Bedeutung [72, 73].

Zytokeratine werden bereits seit geraumer Zeit als mögliche Zielstrukturen zur Detektion von Metastasierungen bzw. Metastasierungsprozessen in Betracht gezogen. Als Alternative zu etablierten histologischen Aufarbeitungen bzw. bei Schnellschnitt-Untersuchungen von Sentinel-Lymphknoten wird der Einsatz der RT-PCR zur Abklärung einer epithelialen Genexpression diskutiert [74], da deren Sensitivität zur Detektion von Metastasen höher als die der histologischen Techniken liegt [75]. Als Target hat sich hier besonders das Zytokeratin 19, neben Mammaglobin, bewährt; wenngleich beide Marker alleine offenbar nicht in der Lage sind, sämtliche Tumormetastasen zu erkennen [2]. Auch die Detektion von CK 19 positiven CTCs mit Hilfe der Real-Time RT-PCR nach erfolgter adjuvanter Chemotherapie, bestätigte in einer Studie ein fortbestehen der Tumorerkrankung [76, 77].

Zytokeratine werden bereits seit geraumer Zeit als mögliche Zielstrukturen zur Detektion von Metastasierungen bzw. Metastasierungsprozessen in Betracht gezogen.

Als Alternative zu etablierten histologischen Aufarbeitungen bzw. bei Schnellschnitt-Untersuchungen von Sentinel-Lymphknoten wird der Einsatz der RT-PCR zur Abklärung einer epithelialen Genexpression diskutiert [74], da deren Sensitivität zur Detektion von Metastasen höher als die der histologischen Techniken liegt [75]. Als Target hat sich hier besonders das Zytokeratin 19, neben Mammaglobin, bewährt; wenngleich beide Marker alleine offenbar nicht in der Lage sind, sämtliche Tumormetastasen zu erkennen [2]. Auch die Detektion von CK 19 positiven CTCs mit Hilfe der Real-Time RT-PCR nach erfolgter adjuvanter Chemotherapie, bestätigte in einer Studie ein fortbestehen der Tumorerkrankung [76, 77].

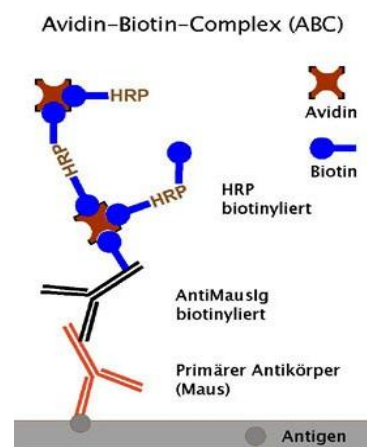


Abbildung 4 Schematische Darstellung des ABC-Färbekomplexes



Eine weitere phänotypisch morphologische Charakterisierung von CTCs und DTCs ist gleichwohl schwierig wie notwendig, um gezieltere Zielmoleküle, und damit genauere Detektionsmethoden, zu etablieren.

Das TF Antigen (Thomsen-Friedenreich; CD176) wurde als spezifischer Marker sowohl bei malignem Brustkrebs [78, 79], als auch bei Kolon-, Lunge-, Prostata- und Zervixkarzinom identifiziert [80-84]. Dabei handelt es sich um ein tumorassoziertes Epitop [85], als Trägerprotein fungiert MUC-1. Für die Entstehung von TF (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-Ser(Thr) ist eine fehlerhafte O-Glykosylierung während der posttranslationalen Modifizierung durch Glycosyltransferasen verantwortlich [71]. Dieses Glykosylierungsmuster tritt ausschließlich in malignen, karzinomatösen Geweben auf [71]. In gesunden Geweben ist TF durch zusätzliche Monosaccharidsubstitutionen maskiert [86].

Das TF Antigen spielt eine entscheidende Rolle in der endothelialen Adhäsion der Tumorzellen, sowie der Tumorinvasion und dient als Marker zur Charakterisierung der Tumoraggressivität [87]. TF ist wesentlich am Prozess der Metastasierung beteiligt [88] und könnte als Stammzellmarker und Zielmolekül für Strategien zur Tumorbekämpfung dienen [89-91].

### **1.3. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, eine schnellere, kosteneffizientere und sensitivere Detektionsmethode von CTCs aus Blutproben zu entwickeln. Hierfür soll die molekularbiologische Detektionsmethode der Real-Time RT-PCR, die bereits in einer Vielzahl von Diagnoseverfahren, wie der Erkennung viraler Infektionen, der Erstellung von genetischen Fingerabdrücken, und der Detektion bestimmter Erbkrankheiten, routinemäßig im Einsatz ist [92-94], unter Verwendung der Zytokeratine 8, 18 und 19 als spezifische Marker für Zellen epithelialen Ursprungs, als qualitative und quantitative Detektionsmethode für CTCs geprüft werden. Mit Hilfe von Zellen verschiedener Brustkrebszelllinien wurde ein Protokoll zur standardmäßigen Aufarbeitung von Blutproben erstellt und validiert, das die Grundlage für weitergehende Untersuchungen zur Detektion und Quantifizierung von CTCs aus Patientenblutproben darstellt.

Diese Thematik wurde in den beiden Veröffentlichungen: „Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines“ und “Quantification of Breast Cancer Cells in peripheral Blood Samples by Real-Time RT-PCR“ behandelt.

Ferner sollte eine Charakterisierung und Phänotypisierung von disseminierten Tumorzellen aus Knochenmarksproben anhand neuer, spezifischer Markerkombinationen erfolgen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden sowohl Färbungen auf HER2 als etablierte Antigenstruktur, als auch auf das Thomsen-Friedenreich-Antigen (CD176), durchgeführt [71, 95]. Auf diese Weise sollte einerseits

die Wiederfindungsrate dieser neuen Doppelfärbungsmethode geprüft werden, andererseits das TF-Antigen als möglicher spezifischer Kombinationsmarker getestet werden.

Hierfür wurden im Rahmen der Veröffentlichung: „Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen - Friedenreich antigen“ die theoretischen Grundlagen zur Erstellung des Standardprotokolls vom Zweitautor erarbeitet, sowie die praktischen Laborarbeiten und die Auswertung der Ergebnisse durchgeführt.

Im letzten Kapitel der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der drei Publikationen, sowohl in deutscher, als auch in englischer Sprache, zusammengefasst, verbunden mit einer daraus resultierenden Schlussfolgerung.

## 2. Referenzen

1. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., *Krebs in Deutschland 2007/2008*, Zentrum für Krebsregisterdaten 2012, 2012.
2. Kommission Mamma, V.d.A.S., der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., sowie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., *Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome (AGO) - State of the Art*. 2011.
3. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 1999. 49(1): p. 33-64, 1.
4. Frank, T.S., et al., *Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals*. J Clin Oncol, 2002. 20(6): p. 1480-90.
5. Shen, Z., et al., *The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2002. 8(7): p. 2085-90.
6. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. 72(5): p. 1117-30.
7. Gilbert, F.J., et al., *Cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers and in women at high risk for breast cancer: MR imaging and mammographic features*. Radiology, 2009. 252(2): p. 358-68.
8. Risch, H.A., et al., *Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer*. Am J Hum Genet, 2001. 68(3): p. 700-10.
9. Thompson, D., D.F. Easton, and C. Breast Cancer Linkage, *Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(18): p. 1358-65.
10. Stratton, M.R. and N. Rahman, *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. Nat Genet, 2008. 40(1): p. 17-22.
11. Meindl, A., et al., *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. Nat Genet, 2010. 42(5): p. 410-4.
12. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. 266(5182): p. 66-71.
13. Lüllmann, H.M., Klaus ; Hein, Lutz, *Taschenatlas der Pharmakologie / Heinz Lüllmann ; Klaus Mohr ; Lutz Hein. Farbtaf. von Jürgen Wirth* Stuttgart ; New York : Thieme 2004. 5., vollst. überarb. und erw. Aufl. (XI, 394 S. : Ill., graph. Darst. ; 19 cm ) : p. 66.
14. Silbernagl, S.D., Agamemnon and A. Despopoulos, *Taschenatlas der Physiologie / Stefan Silbernagl ; Agamemnon Despopoulos. Ill. von Rüdiger Gay und Astried Rothenburger* Stuttgart ; New York : Thieme 2003. 6., korr. Aufl.(XIII, 436 S. : Ill., graph. Darst. ; 19 cm ) : p. 302.
15. Lee, S.A., R.K. Ross, and M.C. Pike, *An overview of menopausal oestrogen-progestin hormone therapy and breast cancer risk*. Br J Cancer, 2005. 92(11): p. 2049-58.
16. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*. Lancet, 1997. 350(9089):: p. 1484.
17. Beral V, R.G., Bull D, Green J; Million Women Study Collaborators, *Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy*. J Natl Cancer Inst. , 2011. 103(4): p. 296-305.
18. Bakken, K., et al., *Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Int J Cancer, 2011. 128(1): p. 144-56.
19. Chlebowski, R.T., et al., *Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women*. JAMA, 2010. 304(15): p. 1684-92.

20. Cibula, D., et al., *Hormonal contraception and risk of cancer*. Hum Reprod Update, 2010. 16(6): p. 631-50.
21. Shapiro, S., *Re: "a case-control study of oral contraceptive use and incident breast cancer"*. Am J Epidemiol, 2009. 170(6): p. 802-3; author reply 803-4.
22. Rosenberg, L., et al., *A case-control study of oral contraceptive use and incident breast cancer*. Am J Epidemiol, 2009. 169(4): p. 473-9.
23. Gaffield, M.E., K.R. Culwell, and A. Ravi, *Oral contraceptives and family history of breast cancer*. Contraception, 2009. 80(4): p. 372-80.
24. Vessey, M. and R. Painter, *Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968-2004*. Br J Cancer, 2006. 95(3): p. 385-9.
25. Hannaford, P.C., et al., *Cancer risk among users of oral contraceptives: cohort data from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study*. BMJ, 2007. 335(7621): p. 651.
26. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. Lancet, 2002. 360 (9328): p. 187-195.
27. Lord, S.J., et al., *Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding: a case-control study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. 17(7): p. 1723-30.
28. Ma, H., et al., *Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies*. Breast Cancer Res, 2006. 8(4): p. R43.
29. Wen, C.P., et al., *Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study*. Lancet, 2011. 378(9798): p. 1244-53.
30. Gerber, B., et al., *Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2003. 79(2): p. 265-76.
31. Key, J., et al., *Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues*. Cancer Causes Control, 2006. 17(6): p. 759-70.
32. Smith, R.A., V. Cokkinides, and H.J. Eyre, *American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(1): p. 31-44; quiz 55-6.
33. Vainio H, B.F.e., *Breast cancer screening - IARC Handbooks of cancer prevention*. 2002. 7.
34. Fajardo, L.L., et al., *Stereotactic and sonographic large-core biopsy of nonpalpable breast lesions: results of the Radiologic Diagnostic Oncology Group V study*. Acad Radiol, 2004. 11(3): p. 293-308.
35. Meyer, J.E., et al., *Large-core needle biopsy of nonpalpable breast lesions*. JAMA, 1999. 281(17): p. 1638-41.
36. Allred, D.C., et al., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. Mod Pathol, 1998. 11(2): p. 155-68.
37. Dixon, J.M., et al., *Breast cancer: non-metastatic*. Clin Evid, 2002(8): p. 1811-39.
38. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(4): p. 302-12.
39. Bednarz-Knoll, N., C. Alix-Panabieres, and K. Pantel, *Clinical relevance and biology of circulating tumor cells*. Breast Cancer Res, 2011. 13(6): p. 228.
40. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. 3(7): p. 730-7.
41. Keith, W.N., *From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia*. Oncogene, 2004. 23(29): p. 5092-4.
42. Fehm, T., et al., *Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant*. Clin Cancer Res, 2002. 8(7): p. 2073-84.
43. Punnoose, E.A., et al., *Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells*. PLoS One, 2010. 5(9): p. e12517.
44. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 563-72.

45. Bonnomet, A., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. 15(2): p. 261-73.
46. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. Science, 2011. 331(6024): p. 1559-64.
47. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
48. Goss, P.E. and A.F. Chambers, *Does tumour dormancy offer a therapeutic target?* Nat Rev Cancer, 2010. 10(12): p. 871-7.
49. Bartkowiak, K., et al., *Two-dimensional differential gel electrophoresis of a cell line derived from a breast cancer micrometastasis revealed a stem/ progenitor cell protein profile*. J Proteome Res, 2009. 8(4): p. 2004-14.
50. Pantel, K., et al., *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1993. 85(17): p. 1419-24.
51. Braun, S., et al., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2000. 18(1): p. 80-6.
52. Kim, M.Y., et al., *Tumor self-seeding by circulating cancer cells*. Cell, 2009. 139(7): p. 1315-26.
53. Comen, E., L. Norton, and J. Massague, *Clinical implications of cancer self-seeding*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. 8(6): p. 369-77.
54. Pantel, K., R.H. Brakenhoff, and B. Brandt, *Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(5): p. 329-40.
55. Pantel, K., C. Alix-Panabieres, and S. Riethdorf, *Cancer micrometastases*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. 6(6): p. 339-51.
56. Wiedswang, G., et al., *Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer*. Int J Cancer, 2006. 118(8): p. 2013-9.
57. Benoy, I.H., et al., *Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer*. Br J Cancer, 2006. 94(5): p. 672-80.
58. Banys, M., et al., *Circulating tumor cells in breast cancer*. Clin Chim Acta, 2013. 423: p. 39-45.
59. Bidard, F.C., et al., *Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer*. Ann Oncol, 2010. 21(4): p. 729-33.
60. Krishnamurthy, S., et al., *Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer*. Cancer, 2010. 116(14): p. 3330-7.
61. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(6): p. 453-8.
62. Daskalaki, A., et al., *Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer*. Br J Cancer, 2009. 101(4): p. 589-97.
63. [www.success-studie.de](http://www.success-studie.de).
64. Rack BK, S.C., Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, Beckmann M, Sommer HL, Pantel K, Janni W. for the Success Study Group, *Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial*. J Clin Oncol, 2010. 28: p. 15.
65. Emanuel C. A. Bauer, J.K.N., Ulrich Andergassen, Bernadette Jaeger, Julia Kathrin Jueckstock, Peter A. Fasching, Lothar Haeberle, Thomas W. P. Friedl, Iris Schrader, Andreas Lorenz, Hans Tesch, Mahdi Rezai, Elisabeth Thurner-Herrmanns, Andreas Schneeweiss, Matthias W. Beckmann, Klaus Pantel, Wolfgang Janni, Brigitte Kathrin Rack, *Evaluation of prevalence, number, and temporal changes of circulating tumor cells as assessed after 2 and 5 years of follow-up in patients with early breast cancer in the SUCCESS A study*. J Clin Oncol, 2013. 31(suppl; abstr 11042).
66. Molloy, T.J., et al., *The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2011. 13(3): p. R61.

