

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

**Expressionsanalysen zu Prognosemarkern
in humanen Pankreas-Xenograft-
Tumorzelllinien**

Diplomarbeit

von

Sanna Luikenga

zur Erlangung des akademischen Grades Diplom-Ingenieur/in (FH)

im Studiengang Biotechnologie

durchgeführt am Institut für Tumorbologie des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf

Gutachter (HAW): Prof. Dr. C.-D. Wacker

Gutachter/in (UKE): Dr. K.E. Harms-Effenberger

Eingereicht: 20. Mai 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zielsetzung	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einführung	1
1.1 Anatomie und Funktion des Pankreas	1
1.2 Das Pankreaskarzinom	2
1.2.1 Epidemiologie und Histologie	2
1.2.2 Tumorzelldisseminierung	3
1.2.3 Diagnose und Therapie	5
1.3 Prognostische Tumormarker.....	6
1.3.1 Zelladhäsionsmoleküle: ALCAM, EpCAM, E-Cadherin.....	6
1.3.2 <i>Epidermal growth factor</i> -Rezeptor (EGFR) Familie: EGFR, ErbB2, ErbB3.....	8
1.3.3 Stammzellmarker: CD24, CD44, CD133, ALDH1	9
1.3.4 Zytoskelettproteine: CK17, CK19 und Vimentin	11
1.4 Pankreaskarzinomzelllinie PaCa5061 im Xenograft-Modell	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien.....	13
2.1.1 Verwendete Zelllinien	13
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Zellkulturtechnik.....	14
2.2.2 Proteinanalytik.....	18
2.2.3 Nukleinsäureanalytik	24
3 Ergebnisse	31
3.1 Western-Blot-Analyse.....	31
3.1.1 Proteinexpressionsanalyse der Gruppe 1: Humane Tumorzelllinien	31
3.1.2 Proteinexpressionsanalyse der Gruppe 2: Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien	37
3.2 Genexpressionsanalyse: Quantitative PCR	42
3.2.1 Genexpressionsanalyse der Rezeptortyrosinkinase EGFR.....	43
3.2.2 Genexpressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle ALCAM und EpCAM	44
3.2.3 Genexpressionsanalyse der Zytoskelettproteine CK17 , CK19 und Vimentin	46
3.2.4 Genexpressionsanalyse der Stammzellmarker ALDH1 und CD133	49

4	Diskussion.....	52
4.1	Validierung des prognostischen Markerspektrums	53
4.1.1	Der basal-epitheliale Phänotyp/Genotyp	53
4.1.2	Der luminal-epitheliale Phänotyp/Genotyp	54
4.1.3	Der mesenchymale Phänotyp/Genotyp	55
4.2	Genotypisierung und Phänotypisierung der DTC-Zelllinien.....	56
4.3	Anwendbarkeit des epithelialen Differenzierungsmodells.....	57
4.3.1	Genotypisierung und Phänotypisierung der humanen Pankreaskarzinomzelllinien	57
4.3.1	Genotypisierung und Phänotypisierung der Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien	59
4.3.2	Vergleich der Primärtumorzelllinien PaCa5061 und PT1-PT5	60
4.4	Anwendbarkeit der Prognosemarker zur CTC/DTC-Detektion des Pankreaskarzinoms	61
5	Zusammenfassung.....	65
	Literaturverzeichnis	67
A1	Häufig verwendete Materialien	79
A2	Primerpaare und gemessene Effizienz.....	84
A3	Konzentrationsmessung der RNA mittels Nanodrop.....	85
	Danksagung.....	86
	Eidesstattliche Erklärung	87

Zielsetzung

Karzinome des Pankreas sind hoch aggressiv, wachsen rasch infiltrierend und zeigen ein hohes Metastasierungspotential. Eine frühzeitige Diagnose ist durch fehlende oder unspezifische Symptome erschwert, so dass die Mortalitätsrate nahezu 100% beträgt. Die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut (CTCs) und disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTCs) des Pankreaskarzinoms kann im frühzeitigen Stadium eine angepasste Therapie ermöglichen, möglicherweise Rezidive verhindern und als prognostischer Marker dienen. Für die Detektion von CTCs/DTCs werden spezifische Marker benötigt, welche eine eindeutige Zuordnung der vorgefundenen Zellen zu einer malignen Erkrankung ermöglicht. Da es zurzeit keine CTC/DTC-Zelllinien des Pankreas gibt, müssen für die Analyse potentieller Pankreas-CTC/DTC-Marker Modellsysteme herangezogen werden. Es besteht zudem die Notwendigkeit der Analysen von Primärtumorzelllinien und zugehörigen Metastasenzelllinien, da CTCs/DTCs das Verbindungsstück zwischen diesen Erkrankungsformen darstellen. Hierfür wurden noch uncharakterisierte Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor und Metastasen der Leber, Lunge und Milz analysiert, die nach orthotoper Injektion der Zelllinie PaCa5061 in eine SCID-Maus entstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist

- (i) eine Phänotypisierung und Genotypisierung von etablierten Mammakarzinomzelllinien zur Validierung eines epithelialen Markerspektrums, dessen Faktoren in der Literatur bereits eine prognostische Signifikanz bei Tumorerkrankungen zeigten.
- (ii) die Phänotypisierung und Genotypisierung von DTC-Zelllinien (Mamma, Lunge, Prostata), etablierten Pankreaskarzinomzelllinien und Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien anhand des vorliegenden Markerspektrums mit Überprüfung der Anwendbarkeit des epithelialen Differenzierungsmodells der Mammakarzinomzelllinien
- (iii) die Ableitung von Markern, welche für die Detektion und Charakterisierung von CTCs/DTCs im Pankreaskarzinom genutzt werden können.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Anatomische Lage des Pankreas.</i>	1
<i>Abbildung 2 Die metastatische Kaskade.</i>	4
<i>Abbildung 3 Schichtung in der Semidry Blotting-Kammer.</i>	21
<i>Abbildung 4 Temperatur-Zeit-Profil der qPCR-Reaktionen.</i>	27
<i>Abbildung 5 Belegung einer qPCR-Platte für die Bestimmung der relativen Genexpression.</i>	29
<i>Abbildung 6 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf α-Tubulin</i>	31
<i>Abbildung 7 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf EpCAM.</i>	32
<i>Abbildung 8 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf E-Cadherin.</i>	33
<i>Abbildung 9 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf ALCAM</i>	33
<i>Abbildung 10 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf EGFR</i>	34
<i>Abbildung 11 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf ErbB2</i>	35
<i>Abbildung 12 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf ErbB3</i>	35
<i>Abbildung 13 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf CD44.</i>	36
<i>Abbildung 14 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf CD24.</i>	36
<i>Abbildung 15 Western-Blot-Analyse Gruppe II auf α-Tubulin</i>	37
<i>Abbildung 16 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf E-Cadherin</i>	38
<i>Abbildung 17 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf ALCAM</i>	38
<i>Abbildung 18 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf EGFR</i>	39
<i>Abbildung 19 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf ErbB2</i>	40
<i>Abbildung 20 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf ErbB3</i>	40
<i>Abbildung 21 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf CD44</i>	41
<i>Abbildung 22 Bestimmung der relativen Genexpression der RTK EGFR</i>	43
<i>Abbildung 23 Bestimmung der relativen Genexpression des Adhäsionsmoleküls ALCAM</i>	44
<i>Abbildung 24 Bestimmung der relativen Genexpression des Adhäsionsmoleküls EpCAM</i>	45
<i>Abbildung 25 Bestimmung der relativen Genexpression des Zytoskelettproteins CK17</i>	46
<i>Abbildung 26 Bestimmung der relativen Genexpression des Zytoskelettproteins CK19</i>	47
<i>Abbildung 27 Bestimmung der relativen Genexpression des Zytoskelettproteins Vimentin</i>	48
<i>Abbildung 28 Bestimmung der relativen Genexpression des Stammzellmarkers ALDH1</i>	49
<i>Abbildung 29 Bestimmung der relativen Genexpression des Stammzellmarkers CD133</i>	50

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Zelllinien.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabelle 2 Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 3 Parameter für den immunologischen Nachweis verschiedener Proteine</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 4 Mastermix für die qPCR</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 5 Zusammenfassung der relativen Genexpression prognostischer Marker</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 6 Bewertungsmuster der relativen Genexpression.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 8 Übersicht der verwendeten analytischen Kits</i>	<i>80</i>
<i>Tabelle 9 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 10 Übersicht der verwendeten Zytokine</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 11 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 12 Übersicht der getesteten Primer-Sequenzen</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 13 RNA-Konzentration nach Isolierung mittels RNeasy Mini Kit</i>	<i>85</i>

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
28S/18S	S = Svedberg-Einheit
ALCAM	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
ALDH1	Aldehyddehydrogenase 1
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i>
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	complementary DNA
CK(s)	<i>Cytokeratin(s)</i> (Zytokeratin(e))
cm, nm,	Centimeter, Nanometer
CSC(s)	<i>Cancer stem cell(s)</i>
C_T	threshold cycle (Schwellenwert)
CTC(s)	<i>Circulating tumor cell(s)</i> (Zirkulierende Tumorzelle(n))
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTC(s)	<i>Disseminated tumor cell(s)</i> (Disseminierte Tumorzelle(n))

EDTA	E thylend ia mintetraacetat
EGF	<i>E</i> pidermal <i>g</i> rowth <i>f</i> actor
EGFR	<i>E</i> pidermal <i>g</i> rowth <i>f</i> actor <i>r</i> eceptor
EpCAM	<i>E</i> pithelial <i>c</i> ell <i>a</i> dhesion <i>m</i> olecule
FCS	<i>f</i> etal <i>c</i> alf <i>s</i> erum
g	1. Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$) 2. Gramm
GAPDH	G lycerinaldehyd-3- p hosphat- d ehydrogenase
M	m olar
MAPK	<i>M</i> itogen <i>a</i> ctivated <i>p</i> rotein <i>k</i> inase
MEMD	<i>h</i> uman <i>m</i> elanoma <i>m</i> etastasis <i>c</i> lone D
min	M inute
ml	M illiliter
mM	m illimolar
NTC	<i>N</i> o <i>T</i> emplate <i>C</i> ontrol
OD	O ptische D ichte
PVDF	<i>p</i> oly <i>v</i> inylidene <i>d</i> ifluoride
qPCR	(quantitative) <i>P</i> olymerase <i>c</i> hain <i>r</i> eaction (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	<i>R</i> ibonucleic <i>a</i> cid (Ribonukleinsäure)
RPMI	<i>R</i> oswell <i>P</i> ark <i>M</i> emorial <i>I</i> nstitute
RTK(s)	R ezeptortyrosinkinase(n)
SCID	<i>s</i> evere <i>c</i> ombined <i>i</i> mmunodeficient
sek	S ekunde
TE	T rypsin- E thylendiamintetraacetat
V	V olt
λ	Wellenlänge

1 Einführung

1.1 Anatomie und Funktion des Pankreas

Das Pankreas, oder umgangssprachlich die Bauchspeicheldrüse, ist ein Drüsenorgan, welches sowohl exokrine als auch endokrine Funktion besitzt [1, 2]. Es liegt nach vollständiger Entwicklung retroperitoneal zwischen Magen und den großen Bauchgefäßen auf Höhe des 2. Lendenwirbels und lässt sich in 3 wesentliche Abschnitte unterteilen [3]:

- *Caput pancreatis*: Der Pankreaskopf ist der dickste Teil der Bauchspeicheldrüse, er liegt rechts von der Wirbelsäule
- *Corpus pancreatis*: Der längliche, horizontal verlaufende Körper der Bauchspeicheldrüse
- *Cauda pancreatis*: Der Pankreasschwanz, der bis zur Milz reicht.

Das Pankreas ist *anterior* vom Peritoneum und *posterior* von Bindegewebe umgeben (Abbildung 1)

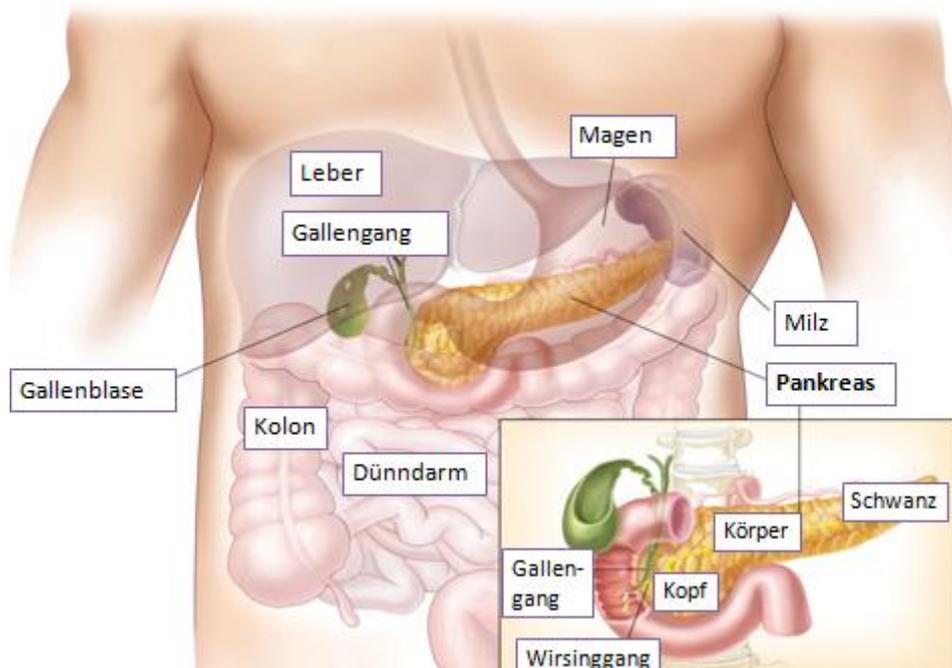


Abbildung 1 Anatomische Lage des Pankreas. Das Pankreas liegt im Retroperitonealraum (hinter dem Bauchfell) zwischen Magen, Milz, Leber und den Blutgefäßen des Bauchraumes. Angelehnt an [4].

Der exokrine Anteil macht etwa 85% des Pankreas aus und wird von den Aszinuszellen und den Duktzellen des Pankreasgangs gebildet. Die Granula der Aszinuszellen sind mit zymogenen Formen von Verdauungsenzymen gefüllt. Hierzu zählen beispielsweise Trypsinogen 1-3, Chymotrypsinogen A und B, Amylase und Lipase [5]. Die endokrine Zellpopulation wird zu 90% von den Langerhansinseln gebildet. Die Inseln sind aus 4 verschiedenen endokrinen Inselzelltypen aufgebaut, die zur Regulation des Blutzuckerspiegels Peptide sezernieren. Je nach Art des Peptides werden diese Inselzelltypen unterschieden in: Insulin sekretierende β -Zellen, die 60-80% innerhalb einer Zellinsel ausmachen, Glucagon produzierende α -Zellen (15%), Somatostatin produzierende δ -Zellen (10%) und pankreatisches Polypeptid produzierende Zellen (< 2%) [5].

1.2 Das Pankreaskarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Histologie

Das Pankreaskarzinom ist eine hoch aggressive Krebsform, die durch invasives Verhalten, schnelle Progression und Behandlungsresistenz gekennzeichnet ist [6]. Obgleich Karzinome des Pankreas eine geringe Inzidenz aufweisen, ist die Mortalität nahezu 100% [7]. Weltweit nimmt Bauchspeicheldrüsenkrebs Platz 13 der Neuerkrankungen maligner Tumore mit durchschnittlich 8-12 Fällen pro 100 000 Personen pro Jahr ein. Hierbei waren 2004 Männer mit 12,6 Fällen pro 100 000 Personen häufiger als Frauen mit 6,7 Fällen pro 100 000 Personen betroffen. Mit 6% aller durch maligne Tumore verursachten Todesfälle findet sich das Pankreaskarzinom auf Rang 4 der tödlichsten Krebserkrankungen. Durch die erschwerten Diagnosebedingungen im frühen Stadium, bedingt durch wenig charakteristische Symptome wie Gewichtsverlust oder Ähnliches, zeigen 52% aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine weit fortgeschrittene Erkrankung. In 24% der Fälle haben sich bereits Metastasen gebildet. Langzeitstudien zeigten, dass die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnose der Erkrankung bei Patienten mit nicht rezidierbaren Tumoren 4-6 Monate, die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich 3% beträgt. Im Vergleich hierzu beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit bei Patienten mit rezidierbaren Tumoren 12-19 Monate, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 15-20%. Zur zweiten Gruppe gehören jedoch lediglich 20% aller Pankreaskarzinompatienten [8]. Eine Hochrechnung des Robert-Koch-Instituts ergab für das Jahr 2010 eine 5-Jahres-Prävalenz von 5600 Frauen und 6300 Männern in Deutschland. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt das Alter der Patienten meist zwischen 60 und 80 Jahren, wobei die Höhe der Inzidenz mit dem Alter korreliert. Neben dem Alter sind Rauchen und Ernährung Risikofaktoren, welche das Auftreten des Pankreaskarzinoms begünstigen können [7, 9].

Etwa 75% aller Pankreaskarzinome sind epithelialen Ursprungs aus den Gangzellen des exokrinen Teil des Pankreas. Das Adenokarzinom ist daher die am häufigsten vorkommende Krebsform des Pankreas [8]. Betroffen sind in 60% der Fälle der Pankreaskopf, in 10% der Fälle der Pankreasschwanz oder der Corpus. In 20% der Fälle ist keine klare Abgrenzung auszumachen. Tumore des Pankreas lassen sich wie alle Karzinome in unterschiedliche Differenzierungsstufen einteilen. Je schlechter differenziert eine Zelle ist, desto unähnlicher ist sie in Morphologie und Phänotyp der Ursprungszelle. Man unterscheidet hierbei die Differenzierungsgrade G1 bis G3, wobei G3 den undifferenzierten Tumortyp darstellt. Die Höhe des Differenzierungsgrades korreliert hierbei mit einer schlechten Prognose [10]. Neben der Bestimmung des Differenzierungsgrades erfolgt die Einteilung der Tumore anhand der TNM-Klassifikation. Die T-Klassifikation beschreibt die Größe und die Lage des Tumors, die N-Klassifikation den Lymphknotenstatus (N-Klassifikation) und die M-Klassifizierung das Auftreten von Metastasen. Häufig geht im Pankreaskarzinom ein hoher Differenzierungsgrad mit einer hohen T- und N-Klassifikation sowie einem positiven Metastasenstatus einher.