67. Muller, V., et al., *Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity*. Clin Cancer Res, 2005. 11(10): p. 3678-85.
68. Slade, M.J., et al., *Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment*. Br J Cancer, 2009. 100(1): p. 160-6.
69. <http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Methoden/methode.html>.
70. <http://www.charite.de/maximalmethodisch/e31/e168/e287/Immunhistologie.ppt>.
71. Schindlbeck, C., et al., *Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen*. Histochem Cell Biol, 2005. 123(6): p. 631-7.
72. Noack, F., et al., *A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications*. Int J Biol Markers, 2000. 15(1): p. 100-4.
73. Kurec, A.S., et al., *Use of the APAAP method in the classification and diagnosis of hematologic disorders*. Clin Lab Med, 1988. 8(1): p. 223-36.
74. Weigelt, B., et al., *Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers*. Br J Cancer, 2004. 90(8): p. 1531-7.
75. Visser, M., et al., *Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer*. Int J Cancer, 2008. 122(11): p. 2562-7.
76. Xenidis, N., et al., *Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. 27(13): p. 2177-84.
77. Xenidis, N., et al., *Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2006. 24(23): p. 3756-62.
78. Springer, G.F., et al., *Cellular immunity towards Thomsen-Friedenreich antigen in breast-carcinoma patients*. Naturwissenschaften, 1976. 63(6): p. 300.
79. Springer, G.F., P.R. Desai, and E.F. Scanlon, *Blood group MN precursors as human breast carcinoma-associated antigens and "naturally" occurring human cytotoxins against them*. Cancer, 1976. 37(1): p. 169-76.
80. Takanami, I., *Expression of Thomsen-Friedenreich antigen as a marker of poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma*. Oncol Rep, 1999. 6(2): p. 341-4.
81. Rhodes, J.M., B.J. Campbell, and L.G. Yu, *Lectin-epithelial interactions in the human colon*. Biochem Soc Trans, 2008. 36(Pt 6): p. 1482-6.
82. Lin, W.M., et al., *Expression of CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on lung, breast and liver cancer-initiating cells*. Int J Exp Pathol, 2011. 92(2): p. 97-105.
83. Slovin, S.F., et al., *Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2005. 54(7): p. 694-702.
84. Engelstaedter, V., et al., *Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer*. Histol Histopathol, 2012. 27(4): p. 507-14.
85. Springer, G.F., P.R. Desai, and M.S. Murthy, *Histochemical methods for the demonstration of Thomsen-Friedenreich antigen in cell suspensions and tissue sections*. [Klin. Wochenschr. 56, 761--765 (1978)]. Klin Wochenschr, 1978. 56(24): p. 1225-6.
86. Hanisch, F.G. and S.E. Baldus, *The Thomsen-Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen*. Histol Histopathol, 1997. 12(1): p. 263-81.
87. Khaldoyanidi, S.K., et al., *MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions*. J Biol Chem, 2003. 278(6): p. 4127-34.

- 
88. Yu, L.G., et al., *Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion*. J Biol Chem, 2007. 282(1): p. 773-81.
  89. Cazet, A., et al., *Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. 12(3): p. 204.
  90. Almogren, A., et al., *Anti-Thomsen-Friedenreich-Ag (anti-TF-Ag) potential for cancer therapy*. Front Biosci (Schol Ed), 2012. 4: p. 840-63.
  91. Karsten, U. and S. Goletz, *What makes cancer stem cell markers different?* Springerplus, 2013. 2(1): p. 301.
  92. Fibriani, A., et al., *Low cost HIV-1 quantitative RT-PCR assay in resource-limited settings: improvement and implementation*. J Virol Methods, 2012. 185(1): p. 118-23.
  93. Choi, M.K., et al., *Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine ss-defensin genes*. BMC Genet, 2012. 13: p. 98.
  94. Biesaga, B., et al., *Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and in situ hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens*. Folia Histochem Cytobiol, 2012. 50(2): p. 239-47.
  95. Schindlbeck, C., et al., *Prognostic impact of Thomsen-Friedenreich tumor antigen and disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2007. 101(1): p. 17-25.

### **3. Publikationen**

#### **3.1. Publikation 1: Biomedical Reports**

„Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines“

Submitted: July 18, 2012

Accepted: August 22, 2012

Published Online: December 05, 2012



## Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines

MICHAEL ZEBISCH, ALEXANDRA C. KÖLBL, ULRICH ANDERGASSEN, STEPHAN HUTTER, JULIA NEUGEBAUER, VERENA ENGELSTÄDTER, MARIA GÜNTNER-BILLER, UDO JESCHKE, KLAUS FRIESE and BRIGITTE RACK

Department of Obstetrics and Gynaecology, Ludwig-Maximilians University of Munich, Munich, Germany

Received July 18, 2012; Accepted August 22, 2012

DOI: 10.3892/br.2012.45

**Abstract.** Circulating tumour cells were detected and quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR) in peripheral blood, based on the fact that the expression of certain genes is upregulated in tumour tissues in comparison to surrounding blood cells. Calibration curves showing gene expression as functions of the number of tumour cells within a blood sample were prepared. Blood samples were therefore spiked with cells of breast cancer cell lines, RNA was extracted, transcribed to complementary DNA (cDNA) and used in real-time PCR reaction on the Cytokeratins (CK) 8, 18 and 19. Calibration curves were generated by Microsoft™ Excel®. Relative quantification curves of gene expression in different breast cancer cell lines showed no unitary tendencies. The oscillations in the relative quantification curves of gene expression suggested an occurrence of immunological effects, leading to an apparent agglutination of added tumour cells together with the blood cells of the sample. Thus, strategies to obtain evaluable results should be considered.

### Introduction

Breast cancer constitutes 28% of the cancer incidents worldwide and is thereby the most frequently occurring cancer and the most frequent cause of mortality in women. Lethality, which has fortunately been regressive since the 1970s, remains at 30% over the stages of breast cancer on average.

The main reason for breast cancer-associated mortality is the formation of remote metastases by the primary tumour. Current models assume that cells, dissolving from the primary tumour, migrate to other organs and bone marrow, where

they settle down, forming the core for remote metastases (1). The occurrence of these so-called 'circulating tumour cells' (CTCs) in peripheral blood and disseminated tumour cells (DTCs) in bone marrow of patients with epithelial tumours has already been found in numerous studies (1-3). A number of these studies demonstrated that the occurrence of CTCs in blood is linked to a worse prognosis for overall survival in comparison to patients without CTCs (4,5). Several trials have been made to detect CTCs in the peripheral blood of patients. Various methods of analysis are used in laboratories working on this topic, rendering a comparison difficult.

Changes in gene expression levels are important features of tumour cells (6), whereas most genes, regulating the cell cycle control and thereby cell proliferation, are altered, often leading to an increase in cell proliferation. For example, microarray analyses have been carried out to identify genes with changes in expression levels in healthy and breast cancer tissues (7,8). Differences in the expression rates of certain genes are known to have the potential to facilitate a statement on the prognosis of a cancer disease and the opportunity to improve medical treatment (9,10). Such changes in gene expression may also be used for diagnostic purposes. Measurement of gene expression can be performed using polymerase chain reaction (PCR)-based methods, especially real-time PCR. By this method an increase of DNA molecules during PCR reaction is measured by fluorescent reporter molecules such as SYBR-Green. This substance is incorporated in DNA molecules during the reaction (11). If the RNA-depending cDNA-amount of a gene at the beginning of a reaction is high, then the increase in DNA molecules during the reaction is likely to be higher, meaning that a high fluorescence level for the analysed gene at the end of the PCR is evident and can be detected. The DNA-amount at the beginning of a reaction depends on the complementary DNA (cDNA), which is received from isolated mRNA as a result of reverse transcription reaction. The mRNA in turn is isolated from a tissue or cell pellet that is to be analysed.

TaqMan real-time PCR, invented by the Cetus Corporation (Berkeley, CA, USA) in 1991, is one of the most sensitive PCR methods currently available. An additional gene-specific PCR-reagent is coupled to a reporter and a quencher molecule. The quencher represses the fluorescence of the reporter provided they are in close proximity (12). During PCR-reaction, the reporter and quencher are separated by the

---

*Correspondence to:* Professor Udo Jeschke, Ludwig-Maximilians University of Munich, Department of Obstetrics and Gynaecology, Maistrasse 11, D-80337 Munich, Germany  
E-mail: udo.jeschke@med.uni-muenchen.de

*Key words:* circulating tumour cells, detection, quantification, mRNA, real-time polymerase chain reaction, breast cancer



5'-3' exonuclease activity of the polymerase, while a marked increase was detected in the fluorescence signal.

The first step towards a real-time PCR-based quantitative cancer diagnosis is to create calibration curves for the used genes to evaluate the number of cancer cells exhibited at a certain level of gene expression in blood or bone marrow samples.

Therefore, in the present study, blood samples of healthy donors were spiked with determined numbers of breast cancer cell line cells, and treated in the same manner as patient samples (see Materials and methods). Real-time PCR was employed with the Cytokeratin genes (CK) 8, 18 and 19. These genes are also used in the immunohistochemical detection of cancer cells [alkaline phosphatase-anti alkaline phosphatase (APAAP-staining; 13,14)] from bone marrow, and are established markers for epithelial cells in contrast to blood cells.

## Materials and methods

**Cell culture.** The epithelial breast cancer cell lines used for the experiments were Cama-1, MCF-7, MDA-MB231, derived from mammary gland adenocarcinoma and ZR-75-1, derived from ductal carcinoma. Cells were cultured routinely, according to international standards. After being detached, the cells were counted in a haemocytometer and diluted to adequate concentrations with phosphate-buffered saline (PBS; Biochrome Ltd., Cambridge, UK). Cells were then added to the blood samples taken from healthy donors. Two different experiments were carried out: in the first part, blood samples were spiked with 0, 10, 100 and 1000 cells from the above-mentioned breast cancer cell lines, while in the second part 0, 10, 100, 1000, 10000 and 100000 MCF-7 cells were added per ml of a blood sample.

**Treatment of blood samples.** A blood sample (7.5 ml) was collected from a healthy donor in EDTA-tubes to prevent coagulation. The respective number of cell line cells was added to the blood, and the samples were diluted with PBS up to 20 ml. For density gradient centrifugation, the samples were carefully layered onto 20 ml of Histopaque® 1077 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and centrifuged for 30 min at 400 g. Following centrifugation the buffy coat was aspirated in each case and transferred into new tubes. Two washing steps were carried out using PBS (10 min, 250 g, 4°C). The resulting cell pellets were then air dried and frozen at -80°C.

**RNA isolation.** To extract RNA, the cell pellets were defrosted and resuspended in 1 ml TRIzol® LS Reagent (Invitrogen Life Technologies) and 0.2 ml chloroform was added. The solution was vortexed vigorously. Following a centrifugation step at 12000 x g for 15 min at 4°C the resulting supernatant was aspirated and transferred into a fresh tube, prepared with 500 µl cooled isopropanol and 2.5 µl glycogen (Invitrogen Life Technologies). The samples were slightly vortexed and stored frozen at -20°C overnight. The following day the samples were centrifuged at 12000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was removed and pellets were washed with 1 ml 75% ethanol and centrifuged at 12000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was removed again and pellets were air-dried and resuspended in 20 µl diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. RNA concentrations and ratios were measured photometrically

by a NanoPhotometer® (Implen GmbH, Munich, Germany). Special attention was paid to high-quality templates as only high-quality RNAs were used with absorbance ratios of 260/280 nm between 1.7 and 1.9.

**Reverse transcription.** The reverse transcription from RNA to cDNA was carried out using the SuperScript® III First Strand Synthesis Supermix kit (Invitrogen Life Technologies). Therefore, 4 µg of RNA, in a maximum volume of 6 µl, 1 µl Oligo(dT)-primers and 1 µl annealing buffer were added to the samples. The preparations were incubated at 65°C for 5 min, and immediately chilled on ice for at least 5 min. First strand reaction mix (10µl) and SuperScript® III/RNase Out™ enzyme mix (2 µl) (Invitrogen Life Technologies) were immediately added. The samples were incubated at 50°C for 50 min. To inactivate the enzyme reverse transcriptase after completing the reaction, the samples were denatured at 85°C for 5 min and stored at -20°C until use.

**Real-time PCR.** For each real-time PCR reaction, 2 µl cDNA were used together with 1 µl of gene-specific TaqMan primers (CK8, 18 and 19), 10 µl TaqMan Fast Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 7 µl PCR-water. The 96-well plates were run on a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). A denaturation step of cDNA at 95°C for 20 sec was initially administered, followed by 40 cycles at 95°C for 3 sec and 60°C for 30 sec. Subsequent to each PCR cycle the fluorescence intensity was measured by the system and recorded by the corresponding software [Sequence Detection System® (SDS) Version 1.3.1; Applied Biosystems]. 18S was used in the experiments as an internal reference control for the PCR reaction (15). The primers (Applied Biosystems) used for the experiments were CK8, Hs\_02339472\_g1; CK18, Hs\_01920599\_gH; CK19, Hs\_00761767\_s1 and 18S, Hs\_03928990\_g1. For each gene and cell amount added to a blood sample, eight reactions were run in the PCR and the means were used for evaluation.

**Evaluation of results.** Ct-, ΔCt- and ΔΔCt-values were calculated by the SDS-software (Applied Biosystems), and the threshold was set automatically, 18S was used as a calibrator sample. The generated files were exported to Microsoft™ Excel® and the additional graphs were added in.

## Results

**The curves of relative quantification of gene expression did not show consistent tendencies.** In the first part of the experiment, in which blood samples were spiked with 0, 10, 100 and 1000 cells of various breast cancer cell lines (Cama-1, MDA-MB231, MCF-7 and ZR-75-1), the relative quantification curves for each cell line were similar for CK18 and 19. With the exception of Cama-1, a decrease was detected for the cell lines between the values of 10 and 1000 cells added (Fig. 1A and B).

The strongest decrease was observed for MDA-MB-231. In this cell line, the curve of relative quantification of gene expression was already on the decrease between 10 and 100 cells added and was, notably, not increasing for 1000 cells added to the blood sample. A slight decrease was detected



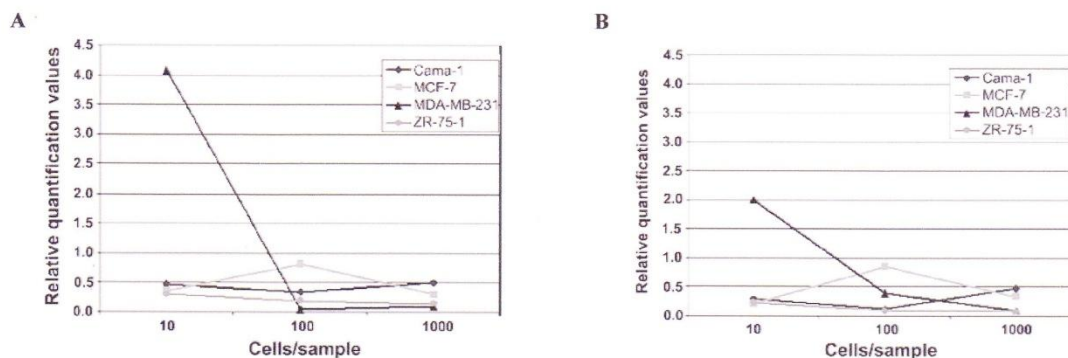


Figure 1. Relative quantification of (A) CK18 and (B) CK19 in the breast cancer cell lines Cama-1, MDA-MB-231, MCF-7 and ZR-75-1.

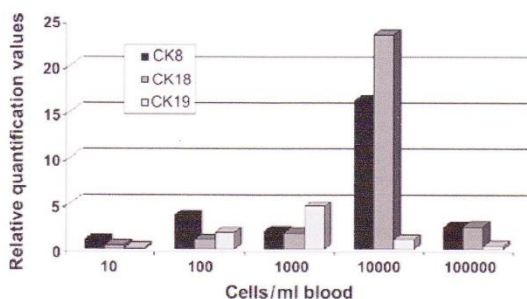


Figure 2. Calibration graph indicating relative quantification of CK8, 18 and 19 in MCF-7 cells is shown.

between 10 and 100 cells per blood sample for the ZR-75-1 sample that was maintained until 1000 cells. The MCF-7-cells showed an increase in the relative quantification values between 10 and 100 cells, although the curves again showed a decrease towards the 1000 cell sample. In the Cama-1 sample, a slight decrease was detected, from 10 to 100 cells. However, an increase was observed from 100 to 1000 cells of the added cell line.

In the second part of the experiment MCF-7 cells were spiked per ml blood sample in steps of 0, 10, 100, 1000, 10000 and 100000 cells (Fig. 2). The relative quantification values of gene expression for CK8, 18 and 19 were measured. The values for CK8 showed an increase until the 100 MCF-7 cell sample. A decrease of the value in the 1000-cell sample was observed, whereas for the 10000-cell sample a strong increase of relative quantification was measured. For the 100000 cells/ml blood sample, the curve for CK8 was almost on the decrease again to the value of the 1000-cell sample. For CK18 a slight but steady increase was observed, until the cell number of 1000 cells was added. A strong increase occurred again between 1000 and 10000 cells. The value for 100000 cells being added to the sample was on the decrease as observed for CK8. The relative quantification curve for CK19 appeared markedly different compared to the curves for CK8 and 18. Thus, there was only a slight increase in gene expression values until 1000 cells/ml were added and then a

reduction was detected to levels lower than those found for CK8 and CK18.

### Discussion

The best cell line for generating calibration curves for real-time PCR experiments with CK was Cama-1 of the first part of the experiment. Only for this cell line the expected increase in relative quantification of gene expression was seen for the numbers of added cells. ZR-75-1 relative quantification levels were rather low, showing no considerable changes at increasing numbers of cancer cells added. By contrast, MDA-MB-231 showed a marked decrease in the curves between 10 and 100 tumour cells added for CK18, as well as for CK19. This may be due to immunological effects, leading to an apparent agglutination of cancer cell line cells with common blood cells. Similar effects are likely to be the reason for the graph progression of the MCF-7-spiked blood samples. Of note, in the MCF-7 samples an initial increase occurred, however, values of relative quantification showed a decrease for higher numbers of cancer cells added to the blood sample. This finding might also indicate that certain immunological effects between common blood cells and added artificial tumour cells are dependent on cell concentration. Thus, the higher the added cell concentration, the more agglutinative effects occur, altering the results of the PCR.

The second experiment showed rather different tendencies in comparison to the first one (Fig. 2). In this trial, only MCF-7 cells were used for spiking and for the generation of the graphs, for CK8 as well as for CK18 and 19, and showed an increase in relative quantification levels until 100 cells added per ml blood sample and a decrease from the highest cell number used (100000 cell line cells added). For CK8, the sample with 1000 cells per ml added showed an unexpectedly lower value. However, for 10000 cells, the relative quantification value was again elevated. CK18 showed a steady increase of relative quantification values when more cancer cells are added to the sample (until 10000 cells) with the strongest increase being measured between 1000 and 10000 cells. For CK19, an increase in relative quantification values was detected until 1000 cells, followed by a steady decrease. These results seem to confirm the suggestion that

immunological reactions occur between MCF-7 and common blood cells, rendering MCF-7 cells alone inappropriate for the generation of calibration curves. However, using different artificial breast cancer cell lines may be the key for generating calibration curves, as CTCs are regarded to be of different origins and therefore show histological distinctions. Another aspect that may be relevant is that better results are potentially obtained when tumour cells are added following enrichment of cells by density gradient centrifugation, shortly before the RNA extraction process is started. Fewer cells are likely to be lost during the centrifugation and washing steps and more precise calibration curves could be generated. Adding the cancer cell line cells per ml of a blood sample used is also important, otherwise real-time PCR detection limits may be undercut (16).

## References

1. Pantel K and Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4: 448-456, 2004.
2. Ring A, Smith IE and Dowsett M: Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 5: 79-88, 2004.
3. Smerage JB and Hayes DF: The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 94: 8-12, 2006.
4. Braun S, Pantel K, Muller P, *et al*: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342: 525-533, 2000.
5. Braun S, Vogl FD, Naume B, *et al*: A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353: 793-802, 2005.
6. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, *et al*: Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272, 1997.
7. Frasar J, Danes JM, Komm B, *et al*: Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144: 4562-4574, 2004.
8. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, *et al*: Gene expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344: 539-548, 2001.
9. Urban P, Vuaroqueaux V, Labuhn M, *et al*: Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in ErbB2-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 24: 4245-4253, 2006.
10. Taylor KJ, Sims AH, Liang L, *et al*: Dynamic changes in gene expression in vivo predict prognosis of tamoxifen-treated patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 12: R39, 2010.
11. Devlin TM: Regulation of gene expression. In: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. John Wiley & Sons; 7th edition, pp257, 2010.
12. Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276-7280, 1991.
13. Kurec AS, Baltrucki L, Mason DY and Davey FR: Use of the APAAP method in the classification and diagnosis of hematologic disorders. *Clin Lab Med* 8: 223-236, 1988.
14. Noack F, Schmitt M, Bauer J, *et al*: A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications. *Int J Biol Markers* 15: 100-104, 2000.
15. Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279-284, 2005.
16. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, *et al*: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12: 475-482, 1994.

### **3.2. Publikation 2: Anticancer Research**

„Quantification of Breast Cancer Cells in Peripheral Blood Samples by Real-Time RT-PCR“

Submitted: September 14, 2012

Accepted: October 19, 2012

Published Online: December, 2012



## Quantification of Breast Cancer Cells in Peripheral Blood Samples by Real-Time RT-PCR

MICHAEL ZEBISCH<sup>1</sup>, ALEXANDRA C. KÖLBL<sup>1</sup>, CHRISTIAN SCHINDLBECK<sup>2</sup>,  
JULIA NEUGEBAUER<sup>1</sup>, SABINE HEUBLEIN<sup>1</sup>, MATTHIAS ILMER<sup>3</sup>, BRIGITTE RACK<sup>1</sup>,  
KLAUS FRIESE<sup>1</sup>, UDO JESCHKE<sup>1</sup> and ULRICH ANDERGASSEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Ludwig Maximilians University of Munich, Munich, Germany;

<sup>2</sup>Clinic Traunstein, Traunstein, Germany;

<sup>3</sup>Department of Molecular Pathology, University of Texas, Houston, TX, U.S.A.;

**Abstract.** *Background:* Circulating tumour cells (CTCs) are cells that have detached from a primary tumour, circulate in the peripheral blood, and are considered to be the main root of distant metastases. We present a method for the detection of CTCs by real-time PCR on different cytokeratin markers. *Materials and Methods:* Blood samples of a healthy donor were mixed with specific numbers of cells from different breast carcinoma cell line cells. RNA was isolated from the samples and transcribed into cDNA. TaqMan real-time PCR for cytokeratins 8, 18 and 19 was carried out and was correlated to that of 18S. *Results:* Cytokeratin gene expression increased in all samples, when as few as 10 tumour cells were added. In the CAMA-1 cell line, the increase was even greater the more cells were added. *Conclusion:* By this methodology, cells from mammary carcinoma cell lines can be detected in blood samples. Its benefit will be validated in samples from patients with breast cancer.

As early as 1869, cells with the morphology of cancer cells had been found by Thomas Ashworth in the blood of a person who died from metastatic cancer (1). Even then he presumed that these cells, today known as circulating tumour cells (CTCs), could play a role in the development of distant metastases. Nowadays, a huge body of literature describes CTCs as cells that, after detaching from the primary tumour and circulating through the blood or lymphatic system, are the main cause of the occurrence of metastases in patients

with epithelial cancer (2-4). Numerous studies suggest that detection of CTCs in the blood or disseminated tumour cells (DTCs) in the bone marrow of patients with cancer is linked to poor outcomes of the disease and reduced treatment efficiency (5, 6). There are several different methods for the detection of DTCs and CTCs from bone marrow or blood (7-9). However, withdrawal of bone marrow is a physically painful and exhausting procedure for the patient. The easier access for multiple sampling from peripheral blood makes it the method of choice. Therefore efforts should be made to improve detection efficiencies from these samples. This can be achieved either by cytometric techniques or by nucleic acid-based methods (3). Currently, only one methodology for the discovery and enumeration of CTCs is approved, at least for the metastatic setting by the US Food and Drug Administration (FDA), namely the so-called Cell Search® System (10). This method is based on the immunomagnetic enrichment of CTCs from patient's blood samples, with subsequent staining of these cells. Using this technique, it has been shown that the existence of CTCs is a prognostic factor for overall survival in patients with epithelial cancer types, such as breast, colon or prostate cancer (11-15). In this study, we present a novel nucleic acid-based method for the detection and possible quantification of CTCs utilizing quantitative TaqMan real time PCR. We focused on validating this method in a model system, since this is a necessary step before starting to analyze patient samples. In this regard, we used blood samples from a healthy donor mixed with different numbers of established breast cancer cells (CAMA-1, MCF7, ZR-75-1) and carried out subsequent gene expression analysis for cytokeratins 8, 18 and 19. We selected these three markers in particular, because they are used for histochemical detection of CTCs in so-called APAAP staining (16, 17). The cytokeratin family members are characteristic epithelial cell markers and only weakly expressed in blood cells, rendering them potentially useful for PCR-based detection of CTCs.

*Correspondence to:* Professor Dr. Udo Jeschke, Department of Obstetrics and Gynaecology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Maistrasse 11, D-80337 Munich, Germany. Tel: +49 08951604266, Fax: +49 08951604916, e-mail: udo.jeschke@med.uni-muenchen.de

*Key Words:* Breast carcinoma, CTC, cytokeratin, MCF7, ZR-75-1 cells.



## Materials and Methods

**Cells.** Breast cancer cell lines CAMA-1 (ATCC: HTB-21; mammary gland adenocarcinoma), MCF7 (ATCC: 57136; mammary gland adenocarcinoma) and ZR-75-1 (ATCC: CRL-1500; ductal carcinoma) were used (ATCC, Wesel, Germany). Cell culture was carried out according to international standards, with cells routinely cultivated at sub-confluent states and with re-feeding twice a week. To determine cell numbers, cells were detached, counted in a haemocytometer and diluted with phosphate buffered saline (PBS; Biochrom, Berlin) to the numbers needed.

**Blood samples.** A healthy individual volunteered to donate 20 ml of blood that was collected into EDTA tubes to prevent coagulation. To remove erythrocytes from the whole blood, Histopaque 1077 (Invitrogen, Darmstadt, Germany) density gradient cell separation was used. Briefly, whole-blood diluted with PBS (1:1) was carefully layered onto histopaque. After a centrifugation step (30 min at 400 ×g) the buffy coat was transferred into a fresh tube. White blood cells were washed twice with PBS and subsequently spun down (10 min at 250 ×g and 4°C). Afterwards, cells were counted and 0, 10, 100, 1,000, 10,000 and 100,000 cells (for CAMA-1, MCF7 or ZR-75-1-alone, and for a mixture of all three cell lines) were added to 1 ml of blood (about 1×10<sup>6</sup> red blood cells). The cells were then centrifuged, the supernatant was removed and cell pellets were frozen at -80°C.

**RNA isolation.** To extract RNA, frozen cell pellets were thawed and resuspended in 1 ml of Trizol (Invitrogen, Darmstadt, Germany). After complete resuspension, 0.2 ml chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) was added and the solution was vigorously vortexed. After a centrifugation step (15 min at 12,000 ×g at 4°C), the supernatant was transferred into a fresh tube and mixed with 1 ml isopropanol (Merck). The samples were frozen overnight at -20°C. On the following day, samples were centrifuged again (at 12,000 ×g at 4°C for 10 min), the supernatant was removed and RNA pellets were washed twice with 75% ethanol (Merck). Pellets were then air-dried and resuspended in 20 µl DEPC-treated water. The RNA concentration and ratio were measured photometrically (Nanophotometer™, Implen, Munich, Germany) and only high-quality RNA (absorbance ratio A260/280 between 1.7 and 1.9 guaranteed a high purity of nucleic acids) was used.

**Reverse transcription.** Four micrograms of RNA in a maximal volume of 6 µl was used for reverse transcription with SuperScript III First Strand Synthesis Super Mix-Kit (Invitrogen). One microliter of provided oligo(dT)-primers and 1 µl annealing buffer was added according to the manufacturer's protocol. Samples were then incubated at 65°C for 5 min, chilled on ice and 10 µl First-Strand Reaction Mix and 2 µl SuperScript III/RNase Out Enzyme Mix were added before incubation at 50°C for 50 min. Reverse transcriptase was denatured at 85°C for 5 min and samples kept at -20°C until use.

**Real-time PCR.** First a Mastermix for the target genes (cytokeratins 8, 18 and 19) and reference gene (18S) was prepared. For one reaction, 10 µl TaqMan® Fast Universal PCR Mastermix (ABI, Foster City, CA, USA) was mixed with 1 µl TaqMan primer (ABI; CK8: Hs02339472\_g1; CK18: Hs01920599\_gH; CK19: Hs00761767\_g1; 18S: Hs03928990\_g1) for the respective gene and 7 µl PCR water. cDNA (2 µl) and 18 µl of the Mastermix were placed

into one well of a 96-well plate (Micro Amp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode; ABI). Each reaction was carried out in quadruplicate. The plate was then sealed with an adhesive cover (ABI) and placed into a 7500 Fast Real-Time PCR system (ABI). To guarantee adequate controls, 18S was used as the reference gene and non-template as well as water-RT controls were implemented. The following cycles were run: Initial denaturation (95°C for 20 s), followed by 40 cycles with denaturation (3 s at 95°C) and primer extension (30 s at 60°C). Fluorescence for each gene was displayed by the SDS 1.3.1 software (ABI).

**Evaluation.** Files generated by the SDS Software (CT, ΔCT, ΔΔCT and Rq values) were exported to Microsoft® Excel™, and graphs and relative quantification curves (RQC) were drawn. Calculation of relative quantifications values is described in Livak *et al.* 2001 (18). In brief: Average CT value of a gene of interest is related to the 18S average CT value of the same sample. The resulting value is called ΔCT value. In the next step this ΔCT value is set in reference to the ΔCT value of the same gene in the reference sample (here: 0 cells added to blood sample), rendering the so called ΔΔCT value. The formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  is then used to calculate relative quantification (Rq) values. Rq values >1 show an upregulation of the gene of interest, values <1 mean that the gene is downregulated. Statistical evaluations were made by SPSS® V.20 (IBM®, Ehningen, Germany).