1.2.2 Tumorzelldisseminierung

Nicht der Primärtumor des Pankreaskarzinoms, sondern die frühe Streuung von Metastasen in umliegende Organe, ausgelöst durch CTCs während der metastatischen Kaskade, macht das Pankreaskarzinom für eine gezielte Therapie schwierig. Die Metastasierung ist ein Mehrstufenprozess, welcher erstmalig von Fidler *et al.* beschrieben wurde [11]. Hierbei wird zwischen lymphatischer und hämatogener Metastasierung unterschieden (Abbildung 2). Die lymphatische Metastasierung ist ein passiver Prozess. Die hämatogene Metastasierung beschreibt den Metastasierungsprozess über die Blutbahnen des Körpers. Die metastatische Kaskade beginnt hierbei mit der Migration/Invasion des Primärtumors in das Stromagewebe. Sobald Gefäßwände durchdrungen werden, können Einzelzellen aus dem Tumorverband dissoziieren. Diese Zellen befinden sich in der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), einem Phänotyptransformationsprozess von Epithelzellen hin zu Zellen mit mesenchymalen fibroblastenartigen Eigenschaften unter Verlust von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten [12]. Während der EMT werden epitheliale Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und Intermediärfilamente wie Zytokeratine (CKs) herabreguliert [13]. Dies ermöglicht den Zellen ein dynamisches, jedoch unkontrolliertes Bewegungsverhalten. Die Tumorzellen zirkulieren als CTCs im Flüssigkeitsstrom. Der Mechanismus des Arretierens an das Kapillarbett erfolgt zufällig. Es kommt schließlich zur Adhäsion und Extravasation des Gefäßendothels und der Bildung von Metastasen [11]. Der Ort der Metastasierung korreliert mit der Anatomie des Lymph- und Blutflusses. So finden sich

bei Patienten mit Karzinomen des Pankreas häufig Tumoren in Leber und Lunge dem Wege des venösen Rückstroms folgend. Zudem infiltriert das Pankreaskarzinom häufig das Retroperitoneum und befällt anliegende Organe (Milz, Niere, Magen, Leber, Kolon).

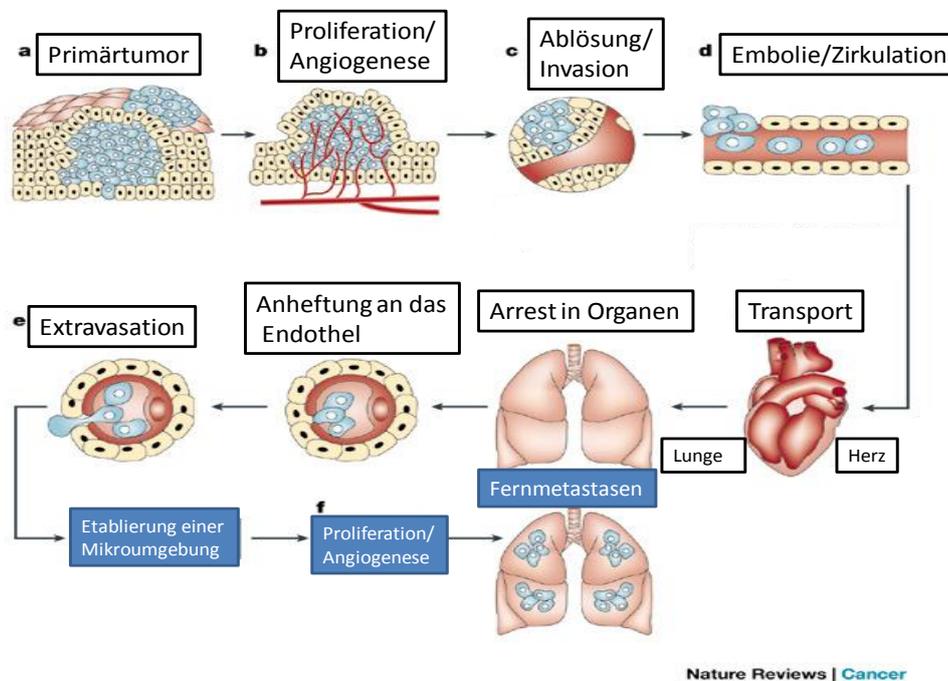


Abbildung 2 Die metastatische Kaskade. Der Tumor ist zunächst von einer intakten Basalmembran umgeben (a). Durch Tumorwachstum können Kapillaren und Gefäße infiltriert werden (b). Durch Veränderungen in Zell-Zell und Zell-Matrix-Verbindungen können sich Tumorzellen vom Gewebsverband lösen und in Lymph- und Blutbahnen gelangen (c und d). Die CTCs können nun Fernmetastasen ausbilden (zeitnah) oder über Jahre hinweg in einem Stillstand verharren und erst dann Metastasen ausbilden (e, f). Angelehnt an [14].

Nach Totalresektion des Primärtumors kann es zum Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen kommen, deren Bildung keiner zeitlichen Limitation unterworfen ist. Betrachtet man die Vorgänge während der metastatischen Kaskade, so können residuale Tumorzellen, welche nach der Tumorzell disseminierung im Knochenmark und Blut der Patienten verbleiben, als Erklärung dienen. Einige wenige CTCs sind in der Lage, sich ins Knochenmark einzunisten und dort in einem Ruhezustand (*dormancy*) zu verweilen. Sie werden als DTCs bezeichnet. Sowohl CTCs als auch DTCs befinden sich der G_0 -Phase des Zellzyklus [15]. Standardtherapieverfahren, welche auf eine gesteigerte Zellproliferation zielen, haben somit keinen Einfluss auf die CTC/DTC-Zellpopulation. Da die Tumorzell disseminierung ein frühzeitiger Prozess in der Tumorprogression ist, kann die Detektion von CTCs im Blut oder DTCs im Knochenmark auf eine Tumorerkrankung hindeuten, welche mittels klassischer bildgebender Verfahren und Serummarkern nicht detektiert werden kann. Es konnte

gezeigt werden, dass die Detektion von DTCs mit dem Auftreten von Rezidiven im Mammakarzinom korrelierte [16]. DTCs eignen sich weniger als Verlaufskontrolle der Therapie. Sie befinden sich in einem Ruhezustand, weisen eine lange Lebensspanne auf und sind schlecht zugänglich. Vielmehr werden DTCs als prognostischer Marker angesehen. Eine klinische Relevanz ließ sich für verschiedene Tumorentitäten zeigen [17]. Bei Patienten mit Mammakarzinom zeigten 30% aller Fälle nach Primäroperation und adjuvanter Chemotherapie eine Persistenz der DTCs des Knochenmarks, was ebenfalls mit einer schlechten Prognose korrelierte [18].

Die Detektion von CTCs im peripheren Blut stellt aufgrund der Zugänglichkeit eine optimale Lösung für eine Verlaufskontrolle dar. Die CTCs weisen im Vergleich zu DTCs eine kurze Überlebenszeit auf [19], was auf eine kontinuierliche Tumorzell dissemination vom Primärtumor hindeutet. Die Bestimmung der Anzahl an CTCs prä- und postoperativ kann über die erfolgreiche Resektion und das Anschlagen der Therapie Auskunft geben. Zurzeit ist jedoch wenig über Phänotypen und Genotypen der CTCs/DTCs des Pankreaskarzinoms bekannt. Eine eindeutige Charakterisierung von CTCs/DTCs anhand eines sensitiven Verfahrens ist daher notwendig. Zudem könnte die Charakterisierung von Pankreas-CTCs/DTCs zu einer angepassten Therapie führen, welche nicht nur auf Primärtumor und Metastasen, sondern ebenfalls auf die Population von DTCs und CTCs zielt und somit ein Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen verhindert.

1.2.3 Diagnose und Therapie

Die Diagnose des Pankreaskarzinoms beruht auf bildgebenden Verfahren wie zum Beispiel Ultraschall, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie in Kombination mit immunohistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten. Tumormarker wie Serum CA19-9 sind für eine differentielle Diagnose schwierig, da neben Patienten mit Pankreaskarzinom auch solche Patienten mit chronischer Pankreatitis einen erhöhten Wert dieses Markers zeigen [20]. In der Verlaufskontrolle der Therapie werden Tumormarker routinemäßig gemessen und können Auskunft über den Therapieerfolg beziehungsweise eines Rezidivs nach Behandlungsabschluss geben.

Als Standardtherapie gilt die kurative chirurgische Therapie, also die Entfernung des befallenen Gewebes. Diese kann je nach Krankheitsstatus mit einer adjuvanten Chemo- oder Strahlentherapie kombiniert werden. Gängige Zytostatika beim Pankreaskarzinom sind beispielsweise 5-Fluorouracil, Adramycin und Mitomycin. Bei Patienten, die eine palliative Therapie erhalten, werden diese Zytostatika ebenfalls eingesetzt [21].

1.3 Prognostische Tumormarker

1.3.1 Zelladhäsionsmoleküle: ALCAM, EpCAM, E-Cadherin

Das Zelladhäsionsmolekül *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) wird im gesunden Gewebe auf Epithelzellen, Fibroblasten, Neuronen sowie in Azinuszellen und Inselzellen des Pankreas exprimiert. Synonym für ALCAM werden *cluster of differentiation* (CD) 166 oder *human melanoma metastasis clone D* (MEMD) in der Literatur verwendet [22-24]. ALCAM ist ein Typ I Glykoprotein und zählt zu der Familie der Immunglobuline. Es besitzt 5 extrazelluläre Immunglobulindomänen, einen Transmembranteil und einen zytoplasmatischen Schwanz. Zunächst wurde seine Funktion als Zelloberflächenligand für CD 6, einem Mitglied der Fresszellrezeptor-Familie, gezeigt [25-27]. Die heterotypische Wechselwirkung (ALCAM-CD6) ist essentiell für die T-Lymphozyt-Aktivierung. Neben der Vermittlung heterotypischer Zell-Zell-Kontakte kommt es zur Ausbildung von homotypischen (ALCAM-ALCAM) Zellverbindungen, die beispielsweise in der Hämatopoese [28] und dem humanen Melanom [24, 29] nachgewiesen werden konnten.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die ALCAM-Expression des Primärtumors als prognostischer Faktor für Patienten mit Mammakarzinom genutzt werden kann [30]. Weitere Studien lassen vermuten, dass ALCAM ebenfalls prognostische Relevanz bei anderen Karzinomarten besitzt. So konnte beispielsweise für das maligne Melanom eine Korrelation zwischen ALCAM Expression und dem Metastasierungspotential von Zelllinien [24], für das Prostatakarzinom ein Zusammenhang zwischen Gleason Tumorstatus und ALCAM Expression gezeigt werden [31]. Kahlert *et al.* konnten 2009 zeigen, dass ALCAM als prognostischer Marker für Patienten mit Pankreaskarzinom genutzt werden kann. An Paraffinschnitten von 97 Pankreaskarzinomen konnte so immunohistochemisch in 54,32% der Fälle eine ALCAM-Expression detektiert werden. Die Stärke der ALCAM-Expression korrelierte hierbei invert mit der mittleren Überlebensrate [32].

Das *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM oder Synonyme 17-1A, HEA125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP34, KSA, TROP-1, ESA, and KS1/4) ist ein 40 Kilodalton (kDa) schweres Glykoprotein, welches Ca^{2+} unabhängige Zell-Zellkontakte homolog vermittelt. Es war das erste tumorassoziierte Antigen, welches 1979 von Herlyn *et al.* entdeckt wurde und für das die erste monoklonale Antikörpertherapie (Panorex®) entwickelt wurde. Neben seiner Expression in gesundem Epithelgewebe wird es in fast allen Adenokarzinomformen (85%), Plattenepithelkarzinomen (72%), Retinoblastomen und hepatozellulären Karzinomen überexprimiert [33, 34]. So zeigen Primärtumore und metastatische Tumore der Mamma eine 100-1000fache Überexpression von EpCAM [35]. Hierbei zeigen die Metastasen eine gesteigerte EpCAM-Expression gegenüber den Primärtumoren [36]. In

oralen Plattenepithelkarzinomen korreliert die EpCAM Expression signifikant mit Tumorgröße und Lymphknotenmetastasen [37]. Zudem wird EpCAM als Marker für die Charakterisierung tumorinitiierender Krebsstammzellen (*cancer stem cells* - CSCs) genutzt [38, 39]. *Gene-Silencing* in der Zelllinie MDA-MB-468 führt zu einer signifikant verringerten Proliferations- (-35 - 80%), Migrations- (-91,8%), und Invasionsrate (-96,4%) in vitro [35]. EpCAM-positive DTCs korrelieren mit einer schlechten Prognose [40]. Dies kann ebenfalls in Patienten mit Prostata- und Ovarialkarzinom gezeigt werden [41, 42]. Die EpCAM-Expression als prognostischer Marker lässt sich jedoch nicht für alle Karzinome verallgemeinern, da EpCAM in seiner Funktion eine Doppelrolle einnimmt. Durch die EpCAM-Expression wird zum einen die Cadherin-induzierte Zelladhäsion reduziert und somit Invasion und Metastasierung gefördert [43, 44], zum anderen werden Invasion und Metastasierung durch seine eigene Rolle als Zelladhäsionsmolekül unterdrückt. So zeigen Patienten mit Ösophagus- und Nierenzellkarzinom eine höhere mittlere Überlebensrate, sofern EpCAM exprimiert war [45, 46]. Bei Karzinomen des Pankreas kann immunohistochemisch eine Überexpression in 85 von 153 Tumoren gezeigt werden (53%), wobei die EpCAM-Expression mit verringerter mittlerer Überlebensrate korreliert [47]. EpCAM stellt daher einen interessanten potentiellen Marker für die Detektion von Pankreas CTCs/DTCs dar.

E-Cadherin gehört zum Subtyp der klassischen Cadherine, die eine Schlüsselrolle bei der Herstellung spezifischer interzellulärer Kontakte spielen. Es besteht aus einer extrazellulären Region, einer Transmembrandomäne und einem zyttoplasmatischen Teil, wobei die extrazelluläre Region die kalziumabhängige homophile Adhäsion vermittelt. In-vitro-Experimente verschiedener Zelllinien zeigen, dass E-Cadherin-exprimierende Tumorzellen kein invasives Verhalten in eine Kollagenmatrix zeigen. Tumorzellen, welche verringerte oder keine Expression zeigten, verhalten sich invasiv [48]. Weitere Untersuchungen stützen die Hypothese einer inversen Korrelation der E-Cadherin-Expression mit Tumorprogression und Metastasierung [49, 50]. Bereits 1994 konnten Pignatelli *et al.* diesen Zusammenhang auch für das Pankreaskarzinom zeigen. Ein Verlust der E-Cadherin-Expression war in Primärtumoren mit Lymphknotenmetastasen (14/23, 61%) im Vergleich zu Lymphknoten-negativen Fällen (3/11, 27%) häufiger vertreten [51]. Zahlreiche Studien untermauern seither die Korrelation zwischen dem Verlust der E-Cadherin-Expression und der Tumorprogression im Pankreaskarzinom [52-54].

1.3.2 *Epidermal growth factor-Rezeptor (EGFR) Familie: EGFR, ErbB2, ErbB3*

Proteinkinasen sind die größte Gruppe der Proto-Onkoproteine. Sie katalysieren die Übertragung eines γ -Phosphats auf den Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest eines Proteins. Obwohl lediglich 0,1% aller Phosphoaminosäureester durch Phosphorylierung von Tyrosinresten entstehen, spielen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung. Sie sind membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren, welche zum Teil Wachstumsfaktoren binden und somit verschiedenste Signalwege aktivieren. Hierzu gehören beispielsweise die *Mitogen activated protein kinase* (MAPK)-, und die PI3K/AKT-Signalwege, welche Zellproliferation und Entwicklung steuern [55].

Das EGFR Familie besteht aus 4 strukturähnlichen RTKs (ErbB1-4) der Größe 160-185 kDa und ist die am häufigsten studierte Zellsignal-Familie der Biologie [56]. RTKs spielen eine Rolle in der Kontrolle fundamentaler Prozesse der Zelle, wie Zellzyklus, Zellmigration, Proliferation und Differenzierung. Gemein ist den Proteinen neben ihrem Aufbau (Wachstumsfaktor-bindende glykolisierte extrazelluläre Domäne, Transmembransegment, intrazelluläre Protein-Tyrosinkinase katalysierende Domäne und einen Tyrosin-haltigen Schwanz) ihr Funktionsprinzip. Eine Bindung von Liganden an den Domänen I-IV der extrazellulären Domäne führt zu Rezeptordimerisierung, Proteinkinase-Aktivierung, Trans-Autophosphorylierung und Initiierung der Signalkaskade [56]. Hierbei bildet EGFR den Rezeptor für verschiedene Liganden (zum Beispiel *epidermal growth factor* (EGF), *tumor growth factor α* (TGF- α)), ErbB3 und ErbB4 bilden Rezeptoren für Neuregulin-Isoformen.

EGFR (ErbB1) war die erste Rezeptortyrosinkinase (RTK), die charakterisiert wurde [57-59]. Eine Überexpression von EGFR findet man in einer Vielzahl von Karzinomarten, wie dem Mammakarzinom [60], Lungenkarzinom [61], dem oralen Plattenepithelkarzinom [62], Kolonkarzinom [62], Pankreaskarzinom [63] und Prostatakarzinom [64]. Zudem konnte häufig eine Korrelation zwischen EGFR-Expression und den Zeichen einer schlechten Prognose wie Tumorstatus, Tumorgröße und Lymphknotenstatus hergestellt werden [62, 65-68]. Auch auf Karzinomen des Pankreas lässt sich in 50% aller Fälle eine Überexpression des EGFR messen. Inwieweit EGFR als prognostischer Marker für Pankreaskarzinome genutzt werden kann, bleibt kontrovers [69, 70].