## Results

CAMA-1 exhibited relative quantification curves with steady increases of all genes evaluated in a cell number-dependent manner (Figure 1), meaning that, the observed increase in gene expression, is due to the higher number of cells, which express these genes. *CK8*, *CK18* and *CK19* were found to be promising target genes regarding their use as genes for RT-PCR-based detection of CTCs. In detail, CK8 gene expression increased drastically when 1000 or more cancer cells were mixed into the blood sample. CK18 increased in a similar way. However, the RQC for CK18 increased dramatically from 1000 CAMA-1 cells on. The RQC for CK19 follows a different trend: Although an increase in RQ values can be seen for the 10-cell sample (Figure 2), further CK19 expression changed only marginally (Figure 1). Using MCF7 and ZR-75-1 cells, a strong increase of RQ values for all three cytokeratins can be seen comparing control (0 cells) and samples spiked with 10 breast cancer cells (Figures 3 and 4). Further trends for MCF7 and ZR-75-1 spiked samples showed no consistent tendencies. The closest model to the *in vivo* situation seems to be best resembled by using a heterogenous cell pool *in vitro*. We tried to mimic this condition by blending the described cell lines in equal parts and mix the same cell numbers into blood samples. This rendered an RQC with a similar pattern to that for CAMA-1 cells, showing an increase in the expression of all three cytokeratin genes starting with 10 cells (Figure 5). Assuming that only small numbers of cells might be found in the pathological situation of breast cancer, the primary focus of our statistical evaluation was on this range. Between all used

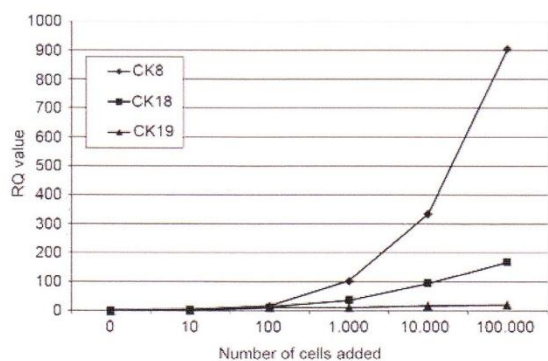


Figure 1. Relative quantification (RQ) curves for cytokeratins 8, 18 and 19 in CAMA-1 cells. Quantification was relative to that of 18S.

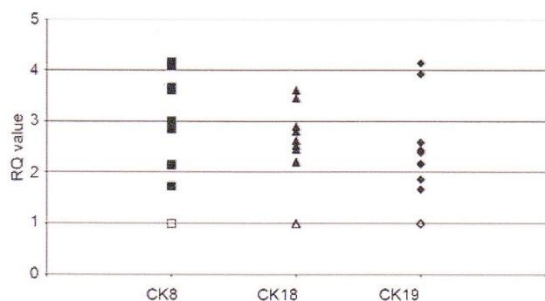


Figure 2. Comparison of relative quantification (RQ) values of control samples (open symbols) vs. samples spiked with 10 CAMA-1 cells/ $1 \times 10^6$  blood cells (closed symbols).

single cell lines (CAMA-1, MCF7, ZR-75-1), as well as the cell pool consisting of these cell lines in equal proportions, differences in RQs were statistically significant at  $p$ -values between 0.011 and 0.012 for the comparison of non-spiked blood samples (negative control sample) versus blood samples spiked with 10 cells (Table I).

## Discussion

It is generally assumed that the numbers of CTCs in patient blood samples are very small and it is therefore a challenge to detect them (19). For this reason, PCR markers being used to generate calibration curves to detect CTCs have to be as accurate as possible. Out of the three markers investigated in the present study, CK8 and 18 seem to display the required characteristics, especially when a heterogeneous mixture of three established cell lines was used. As few as 10 cancer cells, the first evaluation point in this study, provoked an increase in gene expression recorded in RQCs. This leads to

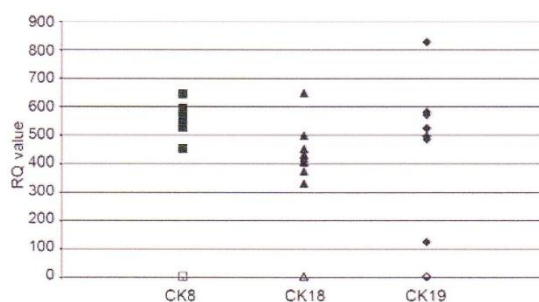


Figure 3. Comparison of relative quantification (RQ) values of control samples (open symbols) vs. samples spiked with 10 MCF-7 cells/ $1 \times 10^6$  blood cells (closed symbols).

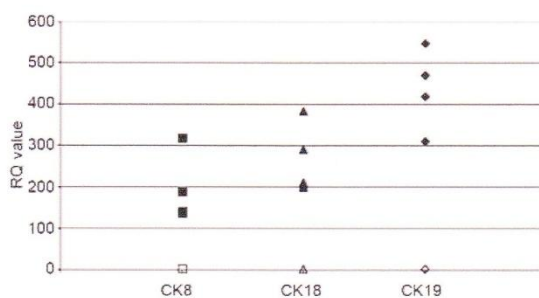


Figure 4. Comparison of relative quantification (RQ) values of control samples (open symbols) vs. samples spiked with 10 ZR-75-1 cells/ $1 \times 10^6$  blood cells (closed symbols).

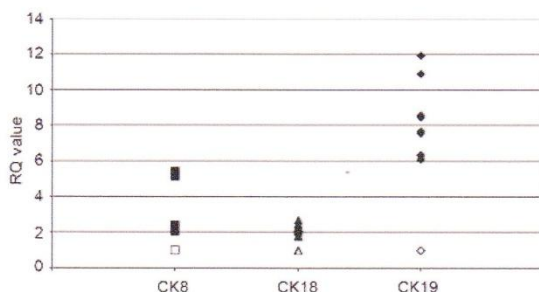


Figure 5. Comparison of relative quantification (RQ) values of control samples (open symbols) vs. samples spiked with 10 cells of a mixture of the used cancer cell lines/ $1 \times 10^6$  blood cells (closed symbols).

the assumption that a very low frequency of cells in the peripheral blood, in comparison to the large number of blood cells might be detectable by the presented methodology. This is confirmed by our statistical evaluation showing statistical



Table I. Statistical significance of differences between relative quantification values for non-spiked and spiked (10 cells) samples. *t*-test was used for statistical analysis.

Sample and cytokeratin (nonspiked vs. spiked)	<i>p</i> -Value
Cell pool CK 8	0.011
CAMA-1 CK 8	0.012
MCF7 CK 8	0.012
ZR-75-1 CK 8	0.011
Cell pool CK 18	0.011
CAMA-1 CK 18	0.012
MCF7 CK 18	0.012
ZR-75-1 CK 18	0.011
Cell pool CK 19	0.011
CAMA-1 CK 19	0.012
MCF7 CK 19	0.012
ZR-75-1 CK 19	0.011

significances between the negative controls and the samples spiked with 10 cells per millilitre of blood, containing between  $1.0-1.3 \times 10^6$  surrounding blood cells in all used cell lines and the cell pool. Furthermore, the use of a single cell line seems to be inappropriate for generating a detection model as no constant increase over all samples is displayed for MCF7 and ZR-75-1 cells. This could be due to immunological effects, leading to an agglutination of cancer cells with normal blood cells taking place when high cell numbers are used for spiking. In this study, background variability of the blood sample can be virtually neglected as we only used blood samples of one volunteer donor for all experiments. Furthermore, to ensure that all reverse transcription reactions took place under the same conditions, we performed all reactions at the same time using a standardized protocol. Moreover, sample processing procedures were carried out by the same researcher. However, potential pitfalls have to be taken into consideration. A problem that needs to be mentioned is that adding low numbers of cancer cells to blood is challenging so that probably not all blood samples contain the downright number of cells spiked-in. We tried to minimize these errors by evaluating numerous replicates.

## Conclusion

The results of the generated calibration curves for the expression of cytokeratin 8, 18 and 19 genes established in this study shall be transferred to a clinical setting on patient samples to evaluate potential benefits in terms of prediction of outcome or more specifically targeted therapy. Blood samples from patients undergoing adjuvant therapy and with metastatic breast cancer will be compared to samples from a collection of healthy donors (negative controls) by using the

same technique as described above. These gene expression levels will be matched to those from the calibration samples with the aim of quantifying the number of CTCs in a given patient sample. As a reference, the results from the established Cell Search<sup>®</sup> System will be compared to the PCR data. Further putative CTC markers need to be taken into consideration and tested to narrow down non-specific results and increase the chance of detecting and characterizing even the smallest numbers of CTCs. The following might be useful PCR markers in this regard: HER2 (20), insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1) (21), matrix metalloprotease 13 (MMP13)(22-26), ubiquitin-conjugating enzyme family 2Q2 (UBE2Q2) (27), Nectin-4 (28) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) (29).

## Acknowledgements

This work was supported by a postdoctoral stipend to M. I. provided by the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).

## References

- Ashworth TR: A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Medical Journal* 14: 146-147, 1869.
- Pantel K and Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4(6): 448-456, 2004.
- Ring A, Smith IE and Dowsett M: Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 5(2): 79-88, 2004.
- Smerage JB and Hayes DF: The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 94(1): 8-12, 2006.
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G and Schlimok G: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342(8): 525-533, 2000.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A and Pantel K: A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353(8): 793-802, 2005.
- Franklin WA, Shpall EJ, Archer P, Johnston CS, Garza-Williams S, Hami L, Bitter MA, Bast RC and Jones RB: Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support. *Breast Cancer Res Treat* 41(1): 1-13, 1996.
- Simpson SJ, Vachula M, Kennedy MJ, Kaizer H, Coon JS, Ghalie R, Williams S and Van Epps D: Detection of tumor cells in the bone marrow, peripheral blood, and apheresis products of breast cancer patients using flow cytometry. *Exp Hematol* 23(10): 1062-1068, 1995.
- Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF and Coombes RC: The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *Br J Cancer* 42(3): 392-398, 1980.
- LLC V. veridex Cell Search Web Site. 2010.

- 11 Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW and Terstappen LW: Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10(20): 6897-6904, 2004.
- 12 Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW and Hayes DF: Circulating tumor cells *versus* imaging – predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 12(21): 6403-6409, 2006.
- 13 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW and Hayes DF: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351(8): 781-791, 2004.
- 14 de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ and Raghavan D: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14(19): 6302-6309, 2008.
- 15 Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M and Pantel K: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13(3): 920-928, 2007.
- 16 Kurec AS, Baltrucki L, Mason DY and Davey FR: Use of the APAAP method in the classification and diagnosis of hematologic disorders. *Clin Lab Med* 8(1): 223-236, 1988.
- 17 Noack F, Schmitt M, Bauer J, Helmecke D, Kruger W, Thorban S, Sandherr M, Kuhn W, Graeff H and Harbeck N: A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications. *Int J Biol Markers* 15(1): 100-104, 2000.
- 18 Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408, 2001.
- 19 Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 5(8): 1950-1960, 1999.
- 20 Hayes DF, Walker TM, Singh B, Vitetta ES, Uhr JW, Gross S, Rao C, Doyle GV and Terstappen LW: Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol* 21(5): 1111-1117, 2002.
- 21 de Bono JS, Attard G, Adjei A, Pollak MN, Fong PC, Haluska P, Roberts L, Melvin C, Repollet M, Chianese D, Connely M, Terstappen LW and Gualberto A: Potential applications for circulating tumor cells expressing the insulin-like growth factor-I receptor. *Clin Cancer Res* 13(12): 3611-3616, 2007.
- 22 Balbin M, Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Freije JP and Lopez-Otin C: Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* 107(1): 45-53, 1999.
- 23 Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, Hou MF, Hsueh EJ and Lin SR: MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncol Rep* 22(5): 1119-1127, 2009.
- 24 Laffleur MA, Drew AF, de Sousa EL, Blick T, Bills M, Walker EC, Williams ED, Waltham M and Thompson EW: Up-regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13. *Int J Cancer* 114(4): 544-554, 2005.
- 25 Selvamurugan N and Partridge NC: Constitutive expression and regulation of collagenase-3 in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3(4): 218-223, 2000.
- 26 Uria JA, Stahle-Backdahl M, Seiki M, Fueyo A and Lopez-Otin C: Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 57(21): 4882-4888, 1997.
- 27 Nikseresht M, Seghatoleslam A, Monabati A, Talei A, Ghalati FB and Owji AA: Overexpression of the novel human gene, UBE2Q2, in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 197(2): 101-106, 2010.
- 28 Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Goncalves A, Dubreuil P and Lopez M: Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280(20): 19543-19550, 2005.
- 29 Dontu G: Breast cancer stem cell markers – the rocky road to clinical applications. *Breast Cancer Res* 10(5): 110, 2008.

Received September 14, 2012

Revised October 18, 2012

Accepted October 19, 2012

### **3.3. Publikation 3: Future Oncology**

„Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen-Friedenreich antigen“

Submitted: August 01, 2012

Accepted: December 30, 2012

Published Online: May, 2013



For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen–Friedenreich antigen

Ulrich Andergassen<sup>1</sup>, Michael Zebisch<sup>1</sup>, Alexandra C Kölbl<sup>1</sup>, Christian Schindlbeck<sup>2</sup>, Matthias Ilmer<sup>3</sup>, Stefan Hutter<sup>1</sup>, Sabine Heublein<sup>1</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>, Klaus Friese<sup>1</sup> & Udo Jeschke<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde & Geburtshilfe, Ludwig-Maximilians-Universität München – Campus Innenstadt, Maistraße 11, 80337 München, Germany

<sup>2</sup>Frauenklinik – Klinikum Traunstein, Cuno-Niggel-Straße 3, 83278 Traunstein, Germany

<sup>3</sup>Department of Molecular Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 7435 Fannin Street, Houston, TX 77054, USA

\*Author for correspondence: Tel.: +49 89 5160 4240 • Fax: +49 89 5160 4916

• [udo.jeschke@med.uni-muenchen.de](mailto:udo.jeschke@med.uni-muenchen.de)

**Aim:** Disseminated tumor cells are found in the bone marrow of patients with epithelial carcinoma and are correlated with a poor prognosis of the disease. Their detection is a technical challenge. This report describes a model system for the detection of cancer cells by co-immunostaining of Thomsen–Friedenreich and Her-2 antigens. **Methods & results:** Small numbers of cancer cells from different cancer cell lines were mixed with blood samples of healthy donors. Cytospins were prepared and double immunostaining against Thomsen–Friedenreich antigen and Her-2 was carried out by fluorochrome-coupled antibodies. Quantification of Thomsen–Friedenreich and/or Her-2-positive cells was performed with an epifluorescence microscope. On average, 83% of cancer cells were recovered by this method. **Conclusion:** Immunostaining is a useful method for the detection of cancer cells in blood samples. Results of this model system will be transferred to bone marrow patient samples to prove the benefits for detection of disseminated tumor cells.

Breast cancer is the most frequent cancer type worldwide and, at the same time, is the leading cause of cancer-related death in women. On average, one woman in eight to ten will develop breast cancer in her lifetime [1].

The main cause of death from breast cancer is remote metastases derived from cells that have spread from the primary tumor. Current models describe so-called ‘circulating tumor cells’ (CTCs), which detach from the primary tumor, travel via the bloodstream or lymphatic system, and eventually settle down at distant tissues where they form metastases [2]. In some studies, disseminated tumor cells (DTCs) have been found in the bone marrow and CTCs in the peripheral blood of patients with epithelial cancer [2–4]. The appearance of CTCs and DTCs are correlated with a poor outcome of the disease [5–7]. Currently, different techniques for the detection of CTCs and DTCs are under investigation.

The most established CTC detection methods are assays based on EpCAM detection. These include the AdnaTest® (Adnagen GmbH, Langenhagen, Germany), CTC-chip (PerkinElmer, MA, USA), MagSweeper (Jeffrey

Laboratory, Stanford, CA, USA) or the Ariol® (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) systems (for review see [8]). These systems work on the basis of bead-coupled immunomagnetic enrichment and subsequent staining of the EpCAM marker. Furthermore, diverse functional assays, such as the EPISPOT assay (RnD Systems Inc., MN, USA) and the Vita-Assay™ (Vitatex Inc., NY, USA), which detect different cell surface antigens of CTCs, are described [8].

The only US FDA-approved method for CTC detection is the Cell Search® System (Veridex LLC, NJ, USA) [10]. For DTC detection, the EPISPOT assays have been explored [9].

This study presents an immunohistochemical approach for the detection of DTCs, based on the finding that the Thomsen–Friedenreich antigen (CD176) is expressed exclusively on the surface of carcinoma cells [10–13]. Furthermore, a combined method for the detection of tumor cells in blood samples was investigated. CD176 expression was analyzed in parallel with the Her-2 antigen, which is a common prognostic factor in breast cancer [14,15]. Her-2 is already frequently used as a cancer therapy target, via monoclonal

Future Oncology  
Preliminary Communication

### Keywords

breast cancer cell CD176  
Her-2 immunostaining

Future  
Medicine  part of 

antibodies that block the Her-2 antigen on the tumor surface.

The aim of this study was the development of a new approach to detect DTCs by double immunostaining of the Thomsen–Friedenreich antigen and Her-2 in blood samples mixed with cancer cells. In the future, this technique may be a useful tool that could also be applied to patients with cancer cells in bone marrow samples. A benefit of this method is that tumor cells can not only be detected but simultaneously characterized. The future investigation of more marker antigens in combination with Thomsen–Friedenreich antigen will help to generate a marker set that can be used for one-step DTC detection and characterization. Thereby the decision for the most suitable therapy for each patient could be supported, helping to reduce side effects and increasing treatment efficiency.

## Materials & methods

### Cell lines

CAMA-1, MCF-7 and ZR-75-1 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. Cells were fed every 3–4 days and subcultured at 80% confluence. For the experiments, cells were detached by trypsin treatment, counted carefully with a hemocytometer and diluted with phosphate-buffered saline solution (PBS; Biochrom, Berlin, Germany) to the amounts needed.

### Blood samples

Five healthy volunteers agreed to donate 7.5 ml of blood, which was collected into ethylenediaminetetraacetic acid-containing tubes to prevent coagulation. To remove erythrocytes from the whole blood, the Histopaque® 1077 (Invitrogen, Darmstadt, Germany) density gradient cell separation system was used according to the manufacturer's protocol. Briefly, whole blood was carefully layered onto Histopaque. After a centrifugation step (30 min at  $400 \times g$ ) buffy coat containing white blood cells and platelets was transferred into a fresh tube. White blood cells were washed twice with PBS and subsequently spun down (10 min at  $250 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$ ). Afterwards, cells were counted and 30 cells (CAMA-1, MCF-7 or ZR-75-1 alone and a mixture of all three cell lines, respectively) were added to 1 million white blood cells. Cells centrifuged onto glass slides (cytospins) were prepared by spinning the sample on an object slide ( $500 \times g$  for 5 min). Finally, PBS was carefully removed and slides air dried overnight.

### Immunostaining

Prepared slides were fixed in acetone and air dried before blocking in a 5% bovine serum albumin solution for 15 min. Subsequently, antibodies against the Thomsen–Friedenreich antigen were applied: NEMOD-TF2 antibody (IgM- $\kappa$ , mouse; NEMOD Biotherapeutics, Berlin, Germany) diluted 1:50 in DAKO S 3022 medium for 45 min at room temperature; followed by three washing steps and incubation with Cy2-coupled goat antimouse IgM (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) diluted 1:200 in DAKO S3022 for 30 min at room temperature. After washing with PBS and a secondary blocking step with Ultra V Block (Labvision TA-060-UB, Labvision, MI, USA), antibodies against Her-2 were applied. First, the antibody against Her-2, c-erbB-2 (Neomarkers, Fremont, CA, USA). Second, the Cy3-coupled goat antimouse antibody (Jackson ImmunoResearch) were added in 1:500 and 1:200 dilutions, respectively. Incubation times were according to the first pair of antibodies. Cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole in Vectashield® mounting medium (Vectashield H-1200, Vectorlabs, Peterborough, UK), covered with cover slips and sealed with nail polish.

In order to verify this method, negative controls had to be included. Therefore, blood samples of healthy donors (negative controls) and controls consisting of cancer cell line cells only (positive controls) were stained with the same combination of antibodies. Additionally, spiked blood samples were investigated by adding only the secondary antibody in order to exclude false-positive results.

### Microscopy

Observation of slides was performed on a Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Göttingen, Germany) epifluorescence microscope equipped with an AxioCam high-resolution microscopy camera. A Ph2 plan neofluar  $40\times/0.75$  objective was used.

### Evaluation of results

Pictures were taken of representative view fields and color channels were merged by PaintShop Pro 6.00. Stained cells were manually counted; ratios and recovery rates were calculated.

In order to avoid reader bias the reading person was neither informed about the number of tumor cells spiked into the respective blood sample or about positive or a negative control samples. For further verification a second reading person repeated the evaluation.



A third independent person was responsible for gathering and evaluating the results.

### Results

Blood samples mixed with different determined numbers of established breast cancer cells ( $n = 30$  cells/slide) were spun down on coverslips and double immunostaining for the Thomsen–Friedenreich antigen (CD176) and Her-2 (CD340) was carried out. The indirect staining was completed with fluorochrome-coupled secondary antibodies to Thomsen–Friedenreich antigen (Cy2 fluorochrome in green), to Her-2 antigen with a Cy3 fluorochrome (red) and DNA counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenylindole in blue (FIGURE 1). Signal detection was carried out on a fluorescence microscope in two different ways. First, simultaneous pictures of all three color channels were taken and second, all cells stained in each channel were counted (TABLE 1).

After merging the pictures obtained in the first step, normal white blood cells stained for 4',6-diamidino-2-phenylindole only, whereas cells derived from cancer cell lines also stained in the other two color channels (FIGURE 1).

Cells that stained positive for Cy2 and Cy3 (TABLE 1) were counted and the relative frequency calculated (in percentage). Recovery rates of 76.6, 60.0 and 56.6% were found when CAMA-1, MCF-7 and ZR-75-1, respectively, were used alone. However, a proportionate mixture of all three cell

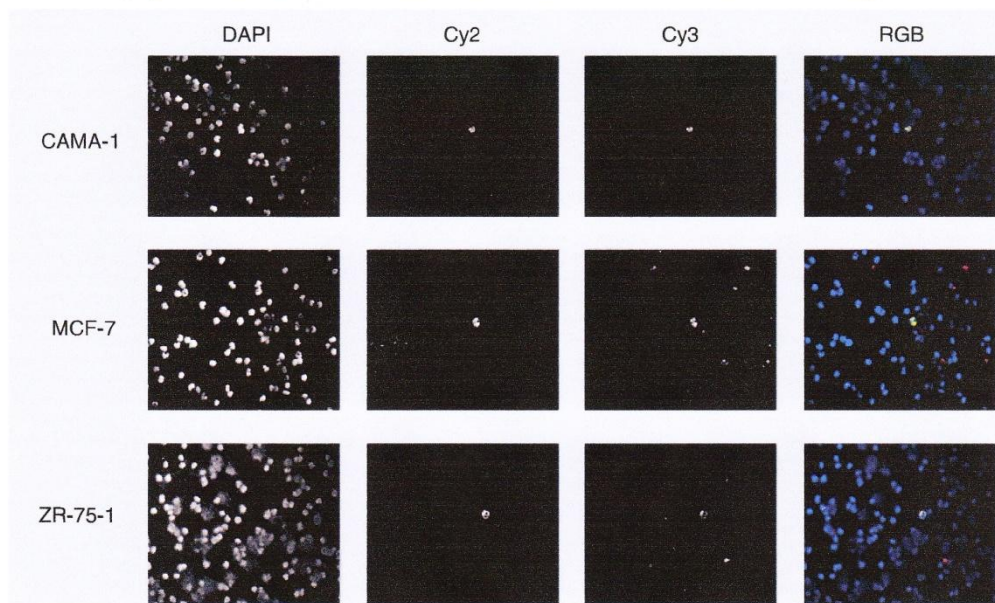
lines called 'cell mix' had a higher recovery rate of double-stained cancer cells (83.3%) compared with samples from each cancer cell line alone. In general, the Thomsen–Friedenreich antigen showed a higher recovery rate than the Her-2 antigen (except for the ZR-75-1-sample). The highest recovery rates regarding single-stained cancer cells were found for CAMA-1 and the cell mix, rendering similar results (28 Thomsen–Friedenreich -positive cells or a 93.3% recovery rate in both samples and 26 or 25 Her-2-positive cells or a 86.6 and 83.3% recovery rate). In samples with MCF-7 and ZR-75-1 cancer cells, lower recovery rates were detected for both antigens.

In control samples with no tumor cells added, no staining could be seen, while in the samples consisting only of tumor cells (positive control) nearly all cells were stained.

Another control that was carried out routinely was the costaining of the Thomsen–Friedenreich antigen or Her-2 and CD45 to ensure that only tumor cells are stained by either CD176 or Her-2. Cells stained by CD176 or Her-2 never stained with CD45, whereas the surrounding blood cells were stained with high quantities of CD45. Therefore, it can be concluded that the staining of CD176 and Her-2 is tumor cell specific.

### Discussion

Recent reports have shown that the expression of the Thomsen–Friedenreich antigen (CD176)



**Figure 1. Double immunofluorescence staining of CAMA-1, MCF-7 and ZR-75-1 cells.** DAPI is used as a reference stain of cell nuclei; Cy2 staining is used for the Thomsen–Friedenreich antigen; and Cy3 for the Her-2 antigen. A merged (RGB) image of all color channels is also given. Only double-stained cells are shown. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.



Table 1. Frequency of detection of cancer cells in blood samples.

Antigen	CAMA-1; n (%)	MCF-7; n (%)	ZR-75-1; n (%)	Cell mix; n (%)
Thomsen–Friedenreich (CD176)	28 (93.8)	21 (70)	22 (73.3)	28 (93.3)
Her-2 (CD340)	26 (86.6)	18 (60.0)	23 (76.6)	25 (83.3)
Thomsen–Friedenreich/Her-2	23 (76.6)	18 (60.0)	17 (56.6)	25 (83.3)

30 cells were spiked per sample.

and Her-2 is characteristic for DTCs, especially in breast cancer patients [11,14–16].

Based on this background, our aim was to establish an immunofluorescent approach to identify breast cancer tumor cells in blood samples. For this purpose, different established breast cancer cell line cells were mingled with blood samples and subsequent immunofluorescent stainings were carried out. With the help of this method, between 56.6 and 83.3% of the tumor cells could be detected by double staining and epifluorescence microscopy, whereas CD176-positive (single staining) cases could be found in 93.3%. A reason for this result may, in fact, be that not all cancer cell lines used are positive for Her-2 overexpression, for instance, MCF-7. These recovery rates assign a performance to the method presented here, which is in the range of other methods used in this field, for example, the CTC-chip method has recovery rates of approximately 70–80% [17], the MagSweeper assay system has recovery rates of approximately 80% [18] and the EPISPOT assay has recovery rates of approximately 80–82% [19].

An encouraging finding was that we observed the highest detection efficiency when using a so-called cell-mix sample that contained an equal proportion of CAMA-1, MCF-7 and ZR-75-1 cells in the same blood sample. This is important since the circulating cell pool in *in vivo* conditions is also considered to be heterogeneous.

Our approach works convincingly on cells that have variable expression levels of the antigens used in this work. The advantages of immunohistochemical tumor cell detection are its simplicity, velocity and efficiency. Additionally, in comparison with EpCAM-based immunomagnetic detection methods or FACS-based analysis, as well as functional assays for cancer cell detection, this method is quite cost efficient without losing its reliability.

Detection technologies using EpCAM-based assays are routinely performed by using immunomagnetic beads consisting of core–shell polystyrenes. Recent investigations showed unacceptable biocompatibilities at higher doses that lead to cytotoxicity. For example, generation

of reactive oxygen species, cytoskeleton architecture rearrangement and iron imbalance [20] might lead to a falsification of results. Furthermore, it is known that the expression of EpCAM molecules is downregulated when DTCs undergo epithelial–mesenchymal transition [8], so that many of the tumor cells would escape detection by EpCAM-based methods. Another finding is that functional assays reveal too many false-positive findings, as, for example, the EPISPOT assay enrichment procedure only consists of a CD45<sup>+</sup> cell depletion before the actual detection takes place. In addition, work has been published that demonstrates that the detection of cytokeratins used in these assays are not sufficient for CTC detection [21].

To test the use of this method in a translational clinical setting, we will apply this double labeling technique of Her-2- and Thomsen–Friedenreich antigens, in combination with further established breast cancer cell markers, such as mucin-1 and ALDH1A1, on bone marrow samples from breast cancer patients in adjuvant and metastatic situations. Moreover, the results will be correlated with other methods such as the Veridex<sup>®</sup> Cell Search<sup>®</sup> System and PCR-based assays.

### Conclusion & future perspective

The advantage of our method is that DTCs identified by this technique will already be characterized in two important tumor antigens that can help to facilitate the decision on subsequent therapies and prognosis for these patients. Spontaneous metastases could be inhibited by using the monoclonal anti-Thomsen–Friedenreich antibody JAA-F11 [22]. Patients with Her-2-positive CTCs and DTCs and Her-2-negative primary tumors can benefit from Her-2-targeted therapy [23], adding further support to the idea of characterizing DTCs as early as possible.

The next steps in the development of this methodology will be to test further tumor marker antigens for their use in tumor cell detection to generate a marker set for the detection and characterization of DTCs from breast cancer patients. This marker set will then be applied to patient bone marrow samples.

## Detection of breast cancer cells by immunostaining Preliminary Communication

### Acknowledgements

The authors thank L. Soussana for language corrections.

### Financial & competing interests disclosure

This work was supported by a postdoctoral stipend to M Ilmer provided by the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

### Executive summary

- Different methods for detection of circulating tumor cells and disseminated tumor cells have been described. We developed a new immunofluorescent method for detection of disseminated tumor cells based on immunohistochemical staining of the Thomsen–Friedenreich antigen in combination with Her-2 and tested it as a model system.
- For the development of the model system, blood samples were spiked with different numbers of cancer cell line cells: CAMA-1, MCF-7 and ZR-75-1. Immunofluorescent staining against CD176 and Her-2 was performed and evaluated via epifluorescence microscopy.
- The presented method appears to be promising and seems worthy to be extended to bone marrow samples of breast cancer patients to detect and characterize disseminated tumor cells.