ErbB2 (Her2-neu) ist ein 185 kDa großes Protein, welches eine 50%ige Homologie zu EGFR aufweist. Es ist in der Sequenz des Protoonkogens Her2/neu codiert. ErbB2 bindet keine Liganden, kann jedoch mit den Mitgliedern der EGFR-Familie Heterodimere bilden und so an der Signalübertragung mitwirken. Untersuchungen am Mammakarzinom zeigten, dass eine Überexpression mit einer schlechten Prognose einhergeht und ErbB2 sowohl in nodal-positiven als auch -negativen Fällen als prognostischer Marker genutzt werden kann [71]. Zudem zeigen etwa 20-25% aller Mammakarzinome eine Amplifikation des ErbB2-Gens [72]. In 35 Kolonkarzinomproben

konnte eine Überexpression von ErbB2 immunohistochemisch (89%) und im NorthernBlot (64%) gezeigt werden [73]. Eine Korrelation mit Tumorgrad und Metastasierungsstatus und somit die Anwendung als unabhängigen prognostischen Marker ist jedoch sowohl bei diesem als auch bei anderen Karzinomarten fraglich [74] [75]. Für das Pankreaskarzinom zeigte sich in 6 (20%) von 31 getesteten Pankreaskarzinomzelllinien eine ErbB2-Amplifikation [76]. In Primärtumoren des Pankreas zeigt sich in 40-60% der Fälle eine ErbB2-Expression, wobei die Intensität in der Immunohistochemie heterogen ist [77] [78]. Über die prognostische Anwendbarkeit von ErbB2 gibt es für das Pankreaskarzinom daher keine einheitlichen Ergebnisse, weshalb die Rolle dieses Faktors weiterer Untersuchungen bedarf [69].

ErbB3 (Her3) wurde erstmalig im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom beschrieben [79]. Schon früh lag die Vermutung einer Co-Überexpression mit EGFR und ErbB2 für eine schlechte Prognose nahe [80-82]. Eine Korrelation der ErbB3-Expression mit Tumorstatus und Lymphknotenmetastasen konnte für das orale Plattenepithelkarzinom [83] gezeigt werden. Für das Ovarialkarzinom ergab sich ein Zusammenhang zwischen ErbB3-Überexpression und schlechter Prognose [84, 85].

In den letzten Jahren konnte am Mammakarzinom gezeigt werden, dass ErbB2 und ErbB3 ein onkogenes Heterodimer bilden. Die Aktivierung von ErbB3 kann nur über diese Heterodimerbildung erfolgen, da ErbB3 keine intrinsische Aktivität besitzt [86]. Patienten mit Mammakarzinom, in welchen sowohl ErbB2 als auch ErbB3-Expression vorhanden waren, zeigten Tumore mit aggressiverem Verhalten und sprachen nicht auf die Tamoxifen-Therapie an [87].

1.3.3 Stammzellmarker: CD24, CD44, CD133, ALDH1

Bei der Charakterisierung von Zellen innerhalb eines Tumors stellte man fest, dass sich der Tumor nicht aus einer homogenen Zellpopulation zusammensetzt. Tumoren sind stattdessen durch die Heterogenität ihrer Zellen gekennzeichnet. Eines der Modelle zur Heterogenität von Tumorzellen ist das CSC-Modell. Dieses geht davon aus, dass lediglich ein geringer Prozentsatz von Tumorzellen innerhalb des Zellverbandes die Fähigkeit zu anhaltender Proliferation besitzt [88]. Um Rezidive und Fernmetastasen zu verhindern, müsste das Entfernen solcher CSCs das Ziel der Therapie sein. Diese Heterogenität von Tumoren innerhalb eines Tumorgewebeverbundes lässt sich mit der Tumorstammzellhypothese erläutern. Lediglich etwa 5% aller Zellen eines Tumors sind zur Selbsterneuerung und Differenzierung fähig [89]. Wendet man die Erkenntnisse normaler Stammzellen auf die CSCs an, so folgt auch die Bildung eines Tumors einem Hierarchiemodell mit verschiedenen Graden der Differenzierung, was zu einer Vielzahl von Zellphänotypen führt.

Der Nachweis von CSCs erfolgte erstmalig im Krankheitsbild der *acute myeloid leukemia* (AML). Proliferationsassays lymphoider Blastzellen zeigten, dass diese Zellen sich in einem postmitotischen Stadium befinden, also stetig neu gebildet werden müssen [90]. Dies deutete auf eine stark proliferierende Zellfraktion als Ursprungsort hin. In-vitro-*Colony forming unit*-Experimente bestätigten die Hypothese von Krebsstammzellen im Leukämie-Modell [91-94]. Dieses CSC-Konzept, welches zunächst lediglich für hämatologische Krebserkrankungen Akzeptanz fand, wird heute auch auf solide Tumoren angewendet. Für die Charakterisierung von CSCs wird hierbei die tumorspezifische Expression von Zelloberflächenmarkern genutzt. So lassen sich CSCs des Mammakarzinoms durch eine CD44-Expression, eine schwache oder nicht vorhandene CD24 Expression und eine nicht vorhandene Lin-Expression (CD44⁺/CD24^{-low}/Lin⁻) charakterisieren [95]. Weniger als 200 Zellen dieser Zellpopulation waren in der Lage, einen Tumor im Xenograft-Modell zu induzieren, während weitere getestete Zellpopulationen, auch bei einer Erhöhung der Zellzahl auf 200 000, keine Tumorinduktion zeigten. Li *et al.* konnten im Pankreaskarzinom mittels Xenograft-Modell eine hoch tumorgene Zellpopulation charakterisieren, welche einen CD44⁺/CD24⁺/EpCAM⁺-Phänotyp zeigte. 100 Zellen dieses Phänotyps waren in der Lage, Tumoren zu bilden, welche sich nur unwesentlich vom Ursprungstumor unterschieden [96].

Bereits vor der Nutzung als CSC-Marker wurde CD24 als prognostischer Marker charakterisiert, so zum Beispiel im Prostata- [97], Mamma- [98], Ovarial- [98], und Bronchialkarzinom [99]. Im Kolorektalkarzinom korreliert CD24 hingegen nicht mit einer schlechten Prognose [100]. Eine Analyse aller Studien zur CD24-Expression 1990-2009 zeigte, dass in 68% (von 2925 untersuchten Karzinomen) eine CD24-Expression vorlag, welche mit positivem Lymphknotenstatus und einer schlechten Prognose korrelierte [101].

CD44 gilt ebenfalls als prognostischer Marker. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD44 und der schlechten Überlebensrate im Pankreaskarzinom konnte schon früh gezeigt werden [102, 103]. Aktuelle Studien belegen eine Gemcytabinresistenz der CD44⁺-Zellpopulation in Pankreaskarzinomen [104], was es zu einem interessanten Therapieziel macht. Zudem konnte gezeigt werden, dass DTCs aus Patienten mit Mammakarzinom CD44 exprimieren [105].

Neben CD24 und CD44 ist auch CD133 ein Stammzellmarker (zum Beispiel neuronale Stammzellen), welcher prognostische Relevanz besitzt. Studien im Kolonkarzinom und Glioblastom zeigten, dass sowohl CD133⁺ als auch CD133⁻ Zellpopulationen in der Lage waren, einen Tumor im Xenograftmodell zu induzieren [106-108]. Auch wenn CD133 damit nicht als charakteristischer CSC-Marker genutzt werden kann, so korreliert die CD133-Expression mit einer schlechten Überlebensrate in Patienten mit Kolon- und kolorektalen Karzinomen [109, 110]. Im Pankreaskarzinom korreliert die Existenz einer CD133⁺-Zellpopulation mit einer schlechten Prognose und verminderter 5-Jahres-Überlebensrate [111]. Des Weiteren konnte man eine CD133⁺/CXCR4⁺ Zellpopulation definieren,

deren Vorhandensein mit einem erhöhten Metastasierungspotential im Pankreaskarzinom einhergeht [112].

Aufgrund der Heterogenität von Tumoren ist eine verlässliche Identifikation des Prozentsatzes an CSCs über Zelloberflächenmarker umstritten. Die Kombination der genannten Stammzellmarker mit der Aktivität von Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1) scheint jedoch ein vielversprechender Ansatz zu sein. ALDH1 ist an der intrazellulären Produktion von Retinolsäure beteiligt, welche wiederum sowohl an der zellulären Differenzierung während der Entwicklung eines Organismus als auch am Schutz des Stammzellpools beteiligt ist [113]. So weist die CD133⁺/ALDH1^{high}/Lin⁻ Zellpopulation Charakteristika von Langzeit-repopulierenden hämatopoetischen Stammzellen im murinen Modell auf [114]. Eine hohe Anzahl von ALDH1^{high}/CD34⁺-Zellen in AML korrelierten mit einer schlechten Prognose [115]. In soliden Tumoren konnten Ginestier *et al.* zeigen, dass eine Subpopulation von Zellen mit erhöhter ALDH1-Aktivität sowohl in normalem Brustgewebe als auch im Mammakarzinom Stammzellcharakter aufweist und dass das Vorhandensein von ALDH1^{high}-Zellen mit einem schlechten Krankheitsverlauf korrelierte [116]. Dies konnte durch mehrere Studien bestätigt und ein Zusammenhang zum Metastasierungspotential des Primärtumors aufgezeigt werden [113, 117]. Zu vermuten ist, dass Tumorstammzelleigenschaften ebenfalls von CTCs/DTCs erfüllt werden müssen, um die Ausbildung von Metastasen zu ermöglichen. Eine gezielte Prognose anhand von Stammzellmarkern mit gezieltem therapeutischem Angriff auf die Population der CSCs könnte somit Tumorprogression und Metastasierung unterdrücken. Aktas *et al.* konnten zeigen, dass 90% aller Mammakarzinompatienten, die CTCs aufwiesen, Therapieresistenz zeigten. Von diesen Patienten zeigten 70% CTCs, welche ALDH1 exprimierten [118]. ALDH1 kann also als prognostischer Marker, sowie als Therapieziel für eine Subpopulation therapieresistenter Krebsstammzellen dienen.

1.3.4 Zytoskelettproteine: CK17, CK19 und Vimentin

Die Zytoskelettproteine dienen der Stabilität der Zellen und wurden aufgrund ihrer Spezifität bereits frühzeitig zur Charakterisierung von Tumorzellen in Abgrenzung zum Tumorstroma genutzt. Hierbei lässt sich eine Unterscheidung in saure CKs: CK9-CK20, basische CKs: CK1-CK8 und Typ III-Intermediärfilamente, zum Beispiel Vimentin, treffen. CKs finden sich im Zytoskelett von Epithelzellen. Hierbei bilden jeweils zwei Monomere ein TypI/TypII-Heterodimer. Das Heterodimer zeigt dabei ein gewisses reguläres Muster: So ist beispielsweise CK8 mit CK18 und CK7 mit CK19 assoziiert [119]. Vimentin findet sich auf Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten,

Endothelzellen und Leukozyten [120]. Im Mammakarzinom konnte bei fortschreitender Tumorprogression ein Verlust der Keratin-Expression mit einer simultanen Vimentin-Zunahme gezeigt werden [121]. Des Weiteren korrelierten eine schlechte 5-Jahres-Überlebensrate und Rückfallquote mit CK5/6 und CK17 positiven Mammakarzinomen [122].

1.4 Pankreaskarzinomzelllinie PaCa5061 im Xenograft-Modell

Zur Untersuchung des Verhaltens von Tumorzellen innerhalb der komplexen Vorgänge im Organismus, werden immunodefiziente Tiermodelle herangezogen. Diesen Modellen fehlen aktive B- und T-Lymphozyten. Sie bieten den Vorteil einer standardisierten Wiedergabe biologischer Vorgänge der Tumorentstehung und Metastasierung. Allen voran steht hier das murine Modell. Für diese Xenograft-Analysen werden Zelllinien benötigt, die die Fähigkeit des Primärtumors zur Metastasierung zeigen. Standard-Zelllinien mit hoher Passagenzahl sind oftmals nicht in der Lage, Metastasen im Tiermodell auszubilden. Kalinina *et al.* etablierten daher 2010 die invasive und aggressive Zelllinie „PaCa5061“ aus einem schlecht differenzierten Adenokarzinom des Pankreas (PT3, PN1 (7/43), G3, M0). Diese Zelllinie zeigte spontane Metastasierung in die Lunge nach subkutaner Injektion in 75% (6/8) aller immunodefizienten PFP⁻/RAG2⁻² Mäuse (NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten defizient). Histologisch ähnelte der Primärtumor des Xenograft-Modells dem resektierten Primärtumor [123]

Neben der subkutanen Injektion besteht die Möglichkeit der orthotopen Injektion humaner Pankreaskarzinomzelllinien in das Pankreas der Versuchstiere. Dieses orthotope Verfahren bietet den Vorteil einer höheren Vergleichbarkeit zum klinischen Fall bezogen auf Tumorwachstum und Metastasierungspotential. Das orthotope Xenograft-Modell wurde in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf an *severe combined immunodeficient* (SCID)-Mäusen (NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten defizient) durchgeführt. Hierbei war besonders ein Versuchstier von Interesse, welches Fernmetastasen in Lunge, Leber und Milz zeigte. Dies stützt die Aussage der hohen Aggressivität und des Invasionspotentials von PaCa5061 stützt. Es erfolgte die Generierung der Zelllinien PT1-PT5 aus Gewebe des Xenograft-Primärtumors sowie der Zelllinien Leber1, Leber2, Lunge und Milz aus den Fernmetastasen, die sich in den jeweiligen Organen des Versuchstieres gebildet hatten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Eine Auflistung aller verwendeten Geräte, Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen, Antikörpern, analytischen Kits, Zytokinen sowie Oligonukleotidprimern findet sich in Appendix A.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Referenz</i>	<i>Kulturmedium</i>
MDA-MB-468 ¹	Mammakarzinom (basal)	[124]	1
Hs578T ¹	Mammakarzinom (mesenchymal)	[125]	1
MDA-MB-231 ¹	Mammakarzinom (mesenchymal)	[124]	1
MCF-7 ¹	Mammakarzinom (luminal)	[126]	1
BT-20 ¹	Mammakarzinom (basal)	[127]	1
BT-474 ¹	Mammakarzinom (luminal)	[128]	1
SKBR-3 ¹	Mammakarzinom (luminal)	[129]	1
BC-M1 ⁴	DTCs-Mammakarzinom	[130]	3
BC-S1 ²	DTCs - Mammakarzinom	[131]	3
LC-M1 ²	DTCs - Lungenkarzinom	[132]	3
PC-E1 ²	DTCs - Prostatakarzinom	[132]	3
PC-M1 ²	DTCs - Prostatakarzinom	[132]	3
Panc-1 ¹	Pankreaskarzinom	[133]	1
Panc-2 ¹	Pankreaskarzinom	[134]	2
BxPc3 ¹	Pankreaskarzinom	[135]	2
PaCa5061 ³	Pankreaskarzinom	[123]	3
PaCa5156 ³	Pankreaskarzinom	-	1
LM 5314 ³	Pankreaskarzinom	-	3

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Referenz</i>	<i>Kulturmedium</i>
LN 5314 ³	Pankreaskarzinom	-	3
PT1-5 ³	Pankreaskarzinom Primärtumor 1-5	Xenograft -	3
Leber1-2 ³	Pankreaskarzinom Lebermetastase 1-2	Xenograft -	3
Lunge ³	Pankreaskarzinom Lungenmetastase	Xenograft -	3
Milz ³	Pankreaskarzinom Milzmetastase	Xenograft -	3

1. American Type Culture Collection – Manassas, USA

2. Institut für Tumorbologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

3. Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

4. Dr. K. Bartkowiak, Institut für Tumorbologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

2.2 Methoden

Die für den Methodenteil verwendeten Reagenzien und Verbrauchsgüter sind, soweit nicht anders verzeichnet, von den in Appendix A genannten Herstellern bezogen worden.

2.2.1 Zellkulturtechnik

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt, sofern nicht anders beschrieben, in einem zellspezifischen Medium bei 37° C und 5% CO₂ (*Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) Medium) beziehungsweise 10% CO₂ (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)) in Luft bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zusammensetzung der Medien zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

<i>Medium</i>	<i>Zusammensetzung</i>
1	90% (v/v) DMEM 10% (v/v) <i>fetal calf serum</i> (FCS) (50 Milliliter (ml)) 40 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
2	90% (v/v) RPMI 10% (v/v) FCS 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
3	90% (v/v) RPMI 10% (v/v) FCS 40 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10 µmol/ml Insulin 10 mg/ml Gentamycin 1 µg/ml FGF 1 µg/ml EGF

Jeder Arbeitsschritt wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Bakterien, Pilzen oder Mycoplasmen zu verhindern. Verbrauchsgüter und Geräte, welche nicht steril geliefert werden, durchlaufen den Sterilisationsprozess der Autoklavierung (feuchte Hitze, Sterilisationsphase 121 °C, 20 Minuten (min)). Medien sowie deren Zusätze sind ebenfalls steril zu halten oder steril zu filtrieren.

2.2.1.1 Auftauen von Zelllinien

Die Aussaat der Zelllinien erfolgt aus Kryokonservaten, welche zur Langzeitaufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierbei wird die im Kryoröhrchen befindliche Zellsuspension zügig im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in 5 ml zellspezifisches Kulturmedium überführt. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt (1200 g, 3 min) wird der Überstand, welcher zytotoxisches Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält, verworfen. Das Zellpellet wird in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und diese Einzelzellsuspension in eine T-25er Zellkulturflasche (25 cm² Wachstumsfläche) ausgesät. Es folgt eine 48-stündige Inkubationsphase, in welcher die Zellen möglichst wenig mechanischen Einfluss erfahren sollten. Standardmäßig wird ein Mediumwechsel alle 48-72 Stunden durchgeführt.