### References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
  - of considerable interest
1. Allemani C, Sant M, Weir HK *et al.* Breast cancer survival in the US and Europe: a CONCORD high-resolution study. *Int. J. Cancer* 132(5), 1170–1181 (2013).
  - **Detailed background information on breast cancer in Europe and the USA.**
  2. Pantel K, Woelfle U. Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 18(2), 120–125 (2004).
  3. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol.* 5(2), 79–88 (2004).
  4. Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br. J. Cancer* 94(1), 8–12 (2006).
  5. Braun S, Pantel K, Muller P *et al.* Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342(8), 525–533 (2000).
  6. Braun S, Vogl FD, Naume B *et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353(8), 793–802 (2005).
  7. Tjensvoll K, Oltedal S, Heikkila R *et al.* Persistent tumor cells in bone marrow of non-metastatic breast cancer patients after primary surgery are associated with inferior outcome. *BMC Cancer* 12, 190 (2012).
  8. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 13(6), 228 (2011).
  9. Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res.* 195, 69–76 (2012).
  10. Hanisch FG, Baldus SE. The Thomsen–Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen. *Histol. Histopathol.* 12(1), 263–281 (1997).
  11. Lin WM, Karsten U, Goletz S, Cheng RC, Cao Y. Expression of CD176 (Thomsen–Friedenreich antigen) on lung, breast and liver cancer-initiating cells. *Int. J. Exp. Pathol.* 92(2), 97–105 (2011).
  - **Basic knowledge on the antigens analyzed in the present work.**
  12. Ravn P, Stahn R, Danielczyk A, Faulstich D, Karsten U, Goletz S. The Thomsen–Friedenreich disaccharide as antigen for in vivo tumor targeting with multivalent scFvs. *Cancer Immunol. Immunother.* 56(9), 1345–1357 (2007).
  13. Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S *et al.* Prognostic impact of Thomsen–Friedenreich tumor antigen and disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 101(1), 17–25 (2007).
  - **Fundamental data on CD176 in breast cancer.**
  14. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. *Anticancer Res.* 25(3B), 2171–2175 (2005).
  - **Basic knowledge on the antigens analyzed in the present work.**
  15. Meng S, Tripathy D, Shete S *et al.* Her-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(25), 9393–9398 (2004).
  16. Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S *et al.* Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen–Friedenreich tumor antigen. *Histochem. Cell Biol.* 123(6), 631–637 (2005).
  - **Fundamental data on CD176 in breast cancer.**
  17. Helzer KT, Barnes HE, Day L, Harvey J, Billings PR, Forsyth A. Circulating tumor cells are transcriptionally similar to the primary tumor in a murine prostate model. *Cancer Res.* 69(19), 7860–7866 (2009).
  18. Cann T, Gardner A. Change for the better: an innovative model of care delivering positive patient and workforce outcomes. *Collegian* 19(2), 107–113 (2012).



**Preliminary Communication** Andergassen, Zebisch, Kölbl *et al.*

19. Nagaiah G, Abraham J. Circulating tumor cells in the management of breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 10(3), 209–216 (2010).
20. Wang LL, Zhang K, Xiong CY, Ge ZG. Cytotoxicity of core-shell polystyrene magnetic beads and related mechanisms. *Mol. Cell Toxicol.* 8, 217–227 (2012).
21. Königsberg R, Obermayr E, Bises G *et al.* Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 50(5), 700–710 (2011).
22. Heimburg J, Yan J, Morey S *et al.* Inhibition of spontaneous breast cancer metastasis by anti-Thomsen–Friedenreich antigen monoclonal antibody JAA-F11. *Neoplasia* 8(11), 939–948 (2006).
23. Krawczyk N, Banys M, Neubauer H *et al.* HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor. *Anticancer Res.* 29(10), 4019–4024 (2009).

**Website**

101. Cell Search®. The CELLSEARCH® CTC Test can help you make more informed patient-care decisions.  
<http://veridex.com/CellSearch/CellSearchHCP.aspx>

## 4. Zusammenfassung (deutsch)

Die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden, sowie disseminierten Tumorzellen, steht aktuell im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zur Detektion von CTCs aus Vollblutproben auf molekularer Ebene als Alternative zu den bisherigen Detektionsmethoden zu untersuchen. Mit Hilfe des TF-Antigens in Kombination mit einem etablierten Antigen-Marker (HER2) soll darüber hinaus eine immunzytologische Detektionsmöglichkeit für DTCs geprüft werden.

Der Artikel „Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines“ untersucht die Möglichkeit, ein Modellsystem für den Nachweis zirkulierender Tumorzellen aus Blutproben auf Real-Time PCR Basis unter Verwendung der Zytokeratine 8, 18 und 19 zu generieren. Hierzu wurden Blutproben gesunder Probanden mit unterschiedlichen Zellzahlen aus verschiedenen Brustkrebszelllinien (Cama-1, MCF7, MDA-MB231, ZR-75-1) versetzt, und mit diesen Blutproben eine Analyse mit Hilfe der Real-Time PCR durchgeführt. Von den verwendeten Zelllinien waren Cama-1 Zellen am besten geeignet, um eine Kalibrierungskurve zu erstellen, jedoch wurde für die weiteren Experimente eine Mischung aus den Zelllinien Cama-1, MCF7 und ZR-75-1 verwendet, um deren histologische und morphologische Unterschiede mit heranziehen, und damit die Situation in Patientenproben besser simulieren zu können. Durch Zugabe der Kulturzellen bereits vor Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation, traten immunologische Effekte zwischen den Immunzellen des Spenderblutes und den Zellkulturzellen, sogenannte Agglutinationsreaktionen, auf. Dies konnte jedoch durch Hinzufügen der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt im Aufarbeitungsprotokoll, kurz vor Durchführung der RNA-Extraktion, vermieden werden. Um mögliche Detektionslimits der Real-Time RT-PCR zu vermeiden, wurden die Kulturzellen in weiteren Versuchen nicht mehr pro Probe, sondern pro Milliliter Blutprobe zugesetzt.

In der Veröffentlichung „Quantification of Breast Cancer Cells in Peripheral Blood Samples by Real-Time RT-PCR“ wurden die gewonnenen Erkenntnisse in einem optimierten Standardprotokoll umgesetzt. Mit Hilfe von Blutproben, welche unterschiedliche Mengen an zugesetzten Zellen diverser Brustkrebszelllinien beinhalteten, wurde überprüft, in wie weit eine Quantifizierung anhand der zuvor generierten Eich- bzw. Kalibrierkurven möglich ist. Die Auswertung der RQ-Werte der Real-Time RT-PCR zeigte, dass eine Quantifizierung der CTCs mittels der erstellten Kalibrierkurven möglich, und eine Angabe über die Anzahl der in der Blutprobe befindlichen Tumorzellen anhand der Genexpression der Zytokeratine im Modellsystem möglich erscheint.

Im Artikel „Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen-Friedenreich antigen“ wird ein immunzytochemischer Nachweis zur Detektion von DTCs beschrieben. Zunächst wurden Blutproben gesunder Probanden mit definierten Mengen an Brustkrebszellen (Cama-1, MCF7 und ZR-75-1) versetzt und daraus Objektträger-Präparate angefertigt. Unter Verwendung von Antigenmarkern für CD 176 (Thomsen-Friedenreich) und HER2 wurde die Wiederfindungsrate dieser mit Brustkrebszellen versehenen Objektträger aus EDTA-Blutproben in einem neu erstellten Färbeprotokoll ermittelt, wobei nur die zugesetzten Tumorzellen in den Präparaten Färbungen aufwiesen. Eine Wiederfindungsrate von 83 Prozent zeigt, dass TF sowohl als Detektionsmarker, als auch zur weiteren Phänotypisierung für DTCs geeignet zu sein scheint.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Detektion von CTCs aus Vollblutproben mit Hilfe der Real-Time RT-PCR eine adäquate, kostengünstige und schnelle immunzytologische Untersuchungsmethode ist. Mit ihrer Hilfe kann nicht nur eine zeitnahe, therapeutische Verlaufskontrolle, sondern auch eine gezielte Detektion von CTCs, als entscheidendem prognostischem und prädiktivem Risikofaktor für das Auftreten von Rezidiverkrankungen beim Mammakarzinom, durchgeführt werden [58]. Internationale Veröffentlichungen auf dem Gebiet der CTC-Detektion bei Mammakarzinom konnten bereits die prognostische Signifikanz von CTC-Analysen bezüglich DFS (disease free survival), OS (overall survival), MFS (metastasis free survival) und BCSS (breast cancer-specific survival) entweder mit Hilfe des CellSearch-Systems® oder der RT-PCR nachweisen [57, 62, 64, 66, 77]. Die Detektion, Quantifizierung, sowie Phänotypisierung von DTCs wird dabei helfen, deren Rolle bei Tumorerkrankungen besser zu verstehen und neue Therapiestrategien zu entwickeln. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass TF beim Kolonkarzinom als vielversprechender Detektionsmarker [81] und als Tumorstammzellmarker diskutiert wird [91]. Auch als Zielmolekül für gezielte Tumortherapien („Target Therapy“) [90], ebenso wie als Impfstoff bei Prostatakarzinom [83] scheint mit dem Thomsen-Friedenreich ein vielversprechendes Target zur Behandlung von Tumorerkrankungen zur Verfügung zu stehen.

In weiteren Untersuchungen wurden die gewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit bei der Real-Time RT-PCR auf Patientenproben von Mammakarzinompatientinnen übertragen, um deren Nutzen für die tägliche Routine zu verifizieren. Neben den verwendeten Zytokeratinen sollen zur Erhöhung der Detektionsrate weitere Antigenmarker wie HER2, IGF-1 und ALDH zum Einsatz kommen. Die Methode der DTC Detektion fand in weiterführenden Versuchen an Knochenmarksproben von Mammakarzinompatientinnen Anwendung. Zusätzliche, bereits etablierte Antigenmarker bei immunhistologischen Untersuchungen wie MUC1 und ALDH1A1 sollen zeigen, in wie weit eine Korrelation mit TF gegeben ist, mit deren Hilfe eine Isolierung und Kultivierung der Tumorzellen ermöglicht werden soll.

---

## 5. Zusammenfassung/Summary (English)

The detection and characterisation of circulating and disseminating tumour cells is currently in the centre of common scientific interest. The aim of the on hand study was to investigate on a molecular based method for the detection of CTCs out of EDTA blood samples alternatively to already existing methods of detection. Additionally an immunocytochemical method for the detection of DTCs by using the TF-antigen in combination with an already established antigen-marker (HER2) should be proved.

The paper "Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines" investigates the possibility to generate a model system for the detection and quantification of circulating tumour cells out of blood samples based on Real-Time RT-PCR diagnostics by using the cytokeratins 8, 18 and 19. Therefore blood samples of healthy volunteers were spiked with differing cell counts of various breast cancer cell line cells (Cama-1, MCF7, MDA-MB231, ZR-75-1). Out of these samples Real-Time RT-PCR investigations were performed. The findings approved Cama-1 cells to be suited best to generate a significant calibration curve. Though, for further investigations a mixture of Cama-1, MCF7 and ZR-75-1 cell line cells has been prepared to include their different histological and morphological distinctions to the investigations. This instance was considered to simulate the situation in patients' samples best. When adding the cell culture cells already before the density gradient centrifugation is done, immunological effects between these spiked cells and common blood cells of the donors were taking place, leading to an apparent agglutination reaction. These side effects could be avoided when adding the artificial tumour cells just shortly before the RNA extraction process was started. Spiking the cancer cell line cells per ml of a blood sample used is also important, otherwise Real-Time RT-PCR detection limits might be undercut.

Within the publication "Quantification of Breast Cancer Cells in Peripheral Blood Samples by Real-Time RT-PCR" the findings of the former investigations have been implemented, leading to an optimized standard protocol. Blood samples containing different amounts of added tumour cells were used to investigate on a possible quantification of CTCs based on the generated calibration curves before. The detection of CTCs, as well as their quantification via generated calibration curves appears to be possible due to RQ values of the Real-Time RT-PCR and the results of this model system.

---

The paper “Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen-Friedenreich antigen” describes an immunocytochemical investigation on detecting DTCs. Corresponding to the already mentioned Real-Time RT-PCR analyses, blood samples of healthy volunteers have been spiked with artificial mamma carcinoma cells (Cama-1, MCF7 and ZR-75-1), again. Subsequently, out of these samples, object slides have been prepared for investigations. By using the markers CD176 (Thomsen-Friedenreich) and HER2 in a new designed manual, the recovery rate of the added tumour cells has been determined. Therefore only spiked tumour cells shall feature a staining in comparison to common blood cells surrounding on the cover slip. A recovery rate of 83% proves TF to be suitable as a marker for detection, as well as for further phenotyping of DTCs.

The findings of this work illustrate the detection of CTCs by using Real-Time RT-PCR to become an adequate, cost-efficient and fast alternative for immunocytochemical detection methods. A benefit of this method might be a possible continuous control of patients’ response to therapeutic regimes additionally to the detection of CTCs as prognostic and predictive factors, being held responsible for the occurrence of relapse, e.g. mamma carcinoma [58]. Numerous studies based on the issue of CTC detection of mamma carcinoma proved the prognostic significance of CTCs concerning DFS (disease free survival), OS (overall survival), MFS (metastasis free survival) and BCSS (breast cancer-specific survival) by using either the CellSearch System® or RT-PCR methods [57, 62, 64, 66, 77].

The detection and quantification of DTCs, as well as their phenotyping will help to recognize their role in tumour genesis and disease and to evolve new strategies in cancer treatment. Results on the latest research show TF to be a promising marker for the detection of colon carcinoma [81]. TF is also discussed as a possible stem cell marker [91]. Additionally the Thomsen Friedenreich antigen is capable of becoming an auspicious target for cancerous diseases e.g. as possible vaccine for prostate cancer treatment [83] and in general as promising object of targeted medical treatment therapies [90].

The gained findings of the PCR analyses were transferred to a clinical setting on mamma carcinoma patient samples to evaluate potential benefits in daily routine diagnostic. Despite the used cytokeratin markers, further putative CTC markers, such as HER2, IGF-1 and ALDH, need to be taken into consideration to increase the chance of detecting CTCs.

The method of DTC detection was applied in further investigations to bone marrow samples of mamma carcinoma patients. Already established breast cancer cell markers in immunohistochemical investigations like MUC1 and ALDH1A1 shall prove a potential correlation with TF in order to facilitate an isolation and subsequent cultivation of these cancer cells.

---

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1**      Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (S. 5)

(Krebs in Deutschland 2007/2008.8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012, S. 12)

**Abbildung 2**      Mortalität in Korrelation zu körperlicher Aktivität (S. 6)

(Wen, C.P., et al., Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. Lancet, 2011. 378(9798): p. 1244-53)

**Abbildung 3**      Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht ICD-10 C50, Deutschland 2007/2008 (S. 7)

(Krebs in Deutschland 2007/2008.8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012, S. 66)

**Abbildung 4**      Schematische Darstellung des ABC-Färbekomplexes (S. 10)

(<http://www.biologie.uniregensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/DROSI/strentw42.htm>)

## 6.2. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1**            Chemikalienliste zur Versuchsdurchführung

**Tabelle 2**            Geräteliste zur Versuchsdurchführung

### 6.3. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALDH1A1	Aldehyddehydrogenase 1A1
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase Färbung
ATM	Gen
BCSS	Brustkrebspezifisches Überleben (engl. breast cancer specific survival)
BRCA-1	Breast Cancer 1 (Genmutation)
BRCA-2	Breast Cancer 2 (Genmutation)
Cama-1	Epithelzelllinie aus der Brustdrüse
CD45	Oberflächenantigen (Tyrosinphosphatase)
CD176	Cluster of differentiation 176; Thomsen Friedenreich Antigen
CDH1	Gen
CHK2	Gen
CK (8,18,19)	Zytokeratin (engl. cytokeratin)
CTCs	zirkulierende Tumorzellen (engl.: circulating tumour cells)
DFS	Krankheitsfreies Überleben (engl.: disease free survival)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DTCs	disseminierte Tumorzellen (engl.: disseminated tumour cells)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure / Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (engl. Epithelial cell adhesion molecule)
ER	Estrogenrezeptor



---

FDA	Food and Drug Administration
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 (erb-B2, c-erbB2)
IGF-1	Insulinwachstumsfaktor-1 (engl: insulin growth factor-1)
IHC	ImmunoHistoChemistry- Score
Ki-76	Antigen (Protein), zur Proliferationsaktivitäts-Detektion
MCF7	Epithelzelllinie aus der Brustdrüse (Michigan cancer foundation 7)
MDA-MB231	Epithelzelllinie aus der Brustdrüse
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MFS	Metastasen-freies Überleben (engl.: metastasis free survival)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
MUC1	Mucin-1
OAS/OS	Gesamtüberlebensrate (engl.: overall survival)
PgR	Progesteronrezeptor
PTEN	Gen
RAD51C	Gen
RQ-Werte	Wert der Relativen Quantifizierung
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (engl: reverse transcription polymerase chain reaction)
TF	Thomsen Friedenreich Antigen
TNM	Tumorgröße, Anzahl der betroffenen Lymphknoten (engl.: Nodes), Metastasierung
ZR-75-1	Epithelzelllinie aus der Brustdrüse

## 6.4. Chemikalienverzeichnis

**Tabelle 1** Chemikalienliste zur Versuchsdurchführung

Substanz	Hersteller	Qualität / Reinheit
<b>Zellkultur</b>		
DMEM	Biochrom Berlin, Germany	steril
FCS	Biochrom Berlin, Germany	steril
Penicillin/Streptomycin	Biochrom Berlin, Germany	steril
Phosphate buffer saline (PBS)	Biochrom Berlin, Germany	steril
Trypsin/EDTA	Biochrom Berlin, Germany	0,05% / 0,02% steril
<b>Dichtegradientenzentrifugation</b>		
Histopaque 1077	Invitrogen, Darmstadt, Germany	p.a.
Phosphate buffer saline (PBS)	Biochrom Berlin, Germany	steril
<b>RNA Isolierung</b>		
TRIzol LS Reagent	Invitrogen, Darmstadt, Germany	p.a.
Chloroform	Merck, Darmstadt, Germany	p.a.
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Germany	99,9%
Glycogen	Invitrogen Life Technologies, USA	p.a.
Ethanol	Merck, Darmstadt, Germany	75%
DEPC Wasser	Invitrogen Life Technologies, USA	steril
<b>Umschreibung der RNA in cDNA</b>		
SuperScript III First Strand Synthesis Super Mix Kit	Invitrogen Life Technologies, USA	p.a.
<b>Real-Time RT-PCR</b>		
TaqMan Fast Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems , Foster City CA, USA	p.a.
TaqMan Primer CK8 Hs02339472_g1	Applied Biosystems , Foster City CA, USA	p.a.
TaqMan Primer CK18 Hs01920599_gH	Applied Biosystems , Foster City CA, USA	p.a.
TaqMan Primer CK19 Hs00761767_g1	Applied Biosystems , Foster City CA, USA	p.a.
TaqMan Primer 18S Hs 03928990_g1	Applied Biosystems , Foster City CA, USA	p.a.

Substanz	Hersteller	Qualität / Reinheit
<b>Immunfärbung</b>		
Bovines serum Albumin (HS frac.)	Sigma ALDRICH, Hamburg, Germany	5%
NEMOD-TF2 antibody; IgM-k, mouse	NEMOD Biotherapeutics, Berlin, Germany	p.a.
DAKO S 3022 (Antibody diluent)	DAKO North America, CA, USA	p.a.
Phosphate buffer saline (PBS)	Biochrome, Berlin, Germany	steril
Cy2-coupled goat antimouse IgM - antibody	Jackson ImmunoResearch, PA, USA	p.a.
Ultra V Block	Labvision TA-060-UB, Labvision, MI, USA	p.a.
Her-2, c-erbB-2 antibody	Neomarkers, Fremont, CA, USA	p.a.
Cy3-coupled goat anti- mouse antibody	Jackson ImmunoResearch, PA, USA	p.a.
Vectashield mounting medium	Vectashield H-1200, Vectorlabs, Peterborough, UK	p.a.

## 6.5. Geräteverzeichnisverzeichnis

**Tabelle 2**      **Geräteliste zur Versuchsdurchführung**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, USA
TECHNE DRI Block DB2a	TECHNE, UK
Thermo Fisher Biotype Stratos	Thermo Fisher, Germany
HeraSafe, Heraeus Instruments	Thermo Fisher, Germany
Thermo Scientific HeraCell 150i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Fisher, Germany
Thermo Electron Corporation HERA Freeze Basic	Thermo Fisher, Germany
Thermo Scientific Multifuge 3 <sub>L-R</sub> Heraeus	Thermo Fisher, Germany
Zeiss Axioscope + AxioCam MRm	Zeiss, Germany

## 6.6. Posterpräsentationen

- Gemeinsame Tagung der BGGF und OEGGG (25.05. – 28.05.2011), Erlangen
- 15<sup>th</sup> International Hamburg Symposium on Tumor Markers (29.05.-31.05.2011),  
Hamburg
- 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie (23.06. – 25.06.2011),  
Dresden
- 86. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V.  
(BGGF) (28.06. – 30.06.2012), Würzburg (2 Poster)



**KLINIKUM**  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese



## Quantifizierung von CTCs mit Hilfe der Taq-Man-PCR im Mammakarzinom

Michael Zebisch<sup>1</sup>, Alexandra C. Kölbl<sup>1</sup>, Ulrich Andergassen<sup>1</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>, Verena Engelstätter<sup>1</sup>, Maria Günthner-Biller<sup>1</sup>, Udo Jeschke<sup>1</sup>, Klaus Friese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – LMU Klinikum der Universität München

### Hintergrund:

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTZ) mittels Immunfluoreszenz ist ein teures und zeitaufwendiges Verfahren, das bisher keinen Einzug in die Routinediagnostik gehalten hat. Der Nachweis von CTCs aus peripherem Blut soll in der vorliegenden Studie mit Hilfe der Real-Time-PCR (RT-PCR) erfolgen.

Dafür ist es zunächst nötig, eine Eichkurve für tumorspezifisch exprimierte Gene zu erstellen, die die Genexpression, in Abhängigkeit von der Anzahl, im Blut vorhandener, Tumorzellen zeigt.

### Materialien & Methoden

Aus Blut gesunder Probanden wurden über Dichtegradientenzentrifugation Leukozyten angereichert und 0 -100.000 MCF-7 bzw. Cama-1-Zellen/ml Blut zugesetzt.

Aus dem Zellpellet, wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in eine RT-PCR mit den Genen Cytokeratin (CK) 8, 18 und 19 eingesetzt, wobei 18S als Referenzen verwendet wurde.

### Ergebnis:

In beiden Zelllinien findet man für CK 18 ab 1000 Zellen/ml einen nahezu linearen Anstieg in der Relativen Quantifizierung (RQ).

Für CK8 zeigt sich bei Cama-1 ein fast exponentieller Anstieg, bei MCF-7 stagniert die Kurve der RQ ab 10000 Zellen/ml in einem Plateau.

Für CK 19 ist eine einheitliche Tendenz nicht zu beobachten

### Zusammenfassung

Eine Quantifizierung von CTCs aus Blut ist mit den Genen CK 8 und CK 18 ab 1000 Zellen/ml möglich; bei Cama-1 Zellen ist eine Quantifizierung mit Hilfe von CK18 bereits zwischen 100 und 1000 Zellen möglich.

CK 19 ist für die Quantifizierung von TCs am wenigsten geeignet.

Weitere Untersuchungen an peripherem Blut metastasierter Patientinnen wird die Brauchbarkeit der Methode zeigen.

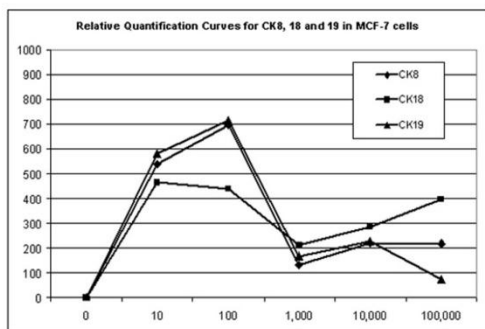


Abb. 1: Relative Quantifizierung für die Cytokeratine 8, 18 und 19 in MCF-7 Zellen

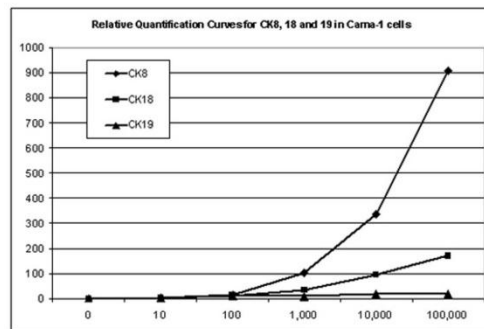


Abb. 2: Relative Quantifizierung für die Cytokeratine 8, 18 und 19 in Cama-1 Zellen



Gemeinsame Tagung der BGGF und OEGGG (25.05. – 28.05.2011) • Erlangen

• Michael Zebisch

Klinikum Innenstadt • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Perinatalzentrum • Ludwig-Maximilians-Universität München • Maistrasse 11 • 80337 Munich, Germany • Michael.Zebisch@med.uni-muenchen.de



**KLINIKUM**  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese



## Experiments on the detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established mammarcarcinoma cell lines

M. Zebisch<sup>1</sup>, A.C. Kölbl<sup>1</sup>, U. Andergassen<sup>1</sup>, J. Neugebauer<sup>1</sup>, V. Engelstädter<sup>1</sup>, M. Günthner-Biller<sup>1</sup>, U. Jeschke<sup>1</sup>, K. Friese<sup>1</sup>, B. Rack<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – LMU Klinikum der Universität München

### Background

Breast cancer associated mortality is mostly due to tumour-generated remote metastases in other organs. Current models assume, that cells detached from primary tumour circulate via blood or the lymphatic system to other organs generating metastases. These so called "circulating tumour cells" (CTCs) were already found in bone marrow or blood in a number of studies on patients with epithelial tumours.

In the present study CTCs should be detected by Real-Time-PCR from peripheral blood, based on the microarray-deduced fact, that some genes are strongly upregulated in their expression in tumour tissues in comparison to normal tissue.

The first step within this analysis is the preparation of a calibration curve showing gene expression as function of the number of tumour cells within a blood sample.

### Materials & Methods

Blood samples of healthy donors were spiked cells of different mammarcarcinoma cell lines and enriched by density-gradient centrifugation.

RNA was extracted and transcribed to cDNA, which was used in the Real-Time-PCR reaction on the Cytokeratins (CK) 8, 18 and 19. Calibration curves were generated by Microsoft<sup>TM</sup> Excel<sup>®</sup>.

### Results

Curves of Relative Quantification of gene expression in different mammarcarcinoma cell lines do not show unitary tendencies.

In most experiments a decrease in Relative Quantification of gene expression is seen in samples with high spiked-in cell numbers in comparison to samples with lower numbers of added mammarcarcinoma cells.

### Conclusion

The strong oscillations in the curves of Relative Quantification of gene expression suggest an occurrence of immunological effects, leading to an agglutination of added tumour cells with blood cells of the sample donors.

To bypass these effects tumour cells should be added to the sample after the density-gradient centrifugation.

Furthermore tumour cells should be added per ml blood sample used, to obtain evaluable results by Real-Time-PCR, otherwise detection limits will be undercut.

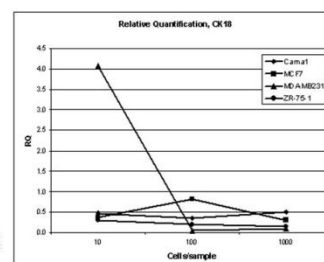


Abb. 1:  
Relative Quantification of CK18 in various mammarcarcinoma cell lines (Cama-1, MDA-MB231, MCF-7, ZR-75-1)

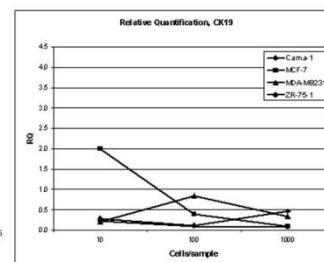


Abb. 2:  
Relative Quantification of CK19 in various mammarcarcinoma cell lines (Cama-1, MDA-MB231, MCF-7, ZR-75-1).

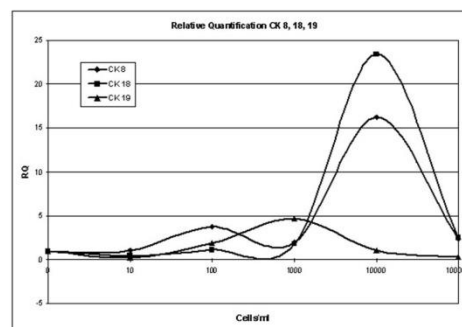
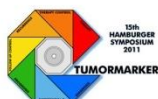


Abb. 3: Relative Quantification of CK 8, 18 and 19 in MCF-7 cells.

15<sup>th</sup> Hamburger Tumormarker Symposium • Hamburg • Michael Zebisch

Klinikum Innenstadt • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Perinatalzentrum • Ludwig-Maximilians-Universität München • Maistrasse 11 • 80337 Munich, Germany • Michael.Zebisch@med.uni-muenchen.de





**KLINIKUM**  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese



## Quantifizierung von CTCs mit Hilfe der Taq-Man-PCR im Mammakarzinom

Michael Zebisch<sup>1</sup>, Alexandra C. Kölbl<sup>1</sup>, Ulrich Andergassen<sup>1</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>, Verena Engelstätter<sup>1</sup>, Maria Günthner-Biller<sup>1</sup>, Udo Jeschke<sup>1</sup>, Klaus Friese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – LMU Klinikum der Universität München

### Hintergrund:

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTZ) mittels Immunfluoreszenz ist ein teures und zeitaufwendiges Verfahren, das bisher keinen Einzug in die Routinediagnostik gehalten hat. Der Nachweis von CTCs aus peripherem Blut soll in der vorliegenden Studie mit Hilfe der Real-Time-PCR (RT-PCR) erfolgen.

Dafür ist es zunächst nötig, eine Eichkurve für tumorspezifisch exprimierte Gene zu erstellen, die die Genexpression, in Abhängigkeit von der Anzahl, im Blut vorhandener, Tumorzellen zeigt.

### Materialien & Methoden

Aus Blut gesunder Probanden wurden über Dichtegradientenzentrifugation Leukozyten angereichert und 0 -100.000 MCF-7 bzw. Cama-1-Zellen/ml Blut zugesetzt.

Aus dem Zellpellet, wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in eine RT-PCR mit den Genen Cytokeratin (CK) 8, 18 und 19 eingesetzt, wobei 18S als Referenzen verwendet wurde.

### Ergebnis:

In beiden Zelllinien findet man für CK 18 ab 1000 Zellen/ml einen nahezu linearen Anstieg in der Relativen Quantifizierung (RQ).

Für CK8 zeigt sich bei Cama-1 ein fast exponentieller Anstieg, bei MCF-7 stagniert die Kurve der RQ ab 10000 Zellen/ml in einem Plateau.

Für CK 19 ist eine einheitliche Tendenz nicht zu beobachten.

### Zusammenfassung

Eine Quantifizierung von CTCs aus Blut ist mit den Genen CK 8 und CK 18 ab 1000 Zellen/ml möglich; bei Cama-1 Zellen ist eine Quantifizierung mit Hilfe von CK18 bereits zwischen 100 und 1000 Zellen möglich.