2.2.1.2 Subkultivierung adhärenter Zellen

Erreichen die Zellen Konfluenz, kommt es zu einer Wachstumsinhibierung mit einhergehendem Zellsterben. Es muss ein Subkultivieren der Zellen, also eine Verringerung der Zelldichte erfolgen. Dies erfolgt durch ein Ablösen der Zellen und ein Aussäen auf ein Zellkulturgefäß mit vergrößerter Wachstumsfläche (T-75 Flasche) oder durch eine Aussaat einer verringerten Zellzahl auf ein Gefäß identischer Wachstumsfläche. Wie beschrieben wird das Medium entfernt und die Zellen in PBS gewaschen. 1 ml vorgewärmtes 0,25% Trypsin- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (TE) wird auf den Zellrasen pipettiert. TE ist ein proteolytischer Enzym-Mix, welcher Proteinbindungen, also die Zelladhäsionsmoleküle, spaltet und somit Zell-Matrix und Zell-Zell-Kontakte löst. Nach einer 1- bis 3-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wird die proteolytische Aktivität des TE mit der Zugabe von 4 ml Medium mit abgestoppt. Einem Zentrifugationsschritt (1200 g, 3 min) folgend wird das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine T-75 Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.3 Kryokonservierung

Einfrriermedium

90% (v/v) Zellspezifisches Medium

10% (v/v) DMSO

Eine hohe Passagenzahl sollte in der Zellkultur vermieden werden, da jede Passage als Selektionsschritt angesehen werden kann. Im Laufe der Zeit lassen sich daher in vielen Zelllinien Veränderungen im Phänotyp und der funktioneller Differenzierung beobachten. Um eine hohe Passagenzahl zu vermeiden, werden die Zellen durch Gefrieren konserviert (Kryokonservierung). Hierfür werden die Zellen, wie beschrieben, abgelöst und pelletiert. Es folgt eine Resuspendierung in 3-5 ml Einfriermedium. 1 ml Aliquotes werden in speziellen Gefäße, sogenannten Kryoröhrchen, pipettiert. Die Kryoröhrchen werden in einem speziellen Einfriercontainer (*Mr. Frosty*, Cryo 1 °C Freezing Container) bei -80 °C gelagert. Dieser Einfriercontainer gewährleistet durch die umgebende Isopropanolschicht eine kontinuierliche Reduktion der Temperatur um 1 °C/min. Nach 48-72 Stunden erfolgt das Umsetzen der Kryoröhrchen in den Stickstofftank (-196 °C).

2.2.1.4 Mykoplasmenachweis

Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, ist eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden. Im Gegensatz zu bakterieller oder fungizider Kontamination von Kulturen können Mykoplasmen nicht ohne einen Test erkannt werden. Jede aufgetaute Zelllinie wird daher nach 3 Tagen in Kultur auf Mykoplasmen getestet. Genutzt wird hierfür das auf einer PCR-Reaktion basierende Venor GeM® *Mycoplasma Detection Kit*.

Pro Probe erfolgt ein 10 µl Ansatz bestehend aus 1 µl Puffer, 1 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP)/Primer Mix, 1 µl interne Kontrolle, 0,1 µl Taq-Polymerase, 6,8 µl H₂O und 0,8 µl Medienüberstand der zu testenden Zelllinie. Der Medienüberstand wird zuvor 5 min bei 95° C im *Thermocycler* erhitzt. Die enthaltenen Primer sind spezifisch gegen die 16S-rRNA-Gensequenz gerichtet. Diese amplifizieren entsprechende Sequenzbereiche zahlreicher *Mycoplasma*-, aber auch *Acholeplasma*- und *Ureaplasma*-Spezies. Die interne Kontrolle ermöglicht die Aussage über den erfolgreichen Verlauf der PCR-Amplifikation. Neben den Proben läuft bei jedem Ansatz sowohl eine Positiv- als auch eine Negativ-Kontrolle mit. Nach der PCR-Reaktion (5 min bei 94 °C; 30x Denaturierung (94 °C, 30 Sekunden (sek)), Hybridisierung/*Annealing* (55 °C, 30 sek) und Synthese (72 °C, 30 sek); 7 min bei 72 °C, ∞ bei 20 °C) werden die Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 2%-Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zur Gelelektrophorese gegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der Nucleinsäurestränge und verändert dabei sein Absorptionsspektrum, so dass Nucleinsäurebanden im Agarosegel mit Ultravioletten-Licht sichtbar gemacht werden können. Lediglich Mykoplasmen-negative Zelllinien werden für analytische Zwecke genutzt.

2.2.2 Proteinanalytik

2.2.2.1 Proteinisolierung und Aufreinigung

Lysepuffer

9.8 M Harnstoff
30 mM Tris (pH nicht eingestellt)
15 mM EDTA
1 % SDS.

Zur Herstellung von Proteinlysaten werden die Zelllinien auf 70% Konfluenz in einer T-75-Zellkulturflasche kultiviert. Das Medium wird entfernt und die Zellen 4x mit 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. 350 µl Lysepuffer werden auf den Zellrasen pipettiert. Der Zellaufschluss wird über Scherkräfte mittels Zellschaber unterstützt. Der vorhandene Harnstoff dient als chaotropes Salz. Es bricht die Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen auf und erhöht die Löslichkeit der Proteine. Zusätzlich ist Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Diese Detergenz dient der Permeabilisierung der Membran sowie der Lösung von hydrophoben Molekülen in hydrophilen Lösungen (Phospholipide und Membranproteine). EDTA ist ein Proteaseinhibitor, welcher Metalloproteasen und Komplexbildner inhibiert und somit eine Degradierung der Proteine verhindert. Das Zelllysat wird in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt, auf Eis gelagert und mittels Druckveränderungen durch das Ultraschallgerät UP50H (60 sek, Amplitude=100%, Zeit=50%) homogenisiert. Über Zentrifugation (5 min, 10 000 g) werden Zelltrümmer abgetrennt und das Proteinlysat in ein frisches 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Bis zur Nutzung wird das Proteinlysat bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Coomassie Färbelösung:

0,5% Coomassie brilliant blue
40% Methanol
10% Essigsäure

Um einen Vergleich verschiedener Proteinlösungen zu gewährleisten, muss ein quantitativer Nachweis der Proteinmenge erbracht werden. Dies erfolgt mittels spektralem Absorptionskoeffizient, welcher die Farbreaktion der funktionellen Gruppen der Proteine mit einem farbstoffbildenden Reagenz misst.

Für die Konzentrationsmessung wird der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) mit einhergehender Bildung eines Farbkomplexes zwischen BCA und Cu^+ . Die Reaktion wird durch die Peptidbindungen von Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Cystin induziert.

Der wasserlösliche BCA/ Cu^+ -Komplex zeigt eine lineare Absorption der Wellenlänge $\lambda=562$ nm. Anhand der Bildung des Farbkomplexes kann ein Nachweis der Proteinkonzentration bei $\lambda=562$ nm erfolgen. Die BCA-Reagenz besteht hierbei aus BCA-Lösung 1 (enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Detektionsreagenz und Natriumtartrat in 0,2M NaOH) und 2% BCA-Lösung 2 (4%ige Kupfersulfatlösung). Zunächst wird hierfür eine Verdünnungsreihe mit einem Protein bekannter Konzentration (Albuminstandard 2 mg/ml) angesetzt, welches zur Ermittlung der Standardkurve dient. Zudem wird der Rinderserumalbumin (BSA)-Standardreihe die gleiche Menge Lysemix wie den Proben zugesetzt. Für die Durchführung werden die Proben in 3fach-Bestimmung sowie die Verdünnungsreihe mit BCA-Reagenz 1:20 versetzt (zum Beispiel 0,1 ml Probe + 2 ml BCA-Reagenz) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgt die Messung der Absorption im Spektrophotometer gegen den Blindwert (H_2O und Lysemix). Zur Berechnung der Konzentration wird die Standardkurve genutzt. Zur Überprüfung der gemessenen Konzentrationen durchlaufen 15 μg jeder Probe den Prozess der SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.3). Die Proteinbanden im Gel können nun mit Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht werden. Bei korrekter Konzentrationsmessung und somit identischer Auftragsmenge aller Proben sollten alle Proteinbanden eine identische Blau-Intensität aufweisen.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer

0,5 M Trizma® Base

13,8 mM SDS

pH= 6,8

Trenngelpuffer

1,5 M Trizma® Base

13,8 mM SDS

pH= 8,8

Probenpuffer

225 mM Trizma® Base
5,43 M Glycerin
173 mM SDS
75 mM Bromphenolblau
238 mM DTT
pH= 6,8

Elektrodenpuffer

24,7 mM Trizma® Base

19,1 mM Glycin

3,5 mM SDS

Zur Auftrennung der Proteine wird das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese von Laemmli genutzt [136]. Man unterscheidet hierbei zwischen einem Sammelgel (*stacker*) und einem Trenngel (*separation gel*). Als Trenngel wird ein 10% Polyacrylamidgel verwendet. Der 50-ml-Ansatz des Gels setzt sich aus 20 ml H₂O, 16,6 ml Acrylamid Rotiophorese® Gel 30, 20 µl N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED) und 12,5 ml Trenngelpuffer zusammen. Zuletzt erfolgt die Zugabe von 10% Ammoniumpersulfat (APS), welches die Polymerisation der Acrylamidketten durch TEMED initialisiert. Das Trenngel-Gemisch wird zügig zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit 1-2 ml Isopropanol überschichtet, um eine ebenmäßige Gelgrenze und eine korrekte Polymerisierung der oberen Gelschicht zu erreichen. Nach Aushärten des Trenngels wird das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit 10 ml Sammelgel (10 ml H₂O, 1,7 ml Acrylamid Rotiophorese® Gel 30, 10 µl N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED), 1,25 ml Sammelgelpuffer und 10% APS) überschichtet. Während der Aushärtung dient ein Kamm für die Bildung der Probenaschen. Der Kamm wird entfernt und die Gel/Glass-Verbindung in die Elektrophoresekammer überführt, welche mit Elektrodenpuffer befüllt ist.

Die Proteinproben (20-40 µg) werden vor der Gabe in die Probenaschen mit 5x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C inkubiert. Das im Probenpuffer enthaltende SDS dient der Überdeckung der Eigenladung der Proteine, so dass sich eine konstante Ladungsverteilung bei einer Bindung von ca 1,4g SDS/g Protein zeigt. Ohne die Behandlung mit SDS käme es bei Proteinen desselben Molekulargewichts zu unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten aufgrund unterschiedlicher Lade-Masse-Verhältnisse. Zusätzlich unterstützt SDS das Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen und DTT spaltet die Disulfidbrücken. Der Farbstoff Bromphenolblau dient als Kontrolle der Taschenbeladung. Als Größenmarker werden 7 µl V peqGOLD verwendet.

Durch Anlegung einer Spannung entsteht ein elektrisches Feld in der Elektrophorese-Kammer, in welchem die Proteine wandern. Im Sammelgel erfolgt zunächst die Konzentrierung der Proteine in einer Lauffront (120 Volt (V), ~45 min), bevor im Trenngel eine Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine anhand des durch die Porengröße des Gels bestimmten Siebeffekts erfolgt (200 V, ~90 min).

2.2.2.4 Semidry Blotting

Transferpuffer

48 mM Trizma® Base
 39 mM Glycin
 1 mM SDS
 20% (v/v) Methanol

Das Gel wird aus den Glasplatten gelöst und für das *Immunoblotting* in Transferpuffer überführt. Die *poly vinylidene difluoride* (PVDF) Membran wird für 5 min in Methanol geschwenkt und ebenfalls in Transferpuffer überführt. Wie in Abbildung 3 gezeigt, werden Gel und Membran von einer Schicht aus Filterpapier (mit Transferpuffer durchtränkt) umgeben und in der *Semidry-Blotting*-Kammer eingeschlossen. Die Proteine werden in einem 60-minütigen Vorgang aus dem Acrylamidgel auf die PVDF-Membran elektrotransferiert, wobei für die angelegte Stromstärke die Größe der Membranoberfläche entscheidend ist. Es gilt eine Stromstärke von 3 Milliampere/cm².

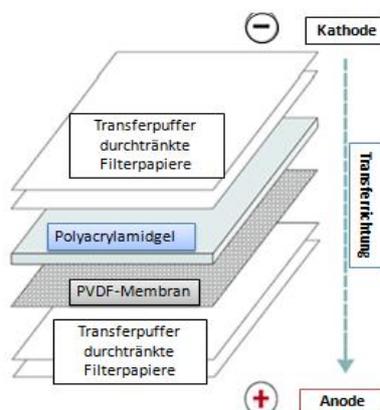


Abbildung 3 Schichtung in der *Semidry Blotting*-Kammer. Die Proteinbanden im Polyacrylamidgel werden auf die PVDF-Membran elektrotransferiert. Die mit Transferpuffer durchtränkten Filterpapiere bilden hierbei das Milieu für den Transfer. Angelehnt an [137].

2.2.2.5 Immunologischer Nachweis der Proteine auf der PVDF-Membran

<u>10xTBS</u>	200 mM Trizma® Base 1,37 M NaCl pH=7,6
<u>TBS-T-Puffer</u>	1xTBS 0,1% (v/v) Tween 20
<u>Strip I</u>	0,2 M Glycin x HCL pH=1,8
<u>Strip II</u>	62,5 mM Trizma® Base 70 mM SDS 100 mM β-Mercaptoethanol pH=6,7
<u>Blockierlösungen</u>	5% Milchpulver in 1x TBS-T 5% BSA in 1x TBS-T 5% Milchpulver 3% BSA in 1xTBS-T

Im Anschluss an den Elektrotransfer erfolgt die Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran mittels indirekter Antikörpermethode. Hierfür wird die Membran zunächst für 60 min in passender Blockierlösung (Tabelle 3) geschwenkt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Im Anschluss erfolgt die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (AK I) für 12-16 Stunden. Dieser bindet an ein spezifisches Epitop auf dem passenden Antigen (Zielprotein). Um den AK I-Proteinkomplex sichtbar zu machen, wird die Membran nach 4x15 min Waschen in 1xTBS-T-Puffer im sekundär Antikörper (AK II) für 90 min inkubiert.

AK II ist gegen AK I gerichtet und mit Peroxidase gekoppelt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Zugabe des Entwicklungssubstrates, das als Hauptbestandteile Wasserstoffperoxid und Luminol enthält. Durch das Zusammenspiel von Peroxidase, Wasserstoffperoxid und Luminol wird eine Chemilumineszenzreaktion auf der Membran ausgelöst, welche mit dem Proteingehalt korreliert.

Die Membran wird mit Folie geschützt und in einer Hypercassette™ lichtgeschützt verschlossen. Beim Auflegen eines Röntgenfilmes auf die Membran in der Hypercassette™ wird dieser proportional zur Intensität der Chemilumineszenzreaktion belichtet. Der Schwärzegrad und die damit verbundene Detektion von Proteinbanden lassen sich anhand der Filmbelichtungszeit variieren. Die Filmentwicklung erfolgt mittels Hyper processor.

Jede Membran erlaubt die Detektion von bis zu 3 Proteinen. Hierfür werden die bestehenden AKI/AKII-Bindungen vom membrangebundenen Protein abgelöst (*Strippen*). Zunächst wird die Membran für 30 min in Striplösung I geschwenkt. Anschließend wird 3x10 min in TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgt eine 70-minütige Inkubationsphase in Striplösung II. Anschließend wird erneut gewaschen, und die Detektion eines weiteren Proteins mittels immunologischem Nachweis kann erfolgen.

Tabelle 3 Parameter für den immunologischen Nachweis verschiedener Proteine

<i>Antikörper</i>	<i>Größe [kDa]</i>	<i>Wirtstier</i>	<i>Blockierlösung</i>	<i>AK I</i>	<i>AK II</i>
ALCAM	110	Maus	5% Milch	1:1000 in 5% BSA	1:1500 in 5% Milch
EpCAM	55	Maus	5% BSA	1:1000 in 5% BSA	1:1500 in 5% BSA
E-Cadherin	97	Kaninchen	5% BSA	1:2x10 ⁶ in 5% Milch	1:1500 in 5% Milch
EGFR	170	Kaninchen	5% Milch	1:3000 in 5% Milch	1:1500 in 5% Milch
ErbB2	180	Kaninchen	5% Milch	1:3000 in 5% Milch	1:1500 in 5% Milch
ErbB3	180	Kaninchen	5% Milch	1:500 in 5% Milch	1:1500 in 5% Milch
CD24	36	Maus	3% BSA & 5% Milch	1:1500 in 5% BSA	1:1500 in 5% Milch
CD44	80	Kaninchen	5% Milch	1:10000 in 5% Milch	1:2000 in 5% Milch
α-Tubulin	55	Kaninchen	5% Milch	1:40000 in 5% BSA	1:1500 in 5% Milch

2.2.3 Nukleinsäureanalytik

2.2.3.1 Primerdesign und Effizienzbestimmung

Primer werden mit Hilfe der Programme Primer3Plus, *ReverseComplement*, UCSC in-silico PCR und PerlPrimer v. 1.1.18 erstellt. Die Synthese erfolgt über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg – Deutschland). Der Zusatz F bezeichnet den vorwärtsgerichteten Primer (*forward*) der Zusatz R den rückwärtsgerichteten Primer (*reverse*) (siehe

Tabelle 12). Alle genannten Primer werden auf ihre Effizienz mittels einer Verdünnungsreihe mit *human reference complementary* Desoxyribonukleinsäure (huRef cDNA) mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) getestet (Kapitel 2.2.3.5). Die Bestimmung der Effizienz erfolgt anhand der logarithmischen Auftragung der cDNA-Menge gegen den erhaltenen Schwellenwert (C_t -Wert). Der C_t -Wert markiert hierbei den Amplifikationszyklus, bei welchem ein exponentielle Zunahme des Amplifikats zu beobachten ist. Eine Übersicht mit den Effizienzen aller getesteten Primer findet sich in Appendix A2.

Für die Berechnung der Effizienz ergibt sich:

$$I. \quad E = 10^{\frac{-1}{m \cdot \ln(10)}}$$

Für die Genexpressionsanalysen werden solche Primerpaare genutzt, die eine Effizienz zwischen 0,85-1 zeigen und deren Schmelzkurve auf ein spezifisches Amplifikat hinweist.

2.2.3.2 Ribonukleinsäure-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA) wird mittels Prinzip der Anionenaustauschchromatographie über das RNeasy® Mini Kit an einem speziell für RNA-Arbeiten vorgesehenen und mit RNaseZap® gereinigten Arbeitsplatz isoliert. Alle verwendeten Materialien sind steril, RNase- und DNase-frei. Bei Konfluenz der Zelllinie in einer T-25-Zellkulturflasche wird das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgt auf chemischem (1 ml RLT-Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol) und mechanischem Weg (Zellschaber).

Das Zelllysate wird zur Homogenisierung auf einen QIAshredder™ pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min, 10 000 g) wird der Durchsatz mit 1 Volumenanteil Ethanol versetzt und auf die RNeasy Mini Säule pipettiert. Durch Zugabe von Ethanol werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA-Molekülen und OH-Silikat-Atomen ausgebildet, und die RNA wird selektiv an die Silikagel-Membran der Säule gebunden.

Da verbleibende genomische DNA in der qPCR stören würde, erfolgt ein DNA-Verdau mittels *RNase-free DNase Set*. Hierzu werden 10 µl DNase1-Mix mit 70 µl RDD-Puffer versetzt, auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an verschiedene Waschschriffe zur Entfernung von DNA-Bruchstücken, Salzen und Ethanolresten wird die Säule in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und die RNA mittels 60 µl RNase-freiem H₂O (3 min Inkubation, Zentrifugation 1 min, 10 000g) eluiert. Die eluierte RNA wird sofort auf Eis oder bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

2.2.3.3 RNA-Quantifizierung und Integritätstest

Die Konzentration der erhaltenen RNA-Lösung wird mittels Spektralphotometer (*Nanodrop™-ND-1000*) bestimmt. 1 µl Probenvolumen wird hierfür direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Es entsteht anhand der Oberflächenspannung ein Messweg in Form einer Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Spektralphotometers. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$. Anhand der graphischen Darstellung des Bereiches 220-350 nm können zusätzlich Verunreinigungen detektiert werden. Reine RNA zeigt einen Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} von 1,9-2,1. Hierbei entspricht eine optische Dichte (OD)=1 einer RNA-Konzentration von 40ng/µl. Die RNA-Konzentration berechnet sich zu:

$$\text{II. } \text{Konzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Die gemessenen Konzentrationen finden sich in Appendix A3.

Vor der Nutzung der RNA zur cDNA-Synthese wird die RNA auf ihre Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese getestet. Scharfe Banden der humanen 18S und 28S ribosomalen RNA sichern das Ergebnis der erfolgreichen RNA-Isolierung und nur solche Proben wurden für die Genexpressionsanalysen verwendet.

2.2.3.4 Erststrang-cDNA-Synthese

Zur Herstellung codierender Genabschnitte nutzt man das Prinzip der Reversetranskriptase (RT). Hierbei ist die isolierte RNA Ausgangspunkt der cDNA-Synthese. Für die Herstellung werden Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer verwendet, welche mit dem Poly(A)Schwanz der *messenger* RNA (mRNA) hybridisieren. Es folgt die Synthese des komplementären DNA-Stranges durch Bindung der RT (Enzym aus *MMLV-moloney murine myoblast virus*). Durch Polymerisation entsteht ein DNA/RNA-Hybrid. Der RNA-Strang wird durch Einsatz von Rnase H abgebaut, so dass ein cDNA-Einzelstrang entsteht.

Praktische Durchführung der cDNA-Synthese mittels Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primern

Für die Synthese des cDNA-Einzelstranges wird das *First Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet. 5 µg RNA werden mit 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern versetzt und mit Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O) auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht. Es folgt eine 5-minütige Inkubation bei 65° C, um die Sekundärstrukturen der Proteine aufzubrechen (Denaturierung). Im Anschluss werden die Proben sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Zum RNA-Nukleotidgemisch werden 4µl 5x *Reaction Buffer*, 1 µl RiboLock™ RNase-Inhibitor (20 µg/µl), 1µl 10 mM dNTP Mix 2 und 1 µl RevertAid™ M-MuLV *Reverse Transcriptase* gegeben, so dass das Reaktionsvolumen jeder Probe 20 µl entspricht. Für die Synthese des cDNA-Einzelstranges werden die Reaktionsansätze 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss folgt eine 5-minütige Inkubationsphase bei 70 °C. Diese dient der Inaktivierung der enzymatischen Aktivität und somit dem Stopp der Reaktion. Jeder Probe wird 20µl DEPC-H₂O zugefügt, so dass sich eine Konzentration von 125 ng/µl bei einer angestrebten Erststrang-Synthese-Effizienz von 100% ergibt. Die Proben werden bis zur Verwendung in der qPCR bei -80 °C gelagert.

Neben dem Probenmaterial laufen eine Negativkontrolle (H₂O) und eine Positivkontrolle (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-RNA) mit. Diese Proben dienen der Kontrolle der erfolgreichen Transkription. Hierfür werden 8 µl der Positiv- und Negativkontrolle mit 2 µl 6xDNA loading Dye versetzt und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Für die Nutzung der Proben in der qPCR sollten keine Banden in der Negativ-Kontrolle sowie eine Bande der Größe von 496 Basenpaaren (bp) in der GAPDH-Kontrolle zu sehen sein.

2.2.3.5 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die PCR wurde 1983 von K.B. Mullis entwickelt. Sie ermöglicht es, bereits kleinste Mengen an spezifischen Nukleinsäuresequenzen mit hoher Ausbeute *in vitro* zu amplifizieren. Die PCR macht sich hierbei die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, DNA zu duplizieren. Hierfür wird ein Abschnitt doppelsträngiger DNA mit freiem 3'-OH-Ende benötigt, an welchen die Polymerase bindet, zudem freie Einzelnukeotide zur Verlängerung des Einzelstranges. Das klassische PCR-Verfahren besteht hierbei aus 3 aufeinanderfolgenden Temperaturstufen. Zunächst werden die DNA-Doppelstränge bei 92-98° C denaturiert. Es folgt eine Abkühlung der Reaktion auf die *annealing*-Temperatur zur Anlagerung der Primer, gefolgt von der Erhöhung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, was eine schnelle Verlängerung der Primer gewährleistet (*extension*). Das für alle PCR-Reaktionen verwendete Temperatur-Zeit-Profil zeigt **Fehler! erweisquelle konnte nicht gefunden werden.**

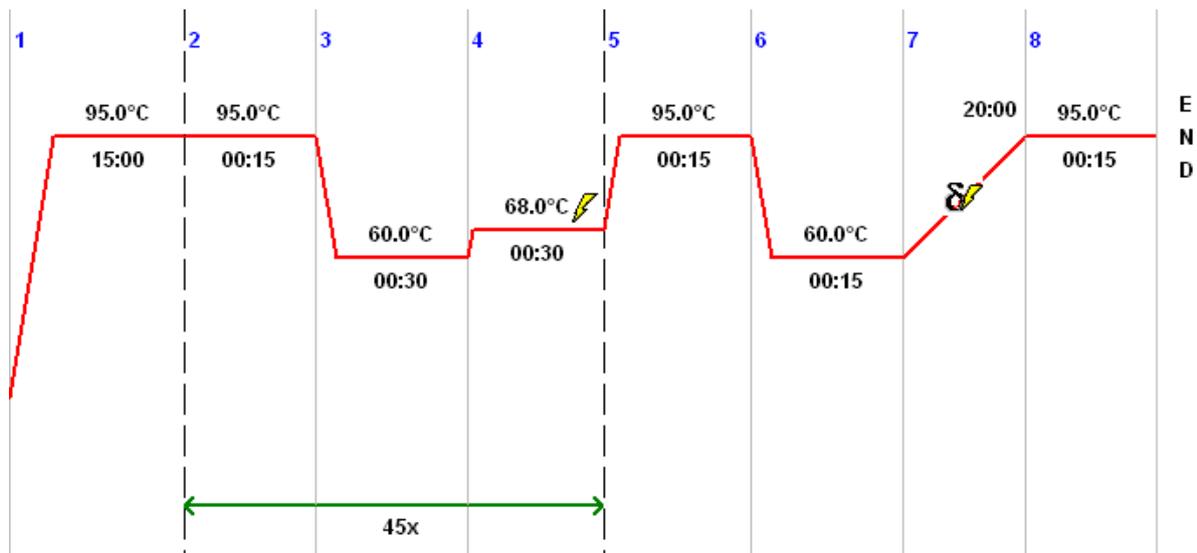


Abbildung 4 Temperatur-Zeit-Profil der qPCR-Reaktionen. Im Anschluss an einen längeren Denaturierungsschritt folgen 45 Replikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (95 °C), Annealing (60 °C) und Extension (68 °C). Um die Spezifität der Amplifikation zu testen, wird nach dem 45. Zyklus eine Schmelzkurve aufgezeichnet, indem die Temperatur um 1,75 °C/min erhöht wird.

Denaturierung, *Annealing* und *Extension* können beliebig oft wiederholt werden. In jedem Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der Nucleotidsequenz bei 100% Effizienz des Primerpaares. Die PCR-Reaktion amplifiziert die DNA-Sequenz exponentiell bis zu dem Punkt, an welchem die PCR Komponenten verbraucht sind. Hier bildet sich eine Plateau-Phase aus.

Die qPCR stellt eine Erweiterung der klassischen PCR da. Synonym wird häufig *real-time* PCR in der Literatur genutzt. Die qPCR ermöglicht eine Quantifizierung der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz. SYBR-Green interkaliert mit doppelsträngigen Nucleotidsequenzen, was zur Emittierung eines Fluoreszenzsignals führt. Das gemessene Fluoreszenzsignal korreliert dabei mit der Anzahl an cDNA-Amplifikaten. Die Messung erfolgt im Anschluss an jeden PCR-Zyklus. Da SYBR-Green ebenfalls an unspezifische Doppelstränge (beispielsweise Primerdimere) bindet, wird nach Erreichen der Plateau-Phase die Temperatur schrittweise von 60 °C auf 95 °C erhöht (Schmelzkurvenanalytik). Dieses Vorgehen dient der Kontrolle der Spezifität. Die Temperatur, bei welcher das doppelsträngige PCR-Produkt denaturiert, wird als Schmelztemperatur bezeichnet. An diesem Punkt kommt es zu einer drastischen Abnahme des Fluoreszenzsignals, welche in der Schmelzkurvenanalyse als Peak dargestellt wird. Spezifität des verwendeten Primerpaares ist gegeben, wenn lediglich ein Peak in der Schmelzkurve sichtbar ist.

Relative Quantifizierung der Genexpression

Zur Quantifizierung wird die $\Delta\Delta C_t$ Methode genutzt. Der C_t -Wert definiert den PCR-Zyklus, bei welchem die Amplifikation durch optimale Bedingungen in die exponentielle Phase eintritt. Je höher die Ausgangszahl der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz, desto eher tritt die exponentielle Phase ein. Die Quantifizierung des Produktes erfolgt normalisiert auf humane Referenz DNA (huRef) und ein Referenzgen (*Housekeeping*-Gen). Zudem wurde genomische DNA getestet, auf welcher die Primerpaare kein Amplifikat bilden sollten.

Das Referenzgen muss die Eigenschaft besitzen, konstant exprimiert zu sein, ohne durch interne oder externe Einflüsse reguliert zu werden. In der vorliegenden Arbeit wird β -2-Mikroglobulin (β_2M) als *Housekeeping*-Gen genutzt. Es codiert für die Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I, welcher sich zur Antigenpräsentation auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen befindet. Für die Berechnung der relativen Genexpression gilt:

$$\text{III. } \Delta C_t (\text{Probe}) = C_t(\text{GenofInterest}) - C_t(\beta_2M)$$

$$\text{IV. } \Delta C_t (\text{huRef}) = C_t(\text{Genofinterest}) - C_t(\beta_2M)$$

$$\text{V. } \Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{huRef})$$

$$\text{VI. } FC = (\text{Primer Effizienz})^{-\Delta\Delta C_t}$$

Praktisches Vorgehen:

Auf einer 96-well qPCR Platte ist es möglich, die cDNA aus 9 verschiedenen Proben in 3fach-Bestimmung für zwei prognostische Marker sowie β_2M zu messen. Zeitgleich läuft für jeden Marker die Referenz-cDNA in 3fach-Bestimmung sowie eine Negativkontrolle (NTC-no template control) mit. Zunächst erfolgt das Ansetzen der Primer auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ l. Die Primer werden bis zur Zugabe in den sogenannten Mastermix auf Eis gelagert. Die cDNA-Proben werden auf eine Konzentration von 12,5 ng/ μ l in 10 μ l Gesamtvolumen eingestellt. Für jedes Primerpaar wird ein Mastermix angesetzt, der kurz gevortext, abzentrifugiert und auf Eis gelagert wird. Die Zusammensetzung zeigt Tabelle 4.

Die qPCR-Platte wird auf einem Eisblock gekühlt, und jede Probenkammer mit 14 μ l des passenden Mastermix versehen (Abbildung 5). Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 1 μ l cDNA, so dass ein PCR-Volumen von 15 μ l vorhanden ist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PT4 cDNA 1:10 EGFR	Milz cDNA 1:10 EGFR	PT4 cDNA 1:10 ALCAM	Milz cDNA 1:10 ALCAM	PT4 cDNA 1:10 B2M	Milz cDNA 1:10 B2M	LM5314 cDNA 1:10 EGFR	BC-M1 cDNA 1:10 EGFR	LM5314 cDNA 1:10 ALCAM	BC-M1 cDNA 1:10 ALCAM	LM5314 cDNA 1:10 B2M	BC-M1 cDNA 1:10 B2M
B	PT4 cDNA 1:10 EGFR	PaCa5156 cDNA 1:10 EGFR	PT4 cDNA 1:10 ALCAM	PaCa5156 cDNA 1:10 ALCAM	PT4 cDNA 1:10 B2M	PaCa5156 cDNA 1:10 B2M	LM5314 cDNA 1:10 EGFR	MDA468 cDNA 1:10 EGFR	LM5314 cDNA 1:10 ALCAM	MDA468 cDNA 1:10 ALCAM	LM5314 cDNA 1:10 B2M	MDA468 cDNA 1:10 B2M
C	PT4 cDNA 1:10 EGFR	PaCa5156 cDNA 1:10 EGFR	PT4 cDNA 1:10 ALCAM	PaCa5156 cDNA 1:10 ALCAM	PT4 cDNA 1:10 B2M	PaCa5156 cDNA 1:10 B2M	LM5314 cDNA 1:10 EGFR	MDA468 cDNA 1:10 EGFR	LM5314 cDNA 1:10 ALCAM	MDA468 cDNA 1:10 ALCAM	LM5314 cDNA 1:10 B2M	MDA468 cDNA 1:10 B2M
D	Leber1 cDNA 1:10 EGFR	PaCa5156 cDNA 1:10 EGFR	Leber1 cDNA 1:10 ALCAM	PaCa5156 cDNA 1:10 ALCAM	Leber1 cDNA 1:10 B2M	PaCa5156 cDNA 1:10 B2M	LN5314 cDNA 1:10 EGFR	MDA468 cDNA 1:10 EGFR	LN5314 cDNA 1:10 ALCAM	MDA468 cDNA 1:10 ALCAM	LN5314 cDNA 1:10 B2M	MDA468 cDNA 1:10 B2M
E	Leber1 cDNA 1:10 EGFR	NTC EGFR	Leber1 cDNA 1:10 ALCAM	NTC ALCAM	Leber1 cDNA 1:10 B2M	NTC B2M	LN5314 cDNA 1:10 EGFR	NTC EGFR	LN5314 cDNA 1:10 ALCAM	NTC ALCAM	LN5314 cDNA 1:10 B2M	NTC B2M
F	Leber1 cDNA 1:10 EGFR	hu Ref cDNA 1:10 EGFR	Leber1 cDNA 1:10 ALCAM	hu Ref cDNA 1:10 ALCAM	Leber1 cDNA 1:10 B2M	hu Ref cDNA 1:10 B2M	LN5314 cDNA 1:10 EGFR	BxPc3 cDNA 1:10 EGFR	LN5314 cDNA 1:10 ALCAM	BxPc3 cDNA 1:10 ALCAM	LN5314 cDNA 1:10 B2M	BxPc3 cDNA 1:10 B2M
G	Milz cDNA 1:10 EGFR	hu Ref cDNA 1:10 EGFR	Milz cDNA 1:10 ALCAM	hu Ref cDNA 1:10 ALCAM	Milz cDNA 1:10 B2M	hu Ref cDNA 1:10 B2M	BC-M1 cDNA 1:10 EGFR	BxPc3 cDNA 1:10 EGFR	BC-M1 cDNA 1:10 ALCAM	BxPc3 cDNA 1:10 ALCAM	BC-M1 cDNA 1:10 B2M	BxPc3 cDNA 1:10 B2M
H	Milz cDNA 1:10 EGFR	hu Ref cDNA 1:10 EGFR	Milz cDNA 1:10 ALCAM	hu Ref cDNA 1:10 ALCAM	Milz cDNA 1:10 B2M	hu Ref cDNA 1:10 B2M	BC-M1 cDNA 1:10 EGFR	BxPc3 cDNA 1:10 EGFR	BC-M1 cDNA 1:10 ALCAM	BxPc3 cDNA 1:10 ALCAM	BC-M1 cDNA 1:10 B2M	BxPc3 cDNA 1:10 B2M

Abbildung 5 Belegung einer qPCR-Platte für die Bestimmung der relativen Genexpression. In jedem Slot sind Probenbezeichnung (PT4, Leber1 etc.), cDNA-Verdünnung (1:10) sowie das Gen von Interesse (EGFR, ALCAM, β_2M) genannt.

Tabelle 4 Mastermix für die qPCR

	μl Ansatz	Vol. pro	Vol. Gesamt für MasterMix	Anzahl der Ansätze plus Reserve
Gesamt	15		525	35
2x Syber-Green-Mix	7,5		262,5	
Rprimer For	0,4		14	
Primer Rev	0,4		14	
cDNA (1:10)	1			
H ₂ O	5,7		199,5	

Die Platte wird mittels MicroAmp™ *Optical Adhesiv* Film verschlossen und für 30 sek bei 2500 g zentrifugiert. Im Anschluss wird die Platte in den Mastercycler egradient S überführt und das Temperatur-Zeit-Profil im Programm realplex eingestellt. Nach Verlauf der qPCR können im Programm realplex der C_t-Wert und die Schmelzkurve jeder Probe analysiert werden. Der Mittelwert der 3 C_t-Werte jeder Probe geht in die Berechnung der relativen Genexpression durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ein.

3 Ergebnisse

3.1 Western-Blot-Analyse

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse wurden in zwei Gruppen eingeteilt. In Gruppe I, „humane Tumorzelllinien“, fallen hierbei die Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468, BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1, Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156 und PaCa5061. Die Gruppe II umfasst die bislang nicht charakterisierten oder veröffentlichten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien. Zudem findet sich in dieser Gruppe jeweils eine Zelllinie aus Primärtumoren der Mamma (MDA-MB-468) und des Pankreas (Panc-2) sowie die DTC-Zelllinie BC-M1. Die Expressionswerte der Proteine der Gruppe II werden hierbei ins Verhältnis zu der gut charakterisierten Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 gesetzt, um einen technischen Bezugswert zu erhalten. Proteinlysate aller Zelllinien wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, aufgearbeitet und durchliefen den Prozess der SDS-PAGE und des *Semidry-Blottings*. Die Bedingungen zum immunologischen Nachweis der verschiedenen Proteine sind in Tabelle 3 aufgelistet.

3.1.1 Proteinexpressionsanalyse der Gruppe 1: Humane Tumorzelllinien

α -Tubulin dient aufgrund seines konstitutiven Vorkommens in den Mikrotubuli jeder Zelle als Ladekontrolle. Alle Proben zeigen ein Signal bei 55 kDa nach α -Tubulin-Färbung und können somit für weitere Western-Blot-Analysen genutzt werden (Abbildung 6).

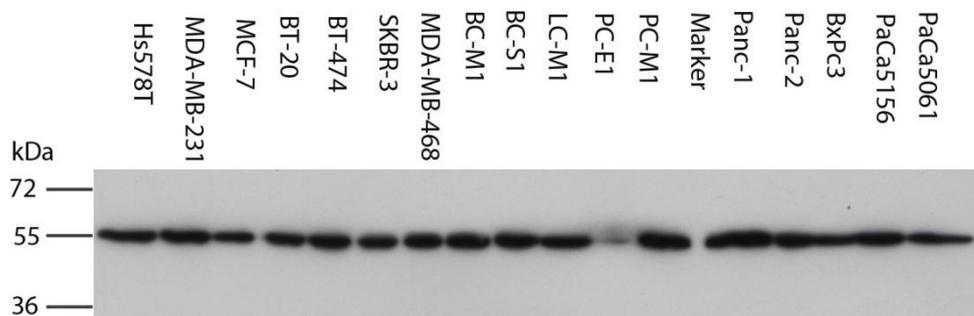


Abbildung 6 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf α -Tubulin (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1) sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Links sind die Positionen des Molekularmarkers in kDa indiziert. Alle Zelllinien zeigen ein Signal bei etwa 55 kDa, was der Größe von α -Tubulin entspricht.

3.1.1.1 Zelladhäsionsmoleküle: EpCAM, E-Cadherin, ALCAM

Epitheliale Primärtumore des Mammakarzinoms exprimieren das Protein EpCAM. Daher kann die Western-Blot-Analyse für die Expression dieses Proteins in den untersuchten Zelllinien Aufschluss über deren epithelialen Differenzierungsgrad geben. Bei allen epithelial differenzierten Brustkrebszelllinien wird eine Expression von EpCAM nachgewiesen (MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3 und MDA-MB-468) (Abbildung 7). Bei der Zelllinie MDA-MB-231 sowie der Zelllinie Hs578T handelt es sich um eine Mammakarzinomzelllinie mit Krebsstamm/Progenitorzell-Phänotyp. Für diese Zelllinien sowie für die DTC-Zelllinien und Primärtumorzelllinien des Pankreas wird kein Signal für EpCAM beobachtet.

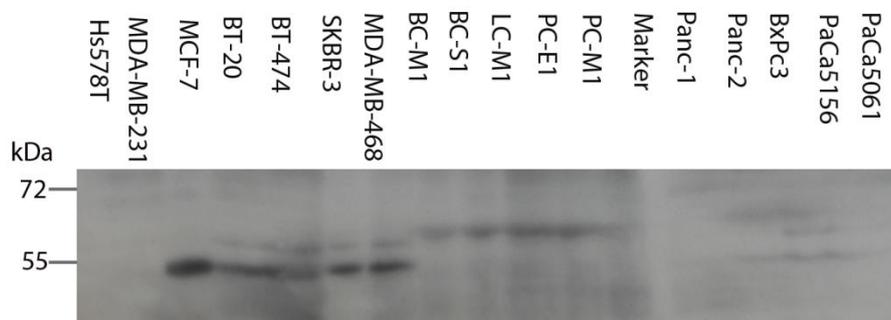


Abbildung 7 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf EpCAM (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1) sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein Signal bei 55 kDa ist bei den Primärtumorzelllinien MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3 und MDA-MB-468 zu erkennen.

Die E-Cadherin-Expression kann Aufschluss über den epithelialen oder mesenchymalen Phänotyp der Zelllinien geben, wobei eine geringe Expression auf den mesenchymalen Typ hindeutet. Dementsprechend dient die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 als Positiv-, [138] die mesenchymale Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 als Negativkontrolle [139] (Abbildung 8). In den epithelial-differenzierten Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, BT-20, BT-474) kann eine erhöhte E-Cadherin-Expression gegenüber der Positivkontrolle gezeigt werden. Die Zelllinien MDA-MB-231 sowie die verwandte Zelllinie Hs578T aus einem Mammakarzinom mit mesenchymalem Phänotyp zeigen kein Signal. Ebenso zeigen die kaum differenzierte Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 sowie die DTC-Zelllinien kein Signal für E-Cadherin-Expression. Die epitheliale Mammakarzinomzelllinie SKBR-3 sowie Panc-2 zeigen eine abgeschwächte E-Cadherin-Expression.

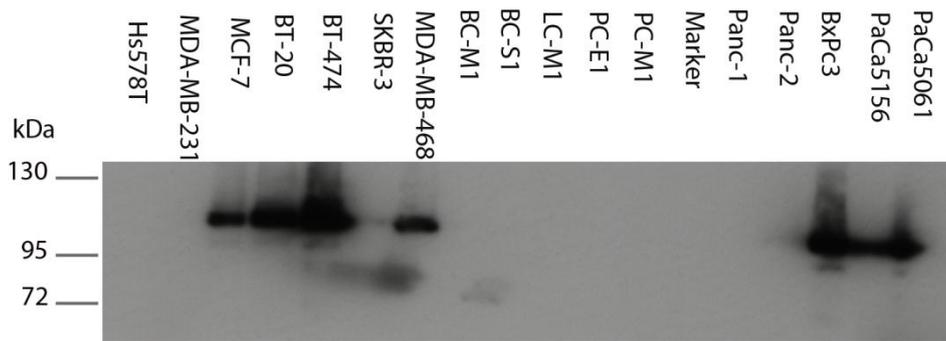


Abbildung 8 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf E-Cadherin (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1), sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein stark positives Signal bei ~97 kDa ist für die Zelllinien MCF-7, BT-20, BT-474, MDA-MB-468, BxPc3, PaCa5156 und PaCa5061 zu erkennen. Ein schwaches Signal kann für SKBR-3 und Panc-2 detektiert werden.

ALCAM ist sowohl ein mesenchymaler Stammzellmarker als auch ein Adhäsionsmolekül. Die ALCAM-Expression kann eine Aussage über das Metastasierungspotential und den Stammzellcharakter der vorliegenden Zelllinien geben. Als Positivkontrolle diente die mesenchymale Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 [140]. Alle disseminierten Tumorzelllinien zeigen ALCAM-Expression, wobei diese bei der Zelllinie PC-M1 mit der Expressionsstärke der Positivkontrolle übereinstimmt, jedoch innerhalb der DTC-Zelllinien am schwächsten ausgeprägt ist. Zudem kann die ALCAM-Expression bei den Zelllinien Hs578T, BT-474 und Panc-1 beobachtet werden, wobei BT-474 ein vergleichbares Signal zu den disseminierten Tumorzelllinien zeigt (Abbildung 9). Ein sehr schwaches Signal zeigt sich bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und der Pankreaskarzinomzelllinie PaCa5156. Die epithelial-differenzierten Zelllinien SKBR-3, Panc-2, BxPc3, sowie PaCa5061 zeigen kein Signal nach dem immunologischen Nachweis von ALCAM.

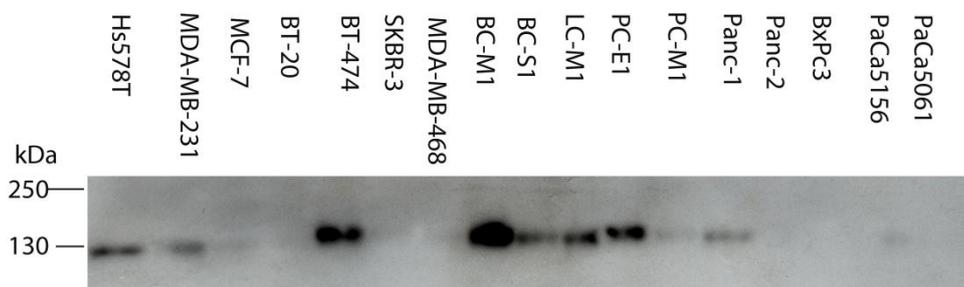


Abbildung 9 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf ALCAM (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1) sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein positives Signal bei ~130 kDa ist für die Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, BT-474, BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1, Panc-1 und PaCa5156 zu erkennen.

3.1.1.2 EGFR-Familie: EGFR, ErbB2, ErbB3

Die Expression der RTKs kann ebenfalls Aufschluss über die Migrationsfähigkeit und das Metastasierungspotential der Zelllinien geben. Als Negativkontrolle im immunologischen Nachweis von EGFR dient die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, als Positivkontrolle die stark proliferierende Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 (Abbildung 10) [141]. Die Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, die keine EGFR-Amplifikation aufweisen und mesenchymalen Phänotyp besitzen [141], zeigen ein schwaches Signal im Vergleich zur Positivkontrolle. Bei den epithelial-differenzierten Mammakarzinomzelllinien BT-20, BT-474 und SKBR-3 kann eine ähnliche EGFR-Expression wie bei der Positivkontrolle beobachtet werden. Bei den Primärtumorzelllinien des Pankreas zeigt die Zelllinie Panc-1, welche einen mesenchymalen Phänotyp besitzt und schlecht differenziert ist [142], ebenso wie die DTC-Zelllinien, kein Signal. Für den immunologischen Nachweis von EGFR der DTC-Zelllinie BC-M1 wurde ein zusätzlicher Versuch durchgeführt, der in Abbildung 10 durch einen weißen Rahmen kenntlich gemacht ist. Die mäßig differenzierte Zelllinie BxPc3 zeigt ein abgeschwächtes, die verbleibenden Zelllinien des Primärtumors eine ähnliche EGFR-Expression wie die Positivkontrolle.

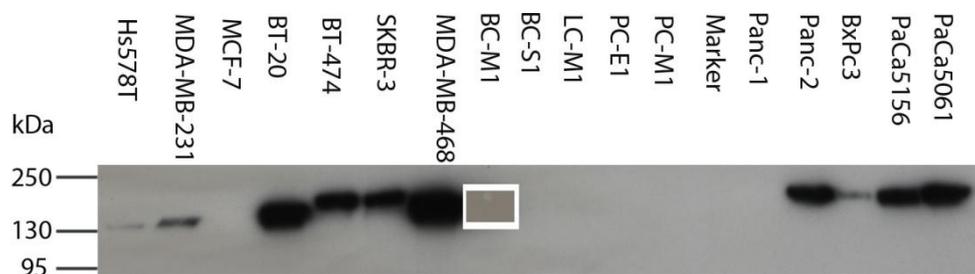


Abbildung 10 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf EGFR (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1) sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein positives Signal bei ~170 kDa ist für die Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, BT-474, SKBR-3, Panc-2, PaCa5156 und PaCa5061 zu erkennen. Ein schwaches Signal kann für BxPc3 detektiert werden.

Die RTK ErbB2 führt bei Überexpression wie EGFR zur Aktivierung tumorassoziierter Signalwege, was zu einer gesteigerten Zellproliferation führt. Die erhöhte Expression korreliert hierbei mit aggressivem Tumorwachstum, verstärkter Metastasierung und schlechter Prognose für den Patienten. MDA-MB-468 dient hierbei als Negativ-, SKBR-3 als Positivkontrolle [143]. Die epithelial-differenzierten Mammakarzinomzelllinien BT-20 und BT-474 zeigen eine starke ErbB2-Expression, ebenso wie Panc-2, BxPc3, PaCa5156 und PaCa5061. Um die geringe ErbB2-Expression der Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7 und Panc-1 zu detektieren, wurde eine lange

Belichtungszeit gewählt. Dies hat bei den stark positiven Zelllinien eine Überbelichtung zur Folge (Abbildung 11). Bei den disseminierten Tumorzelllinien kann keine ErbB2-Expression beobachtet werden.

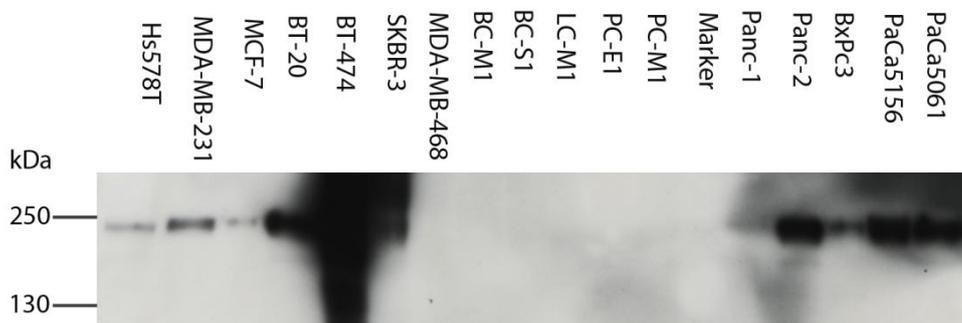


Abbildung 11 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf ErbB2 (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1), sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein positives Signal bei ~180 kDa ist für die Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, BT-474, SKBR-3, Panc-2, BxPc3, PaCa5156 und PaCa5061 zu erkennen. Ein schwaches Signal kann für MCF-7 und Panc-1 detektiert werden.

Für ErbB3 dient die Mammakarzinomzelllinie SKBR-3 als Positivkontrolle [144]. In allen Primärtumorzelllinien der Mamma kann eine ErbB3-Expression festgestellt werden. Hierbei zeigt die stark-invasive Mammakarzinomzelllinie Hs578T die schwächste Expression im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 12). Die Primärtumorzelllinien des Pankreas Panc-1, Panc-2 und PaCa5156 zeigen eine schwache, BxPc3 eine starke ErbB3-Expression. Die ErbB3-Expression der Zelllinie PaCa5061 liegt unter der Nachweisgrenze. Innerhalb der DTC-Zelllinien kann lediglich bei PC-M1 ein schwaches Signal beobachtet werden.

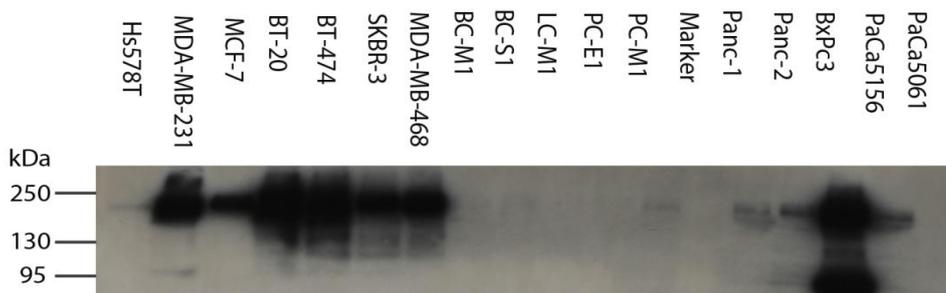


Abbildung 12 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf ErbB3 (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1), sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein positives Signal bei ~180 kDa ist für die Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468, Panc-1, Panc-2, BxPc3 und PaCa5156 zu erkennen. Ein schwaches Signal kann für Hs578T und PC-M1 detektiert werden.

3.1.1.3 Stammzellmarker: CD24, CD44

Die Expression des Stammzellmarkers CD44 kann Aufschluss über einen Stammzellphänotyp der Zelllinien geben. MDA-MB-231 gilt für die CD44-Expression als Positivkontrolle Hs578T, und MDA-MB-468 zeigen ein schwaches Signal nach CD44-Färbung, während bei den schwach-invasiven Mammakarzinomzelllinien MCF-7, BT-20, BT-474 und SKBR-3 kein Signal zu beobachten ist (Abbildung 13). Die DTC-Zelllinien zeigen eine deutliche CD44-Expression, wobei sie bei LC-M1 abgeschwächt ist. Bei den Tumorzelllinien des Pankreas ist bei Panc-1, Panc2 sowie PaCa5156 eine erhöhte CD44-Expression im Vergleich zur Positivkontrolle beobachten.



Abbildung 13 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf CD44 (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1) sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Ein Signal bei ~80 kDa ist für die Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, MDA-MB-468, BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1, Panc-1, Panc-2 und PaCa5156 zu erkennen.

Der immunologische Nachweis für CD24 wurde durchgeführt (n=2), ließ jedoch aufgrund vieler unspezifischer Signale keine Bewertung des Ergebnisses zu (Abbildung 14).

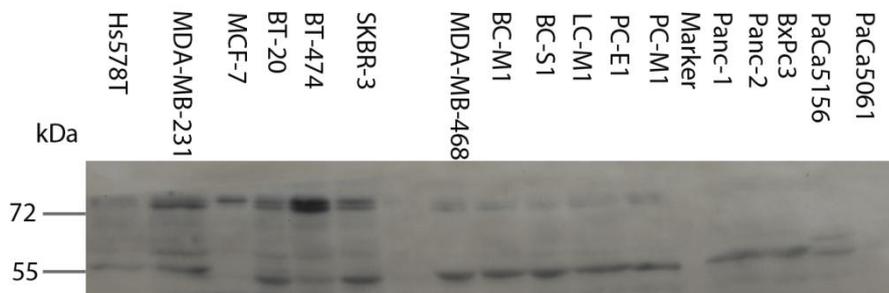


Abbildung 14 Western-Blot-Analyse der Gruppe I auf CD24 (n=2) für die aufgeführten Mammakarzinomzelllinien aus Primärtumoren (Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-468), DTC-Zelllinien (BC-M1, BC-S1, LC-M1, PC-E1, PC-M1), sowie Pankreaskarzinomzelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061). Aufgrund der Vielzahl von Signalen konnte keine Auswertung vollzogen werden.

3.1.2 Proteinexpressionsanalyse der Gruppe 2: Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien

α -Tubulin dient aufgrund seines konstitutiven Vorkommens in den Mikrotubuli jeder Zelle als Ladekontrolle. Alle Proben zeigen ein Signal bei 55 kDa nach α -Tubulin-Färbung und können somit für weitere Western-Blot-Analysen genutzt werden (Abbildung 15).

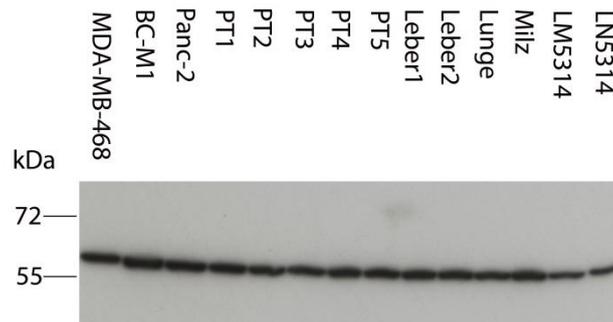


Abbildung 15 Western-Blot-Analyse Gruppe II auf α -Tubulin (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1. Links sind die Positionen des Molekularmarkers in kDa indiziert. Ein Signal ist bei ~55 kDa für alle Zelllinien zu erkennen.

3.1.2.1 Zelladhäsionsmoleküle: EpCAM, E-Cadherin, ALCAM

Wie bereits in 1.3 beschrieben, diente die Untersuchung der Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und ALCAM der Bestimmung des epithelialen Differenzierungsgrads der Zelllinien. Die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 dient für die E-Cadherin-Expression als Positivkontrolle [138]. Alle Xenograft-Tumorzelllinien zeigten eine verstärkte E-Cadherin-Expression im Vergleich zu MDA-MB-468. Zudem exprimiert die Zelllinie LM5314 E-Cadherin in einer ähnlich hohen Menge wie MDA-MB-468. Die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1 sowie die humanen Tumorzelllinien Panc-2 (Primärtumor) und LN5314 (Lymphknotenmetastase) zeigen kein Signal (Abbildung 16).

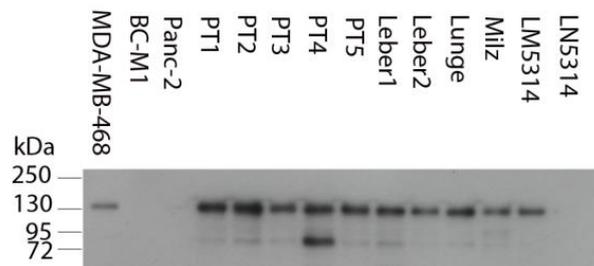


Abbildung 16 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf E-Cadherin (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1. Ein positives Signal bei ~130 kDa ist für alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie MDA-MB-468 und LM5314 zu beobachten. Panc-2, BC-M1 und LN5314 zeigen kein Signal.

Als Positivkontrolle für die ALCAM-Expression dient die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1 (Abbildung 9). Alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien zeigen eine ähnliche ALCAM-Expression, jedoch leicht erhöht im Vergleich zu BC-M1. Zudem sind MDA-MB-468 und LN5314 ALCAM in Relation zu BC-M1 schwächer ALCAM-exprimierend. Bei den Zelllinien Panc-2 sowie LM5314 lässt sich kein Signal nach ALCAM-Färbung beobachten (Abbildung 17).

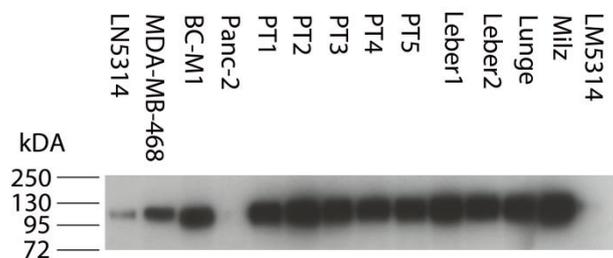


Abbildung 17 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf ALCAM (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1. Ein positives Signal bei ~130 kDa ist für alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie MDA-MB-468, BC-M1 und LN5314 zu beobachten. Panc-2 und LM5314 zeigen kein Signal.

Der Western-Blot für EpCAM wurde durchgeführt (n=4), ließ jedoch aufgrund einer Vielzahl unspezifischer Banden keine Bewertung des Ergebnisses zu.

3.1.2.2 EGFR-Familie: EGFR, ErbB2, ErbB3

Die RTKs EGFR, ErbB2 und ErbB3 sind, wie bereits in 8 erwähnt, häufig überexprimierte Rezeptoren in Primärtumoren epithelialen Ursprungs. Als Positivkontrolle für die EGFR-Expression dient die stark proliferierende Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 (Abbildung 18) [141].

Alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien mit Ausnahme Milz weisen eine erhöhte EGFR-Expression im Vergleich zu MDA-MB-468 auf. Ebenso ist eine schwache Expression in der Zelllinie Panc-2 zu erkennen. Bei der disseminierten Tumorzelllinie BC-M1 kann genau wie bei den humanen Metastasen (LM5314, LN5314) kein EGFR-Signal beobachtet werden.

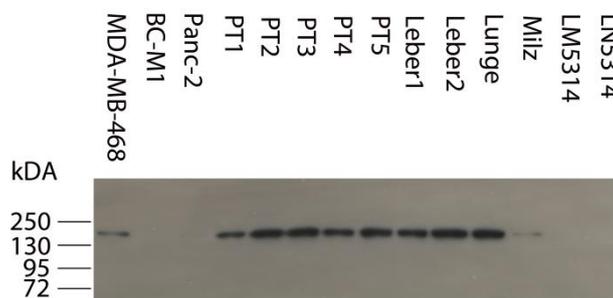


Abbildung 18 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf EGFR (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die DTC-Zelllinie BC-M1. Ein positives Signal bei ~170 kDa ist für alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie MDA-MB-468 zu beobachten. Panc-2, BC-M1, LM5314 und LN5314 zeigen kein Signal.

MDA-MB-468 dient für die ErbB2-Expression als Negativkontrolle [143]. Mit Ausnahme der Zelllinie LN5314 zeigen alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien, BC-M1 und Panc-2 eine ähnlich hohe ErbB2-Expression (Abbildung 19).

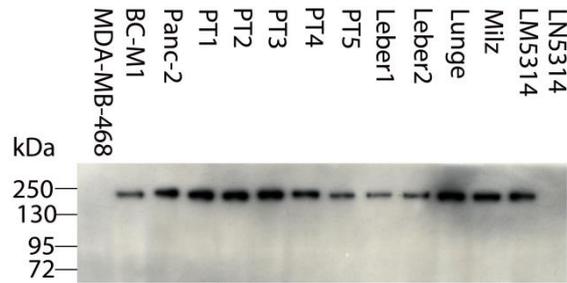


Abbildung 19 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf ErbB2 (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1. Ein positives Signal bei ~170 kDa ist für alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie BC-M1, Panc-2 und LM5314 zu beobachten. MDA-MB-468 und LN5314 zeigen kein Signal.

Als Positivkontrolle für die ErbB3-Expression dient MDA-MB-468. Alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie LM5314 zeigen eine erhöhte ErbB3-Expression in Relation zur Positivkontrolle, deren Signal schwach ausgeprägt ist. Zusätzlich zeigt Panc-2 eine ErbB3-Expression, die identisch zur Positivkontrolle ausgeprägt ist (Abbildung 20). Bei der disseminierten Tumorzelllinie BC-M1 und der Lymphknotenmetastasen-Zelllinie LN5314 lässt sich kein ErbB3-Signal beobachten.

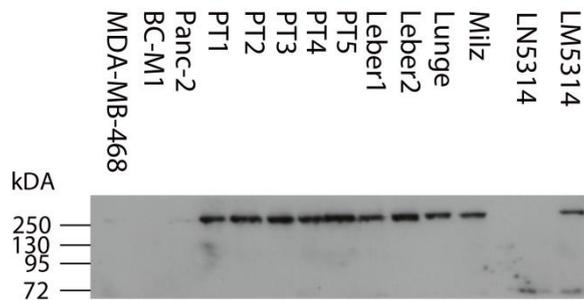


Abbildung 20 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf ErbB3 (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1. Ein positives Signal bei ~250 kDa ist für alle Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie LM5314 zu beobachten. MDA-MB-468 und Panc-2 zeigen ein schwaches, BC-M1 und LN5314 zeigen kein Signal.

3.1.2.3 Stammzellmarker: CD24,CD44

CTCs aus Patienten mit Mammakarzinom sind CD44 exprimierend [105]. Die CD44-Expression kann also Aufschluss über einen Stammzellphänotyp der Zelllinien geben. BC-M1 dient hierbei als Positivkontrolle (Abbildung 13). Die humane Pankreaskarzinomzelllinie Panc-2 zeigt eine deutlich erhöhte CD44-Expression gegenüber der disseminierten Tumorzelllinie. Alle zusätzlich aufgetragenen Zelllinien zeigen kein Signal nach CD-44 Immunprinting (Abbildung 21).

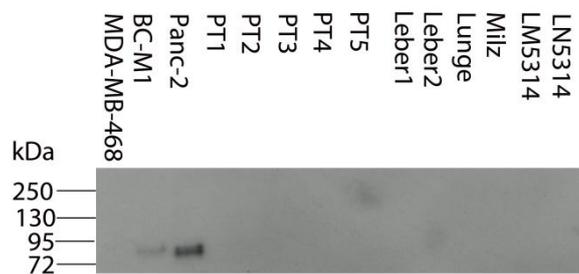


Abbildung 21 Western-Blot-Analyse der Gruppe II auf CD44 (n=2) für die aufgeführten Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors (PT1-PT5) sowie der zugehörigen Metastasen aus Leber, Lunge und Milz (Leber1-2, Lunge, Milz). Zusätzlich finden sich Pankreastumorzelllinien aus humanem Primärtumor (Panc-2) und humanen Metastasen aus Leber und Lymphknoten (LM5314, LN5314) sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1. Ein positives Signal bei ~80 kDa ist für die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1 und die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 zu erkennen. Die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien sowie die humanen Pankreaszelllinien zeigen kein Signal.

Der Western-Blot für CD24 wurde durchgeführt, ließ jedoch aufgrund vieler unspezifischer Banden keine Bewertung des Ergebnisses zu.

3.2 Genexpressionsanalyse: Quantitative PCR

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse wurde die RNA der Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien PT1-PT5, Leber1-Leber2, Lunge und Milz, der Primärtumorzelllinien des Pankreas (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5156, PaCa5061) und der Mamma (MDA-MB-468), der Zelllinien aus Leber- und Lymphknotenmetastasen eines Pankreaskarzinompatienten (LM5214, LN5314) und die DTC-Zelllinie (BC-M1) wie in 2.2.3 beschrieben isoliert, der cDNA-Strang synthetisiert und eine qPCR mittels SYBR-Green-Methode durchgeführt. Die Bestimmung der relative Genexpression wird für die EGFR, ALCAM, EpCAM, ALDH1, CD133, CK17, CK19 und Vimentin durchgeführt. Hierfür wird die cDNA in einer Konzentration von 12,5 ng/μl eingesetzt. Ziel der Analyse ist es, den Umfang der Transkription solcher Gene zu messen, welche für prognostische Marker codieren. Die vorliegenden Änderungen in der Genexpression (*Fold Change*) kann Aufschluss über die Herauf- oder Herabregulierung von Genen geben, welche die multiplen Regulationsvorgänge während der metastatischen Kaskade beeinflussen. Zudem könnten sich neue Marker für den klinischen Nachweis von Pankreas CTCs/DTCs ableiten lassen.

Die als Rohdaten der qPCR-Messungen erhaltenen C_t -Werte werden mittels der experimentell ermittelten Primereffizienzen in relative Expressionsniveaus umgerechnet. Als Bezugspunkt bei der relativen Quantifizierung dient ein Normalisierungsfaktor, der aus dem Expressionsniveau des konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gens β_2M ermittelt und ins Verhältnis zum huRef-Expressionsniveau gesetzt wird. Für die Bewertung des relativen *Fold Change* (FC) wird Tabelle 6 herangezogen. Ein FC=1 entspricht hierbei der Norm bezogen auf Housekeeping-Gen und huRef-RNA.

Für die Amplifikation des Housekeeping Gens β_2M wird für alle genannten qPCR-Reaktionen folgendes Primerpaar mit angegebener Effizienz genutzt:

β_2M (vorwärts)	5'-CTCCGTGGCCTTAGCTGTG-3'	Effizienz 0,97
β_2M (rückwärts)	5'-CCATTCTCTGCTGGATGACG-3'	

3.2.1 Genexpressionsanalyse der Rezeptortyrosinkinase EGFR

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression von EGFR wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,91 zeigt, verwendet:

EGFR-(vorwärts)	5'-TCTTGCAGCGATACAGCTCAG-3'	Effizienz 0,91
EGFR-(rückwärts)	5'-TTGGGAACGGACTGGTTTATG-3'	

Als Positivkontrolle dient die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468. Diese zeigt eine sehr starke Überexpression von EGFR mit einem FC von 54,86. Zusätzlich zu MDA-MB-468 zeigt die Zelllinie PaCa5156 ebenfalls eine sehr starke Überexpression (FC=15,74). Die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien weisen mit einem FC von 1,5-2,65 eine schwache EGFR-Überexpression auf, die gegenüber der Primärtumorzelllinie PaCa 5061 (FC=3,53) leicht vermindert ist (Abbildung 22). Die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1 zeigt keine messbare EGFR-Expression auf mRNA-Ebene.

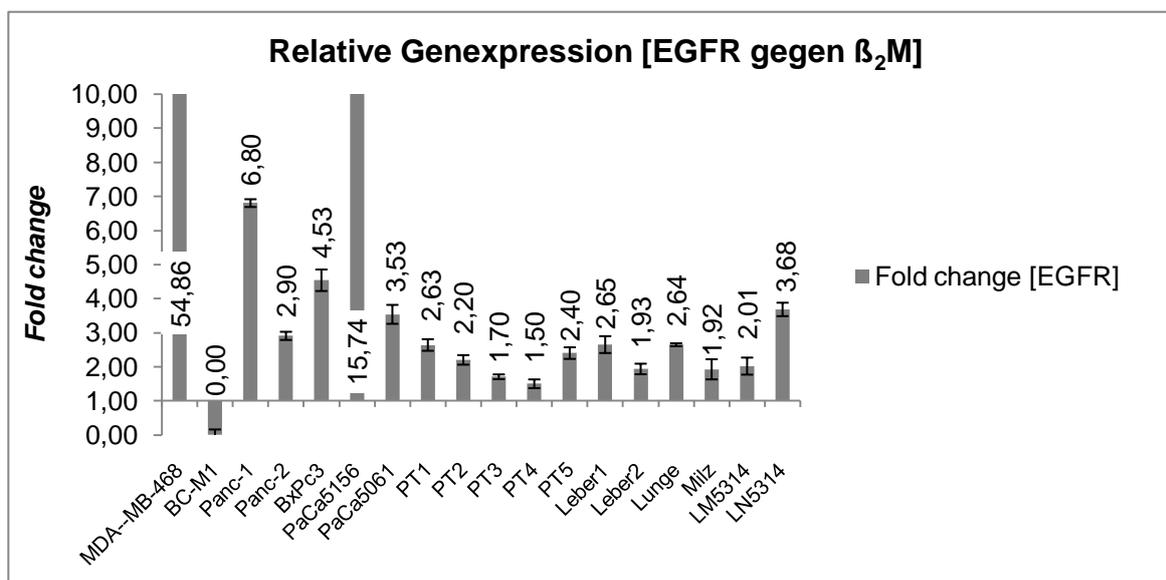


Abbildung 22 Bestimmung der relativen Genexpression der RTK EGFR für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/-SD.

3.2.2 Genexpressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle ALCAM und EpCAM

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls ALCAM wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,95 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

ALCAM (forwärts)	5'-GCTTCAACAGCCATCACAGTTC-3'	Effizienz 0,95
ALCAM (rückwärts)	5'-CCATACCACAGTTGCATTCCTG-3'	

Als Positivkontrolle dient die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468. Diese zeigt eine schwache ALCAM-Überexpression (FC=2,88). Die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1 sowie die Pankreastumorzelllinie BxPc3 zeigen höhere Werte (Abbildung 22). Die Pankreaskarzinomzelllinien PaCa5156, PaCa5061 sowie-Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien PT1, PT2, PT5, Leber2, Lunge und Milz zeigen eine schwache ALCAM-Überexpression (FC=1,79 - 2,59) (Abbildung 23). In der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1, den Metastasenzelllinien LM5314 und LN5314 und den Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien PT3, PT4 und Leber1 findet sich keine erwähnenswert erhöhte ALCAM-Expression. Lediglich die Genexpression von Panc-2 liegt unter der Nachweisgrenze.

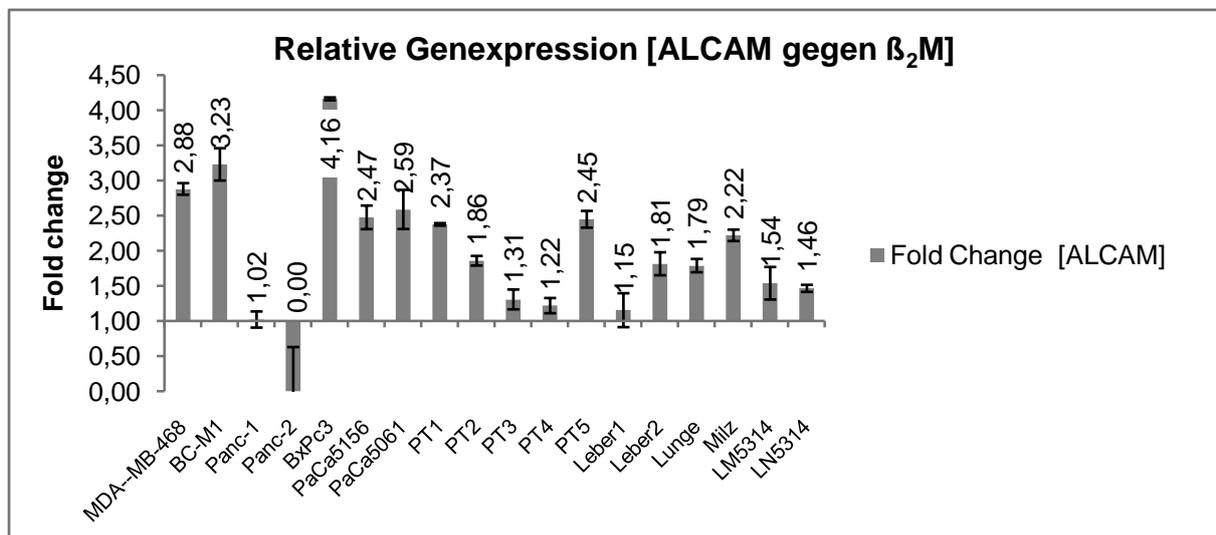


Abbildung 23 Bestimmung der relativen Genexpression des Adhäsionsmoleküls ALCAM für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls EpCAM wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,95 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

EpCAM (vorwärts)	5'-TATGAGAAGGCTGAGATAAAGGAG-3'	Effizienz 0,95
EpCAM (rückwärts)	5'-TTGTGTCCATTTGCTATTTCCC-3'	

Als Positivkontrolle wird wiederum MDA-MB-468 genutzt. Diese zeigt eine starke EpCAM-Überexpression (FC=8,2) gefolgt von der humanen Metastasenzelllinie LM5314 mit FC=3,01 (Abbildung 23). In den Zelllinien Panc-1, Panc-2, PaCa5156 und LN5314 lässt sich keine EpCAM-Expression messen. Die Pankreaskarzinomzelllinie PaCa5061 sowie 4 von 5 daraus entstandenen Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors und alle Metastasen exprimieren EpCAM im Normalbereich (FC=0,88 - 0,49 +/- SD) (Abbildung 24).

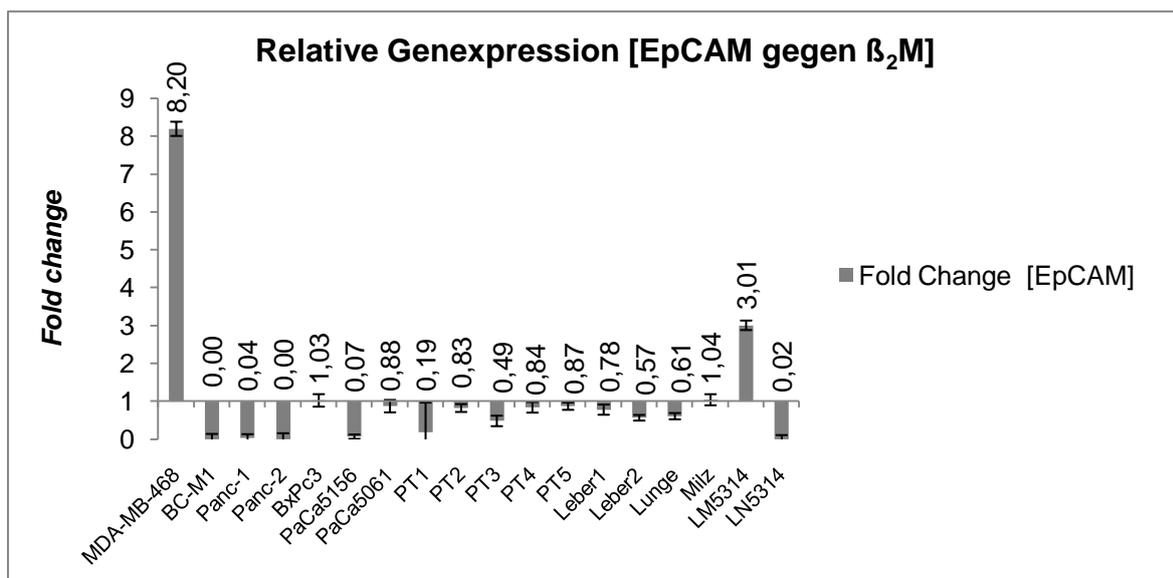


Abbildung 24 Bestimmung der relativen Genexpression des Adhäsionsmoleküls EpCAM für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

3.2.3 Genexpressionsanalyse der Zytoskelettproteine CK17, CK19 und Vimentin

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression des Intermediärfilamentproteins CK17 wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,94 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

CK17 (vorwärts)	5'-CTTCCGCACCAAGTTTGAGAC-3'	Effizienz 0,94
CK17 (rückwärts)	5'-GAGGTTCTCAATCTGCATCTCCA-3'	

Als Positivkontrolle für die CK17 Expression werden auch hier MDA-MB-468 Zellen verwendet (FC=4,21). Als CK17-unterexprimierend können die Zelllinien BC-M1, Panc-1, Panc-2, PaCa5156, LM5314 und LN5314 bestimmt werden. Die Pankreaskarzinomzelllinie des Primärtumors BxPc3 zeigt eine sehr starke (FC=26,18), PaCa5061 eine mäßige Überexpression (FC=3,01). Bei den Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors zeigt sich eine heterogene CK17-Expression (FC=0,67-3,55). Die zugehörigen Zelllinien aus Leber- und Lungenmetastase zeigen eine schwache Überexpression, die Milzmetastase eine Normalexpression (Abbildung 25).

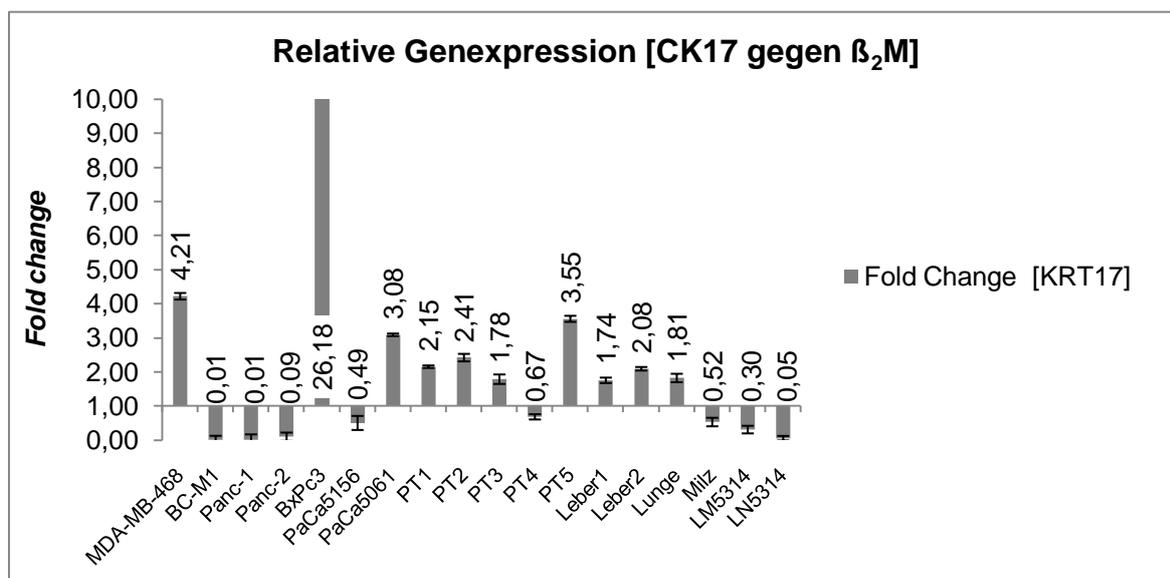


Abbildung 25 Bestimmung der relativen Genexpression des Zytoskelettproteins CK17 für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression des CK19 wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,88 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

CK19 (vorwärts)	5'-GACTACAGCCACTACTACACG-3'	Effizienz 0,88
CK19 (rückwärts)	5'-ACTGATTCCTCCTCATGGT-3'	

Als Positivkontrolle für die CK19-Expression dienen auch hier MDA-MB-468 Zellen (FC=16,49). Die schlecht-differenzierte Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 sowie die disseminierte Tumorzelllinie BC-M1 zeigen eine relative Unterexpression. Die Pankreaskarzinomzelllinie des Primärtumors PaCa5061 zeigt eine mäßige Überexpression (FC=2,5). Diese ist ebenfalls in 4 von 5 Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors und den Metastasen aus Leber, Lunge und Milz zu finden. Die Zelllinie LM5314 zeigt eine stärkere CK19 Expression, die jedoch gegenüber den Pankreaszelllinien des Primärtumors BxPc3 und PaCa5156 vermindert ist. Die Zelllinie LN5314 einer Lymphknotenmetastase zeigt ein normales Expressionsverhalten (FC=0,64) (Abbildung 26).

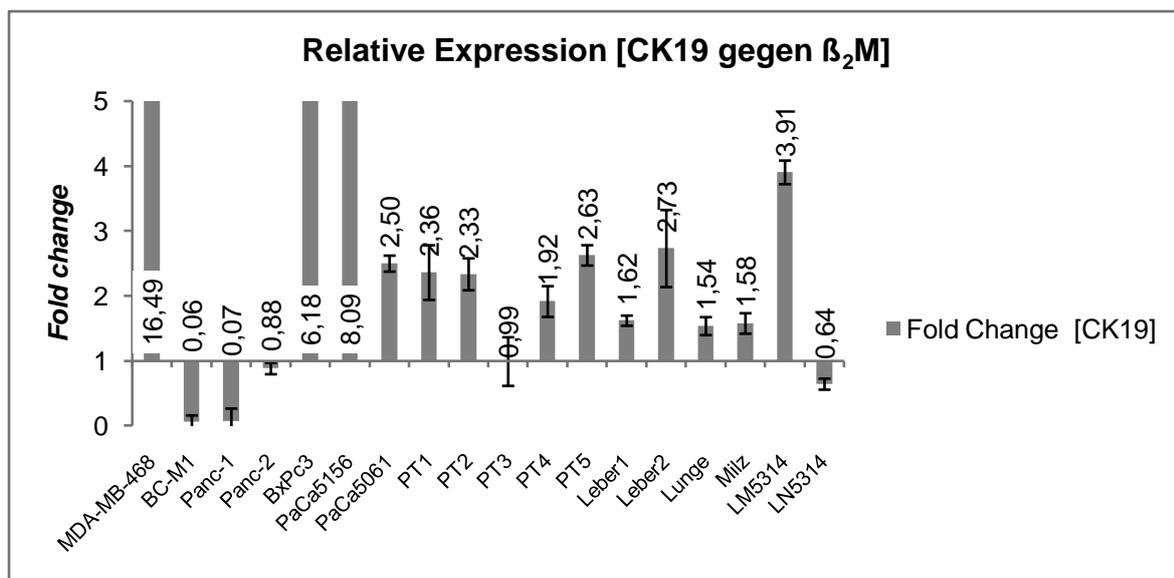


Abbildung 26 Bestimmung der relativen Genexpression des Zytoskelettproteins CK19 für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression des Intermediärfilamentproteins Vimentin wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,89 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

Vimentin (vorwärts)	5'-GCCCTTGACATTGAGATTGCC-3'	Effizienz 0,89
Vimentin (rückwärts)	5'-ATCCAGATTAGTTTCCTCAGGT-3'	

Als Positivkontrolle für die Vimentin-Expression dient die schlecht differenzierte Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 (FC=5,11). Eine starke Vimentin-Expression lässt sich ebenfalls für Panc-2 nachweisen (FC=7,74), schwächer für BC-M1 (FC=1,92) und PaCa5156 (FC=1,25; Abbildung. 26). Während sich für LN5314 eine leicht erniedrigte Expression darstellt, zeigen alle anderen getesteten Linien eine Vimentin-Unterexpression (Abbildung 27).

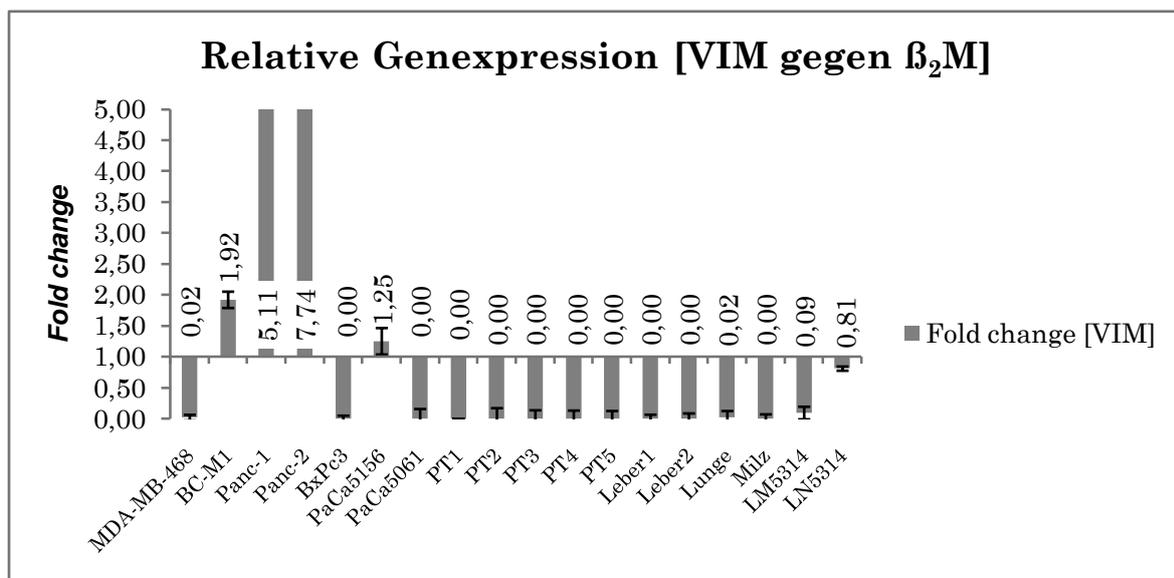


Abbildung 27 Bestimmung der relativen Genexpression des Zytoskelettproteins Vimentin für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

3.2.4 Genexpressionsanalyse der Stammzellmarker ALDH1 und CD133

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression von ALDH1 wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,92 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

ALDH1 (vorwärts)	5'-AACTCCTCTCACTGCTCTCCACG-3'	Effizienz 0,92
ALDH1 (rückwärts)	5'-GTCACCCTCTTCAGATTGCTTTTCC-3'	

Eine nennenswerte ALDH1 Expression zeigt lediglich Panc-2 (FC=44,51), in MDA-MB-468 (FC=0,22) und BxPc3 (FC=0,22) lässt sich ALDH1 noch detektieren, in allen weiteren Zelllinien liegt die ALDH1-Expression unter der Nachweisgrenze, was auf eine Unterexpression hindeutet (Abbildung 28).

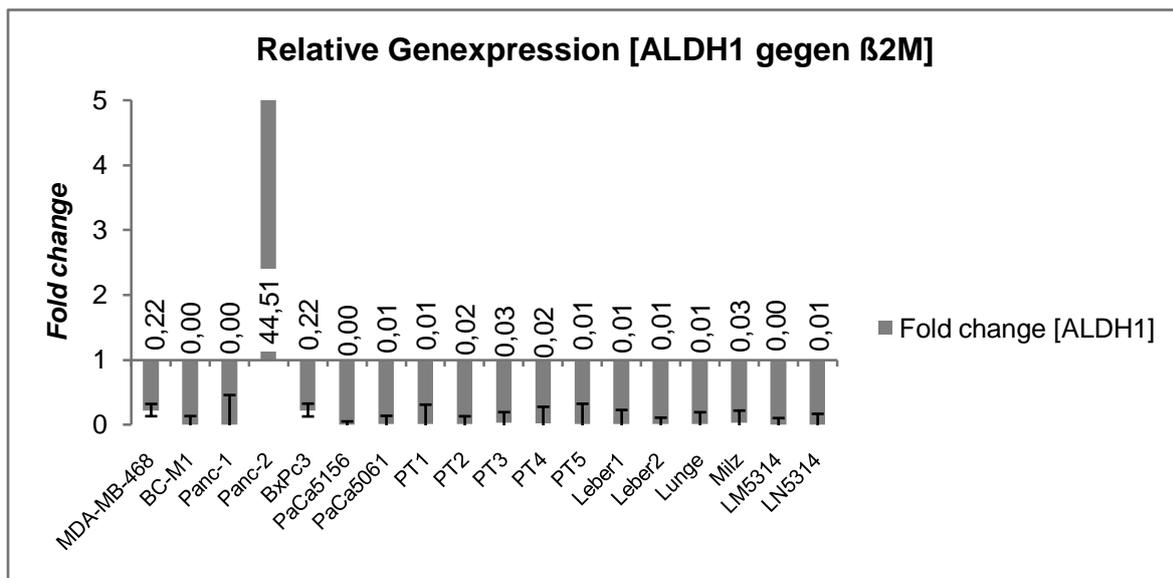


Abbildung 28 Bestimmung der relativen Genexpression des Stammzellmarkers ALDH1 für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasens aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta c_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

Für die Analyse und Berechnung der relativen Genexpression des Stammzellmarkers CD133 wird folgendes Primerpaar, welches eine Effizienz von 0,95 in der Effizienzanalyse zeigt, verwendet:

CD133 (vorwärts)	5'-ACAATCACTGAGCACTCTATACC-3'	Effizienz 0,95
CD133 (rückwärts)	5'-GTTCTCCCATACTTCTTAGTTCC-3'	

Eine Expression des Stammzellmarkers CD133 lässt sich in den Zelllinien MDA-MB-468 (FC=1,61) und LM5314 (FC=0,16) detektieren. In allen weiteren Zelllinien liegt die CD133-Expression unter der Nachweisgrenze, was auf eine Unterexpression hindeutet (Abbildung 29).