CK 19 ist für die Quantifizierung von DTCs am wenigsten geeignet.

Weitere Untersuchungen an peripherem Blut metastasierter Patientinnen wird die Brauchbarkeit der Methode zeigen.

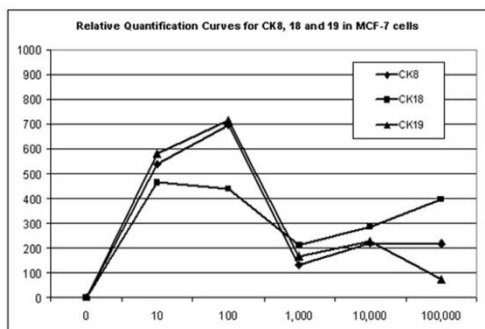


Abb.1: Relative Quantifizierung für die Zytokeratine 8, 18 und 19 in MCF-7 Zellen

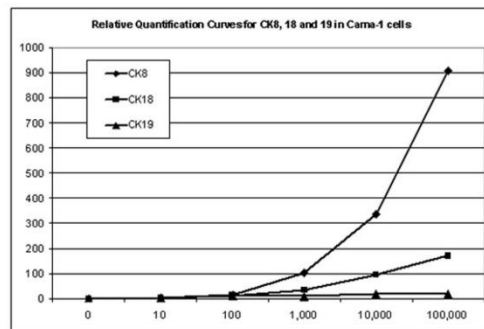


Abb.2: Relative Quantifizierung für die Zytokeratine 8, 18 und 19 in Cama-1 Zellen

31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie (23.06. – 25.06.2011) • Dresden • Michael Zebisch

Klinikum Innenstadt • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Perinatalzentrum •

Ludwig-Maximilians-Universität München • Maistrasse 11 • 80337 Munich, Germany • Michael.Zebisch@med.uni-muenchen.de

Deutsche Gesellschaft  
für Senologie

SUCCESS SUCCESS SUCCESS  
study group





**KLINIKUM**  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese



## Nachweis zirkulierender Tumorzellen aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen anhand der Genexpression von Zytokeratin 8, 18 und 19

Michael Zebisch<sup>1</sup>, Ulrich Andergassen<sup>1</sup>, Alexandra C. Kölbl<sup>1</sup>, Sabine Heublein<sup>1</sup>, Bernadette Jäger<sup>1</sup>, Julia Neugebauer<sup>1</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>, Klaus Friese<sup>1</sup>, Udo Jeschke<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – LMU Klinikum der Universität München

### Hintergrund:

Als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet man Zellen die sich vom Primärtumor abgelöst haben, sich in Blut und Lymphe befinden und als Ursprung einer Metastasierung betrachtet werden. Können nun zirkulierende Tumorzellen im Blut detektiert werden, geht dies meist mit einer schlechteren Prognose und einem schlechteren Gesamtüberleben (OAS) einher. Der Nachweis zirkulierender Tumorzellen, ist aufgrund der geringen Anzahl an Zellen, technisch schwierig. Im Vorliegenden wird dargestellt, wie der Nachweis zirkulierender Tumorzellen mit Hilfe der hoch-sensitiven Methode der Real-Time-PCR aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen erfolgen kann. Grundlage dieses Nachweises ist die Tatsache, dass diese Tumorzellen epithelialen Ursprungs sind und damit einige Gene, wie beispielsweise die Zytokeratine, eine andere Expression aufweisen, als die umgebenden Blutzellen.

### Materialien & Methoden:

Es erfolgte eine Blutuntersuchung bei 5 gesunden Probanden, 5 adjuvanten und 4 metastasierten Brustkrebspatientinnen. Es wurden jeweils 20 ml peripheres Blut (EDTA) abgenommen, die Leukozyten-Fraktion über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll angereichert, und daraus die RNA isoliert. Nach der reversen Transkription wird die cDNA in die Real-Time-PCR mit den Genen Zytokeratin 8, 18 und 19 eingesetzt, die auch in der immunhistochemischen Detektion von Tumorzellen mit Hilfe der APAAP-Färbung eingesetzt werden. Als Referenzgen wird 18S verwendet, die statistische Auswertung erfolgt über SPSS.

### Ergebnis:

Für alle drei untersuchten Gene ist ein Anstieg in der Genexpression zwischen gesunden Probanden und adjuvanten bzw. metastasierten Patientinnen feststellbar. Der stärkste Anstieg konnte für Zytokeratin 18, der geringste für Zytokeratin 8 beobachtet werden. Dabei waren für Zytokeratin 18 die Unterschiede in der Expression zwischen gesunden Probanden und adjuvanten bzw. metastasierten Patientinnen statistisch signifikant ( $p = 0,036$  bzw.  $p = 0,020$ ). Für die Expressionsänderung bei Zytokeratin 19 ist die statistische Signifikanz noch im aussagekräftigen Bereich ( $p = 0,091$  bzw.  $0,056$ ). Die Unterschiede für Zytokeratin 8 sind nicht signifikant.

### Zusammenfassung:

Das Auftreten zirkulierender Tumorzellen (CTCs) lässt sich mit Hilfe der Real-Time PCR nachweisen und messen. Die hier gezeigten Ergebnisse sollten aber noch auf ein größeres Patientenkollektiv angewendet werden.

Zusätzlich sollten neben den Genen für die Zytokeratine 8, 18 und 19 noch weitere Marker auf ihre Signifikanz beim Mammakarzinom hin überprüft werden.

So könnte mit dem Nachweis gleichzeitig auch eine Charakterisierung der Tumorzellen durchgeführt werden, was zukünftig wiederum einen zusätzlichen, therapeutischen Ansatz bieten könnte.

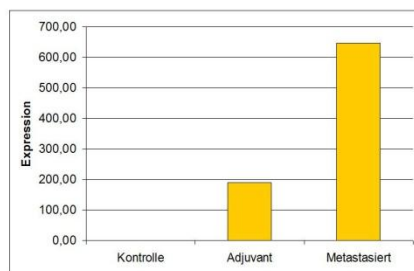


Abb.1: 1-fache Expression der Patientengruppen für Zytokeratin 18

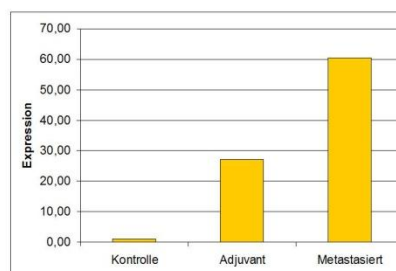


Abb.2: x-fache Expression der Patientengruppen für Zytokeratin 19



86. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e. V. (BGGF) (28.06. – 30.06.2012) • Würzburg

Michael Zebisch • Ulrich Andergassen

Klinikum Innenstadt • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Perinatalzentrum • Ludwig-Maximilians-Universität München • Maistrasse 11 • 80337 Munich, Germany • Michael.Zebisch@med.uni-muenchen.de



**KLINIKUM**  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

Klinik & Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese



## Immunhistochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen: Korrelation von HER-2 und Thomsen-Friedenreich (CD176)

Ulrich Andergassen<sup>1</sup>, Michael Zebisch<sup>1</sup>, Alexandra C. Kölbl<sup>1</sup>, Julia Neugebauer<sup>1</sup>, Bernadette Jäger<sup>1</sup>, Sabine Heublein<sup>1</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>, Klaus Friese<sup>1</sup>, Udo Jeschke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – LMU Klinikum der Universität München

### Hintergrund:

Lösen sich Zellen vom Primärtumor, können sie sich über Blut- und Lymphgefäße im gesamten Körper ausbreiten. Dies ist der erste Schritt zur erfolgreichen Filialisierung, und somit ein Wendepunkt für die Prognose. Das Auffinden solcher zirkulierender Tumorzellen im Blut (CTC) und disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (DTC) ist mit einer schlechteren Prognose für das Gesamtüberleben (OAS) der Patienten assoziiert. Der Nachweis solcher Tumorzellen ist technisch noch immer schwierig und aufwändig, da ihre Anzahl im Vergleich zu den umgebenden Zellen gering ist. Im Folgenden soll nun eine immunhistochemische Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen vorgestellt werden, die gleichzeitig eine Charakterisierung dieser Zellen erlaubt.

### Materialien & Methoden:

Knochenmark, das während der Operation des Primärtumors von 41 Brustkrebspatientinnen entnommen wurde, wird über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll aufgereinigt und die Fraktion, die die Tumorzellen enthält, wird auf Objektträger zentrifugiert. Die Präparate werden luftgetrocknet und vor der Immunfärbung mit Aceton fixiert. Die Immunfärbung erfolgt über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper, wobei das Thomsen-Friedenreich-Antigen (CD 176) und HER-2 angefärbt werden. Die Auszählung der gefärbten Zellen erfolgte durch zwei unabhängige Personen am Fluoreszenzmikroskop, die statistische Auswertung erfolgte über SPSS.

### Ergebnis:

Von insgesamt 41 gefärbten Objektträgern weisen 28 (70,73%) eine positive Färbung für mindestens eines der beiden Antigene auf, wobei Her-2 prozentual höher exprimiert ist, als Thomsen-Friedenreich (36,87% vs. 17,00%). Ebenso viele Präparate weisen mindestens eine Doppelfärbung von CD176 und HER-2 auf, wobei diese prozentual die größte Gruppe aller gefärbten Zellen darstellten (46,14%). Statistisch ergibt sich zwischen der Expression von Thomsen-Friedenreich (CD176) und Her-2 eine signifikante Korrelation ( $p < 0,001$ ).

### Zusammenfassung:

Die Korrelation der Färbung des Thomsen-Friedenreich-Antigens (CD176) mit dem HER-2 Antigen stellt einen guten Nachweis für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen dar.

Jedoch sollte eine Färbung mit weiteren Brustkrebs-assoziierten Markern erfolgen um den bloßen Nachweis mit einer erweiterten Charakterisierung zu verknüpfen.

Dies könnte langfristig eine bessere und personalisierte Therapie der Patienten ermöglichen.

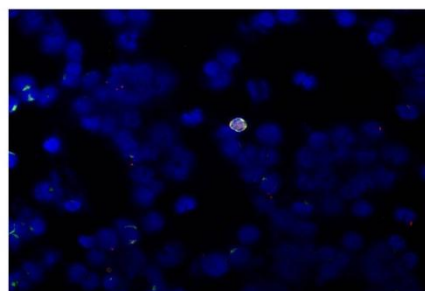
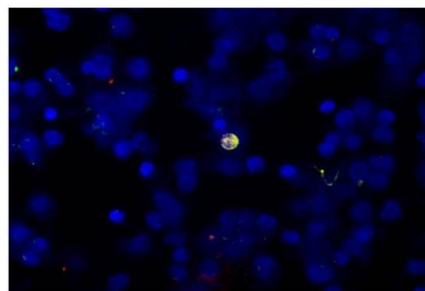


Abb. 1 & 2: Immunhistochemische Färbung von Knochenmarkproben von Mammakarzinompatientinnen (Blau: DAPI; Grün: Thomsen-Friedenreich (CD176); Rot: HER-2)



86. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V. (BGGF) (28.06. – 30.06.2012) • Würzburg  
Ulrich Andergassen • Michael Zebisch

Klinikum Innenstadt • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Perinatalzentrum • Ludwig-Maximilians-Universität München • Maistrasse 11 • 80337 Munich, Germany • Ulrich.Andergassen@med.uni-muenchen.de

## 6.7. Auszeichnung



# URKUNDE

**Herr Dipl. Pharm. Michael Zebisch**  
aus  
München

erhält den

**1. Posterpreis für das Thema**

***Quantifizierung von CTC's beim Mammakarzinom mit Hilfe der Taq-Man-PCR***

im Rahmen der gemeinsamen Tagung der  
Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V.  
und der  
Österreichischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.

in Höhe von

**500,00 €**

Wir bedanken uns für Ihr Engagement und  
beglückwünschen Sie recht herzlich.

Erlangen, 28.05.2011

Prof. Dr. med. Matthias W. Beckmann  
1. Vorsitzender der BGGF e.V.

Univ. Prof. Dr. Walter Neunteufel  
1. Vorsitzender der OEGGG e.V.

## 6.8. Veröffentlichungen

- Clinical Studies: ABSTRACTS OF THE 15th INTERNATIONAL HAMBURG SYMPOSIUM ON TUMOR MARKERS *Anticancer Res May 2011 31 (5) 1957-2015*
- Geburtshilfe und Frauenheilkunde Juli 2012 Seite 553-670. 72. Jahrgang P65/66, Thieme Verlag; 86. Tagung der BGGF (28.-30.05.2012), Würzburg
- Zebisch, M., et al., *Quantification of breast cancer cells in peripheral blood samples by real-time rt-PCR*. *Anticancer Res*, 2012. **32**(12): p. 5387-91
- Zebisch, M., et al., *Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines*. *Biomedical reports*, 2013. **1**(1): p. 213-234
- Andergassen, U., Zebisch, M., et al., *Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen-Friedenreich antigen*. *Future Oncol*, 2013. **9**(5): p. 747-52
- Andergassen U, Kölbl AC, Zebisch M, et al., *Detection and characterisation of disseminated tumour cells in bone marrow of breast cancer patients by immunostaining of Her-2 and MUC-1 in combination with Thomsen-Friedenreich (CD176)*. *Histol Histopathol*. 2014 Jul; **29**(7):913-23. Epub 2014 Jan 8.

## 6.9. Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke danken, dass er mir die Chance zur Promotion ermöglicht hat. In unseren regelmäßigen Besprechungen mit seinen wertvollen Vorschlägen, seiner hohen Expertise, aber auch mit seiner konstruktiven Kritik, hat er mich während der gesamten Projektdauer maßgeblich unterstützt und angeleitet.

Auch meinem medizinischen Betreuer, Herrn Dr. med. Ulrich Andergassen, gebührt maßgeblicher Dank für das Gelingen des gesamten Projekts, der unermüdlichen Bereitstellung sämtlicher Proben zur Analyse und für das stets offene Ohr, das er für mich und die gesamte Arbeitsgruppe hatte.

Ganz besonderer Dank gilt meiner naturwissenschaftlichen Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl für Ihren unermüdlichen Einsatz. Sie unterstützte mich mit Ihren fundierten Kenntnissen in allen wissenschaftlichen Belangen. Ohne Ihre Ausdauer und Nachsichtigkeit sowie Ihrem Engagement, sowohl mich als auch die gesamte Arbeitsgruppe betreffend, hätte dieses Projekt in dieser Form nicht durchgeführt werden können.

Auch möchte ich den beiden Teams, der Tumorimmunologie und der Tumorphistologie für Ihre andauernde Hilfe und Unterstützung, ihrem Engagement und der guten Arbeitsatmosphäre danken. Besonders Frau Leonie Majunke, Frau Beate Zill, Frau Alvera Rengel-Puertas, Frau Christina Kuhn, Frau Simone Hoffmann und Frau Sabine Heublein seien hier erwähnt.

---

Schließlich möchte ich diese Arbeit meiner gesamten Familie widmen, als Dank für deren Geduld und Unterstützung während der vergangenen Jahre.

## 6.10. Eidesstattliche Versicherung

Zebisch, Michael

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Modellsysteme für den Nachweis von CTCs und DTCs aus Blut- und Knochenmarksproben beim Mammakarzinom mittels Real-Time RT-PCR und Immunzytochemie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.09.2013

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand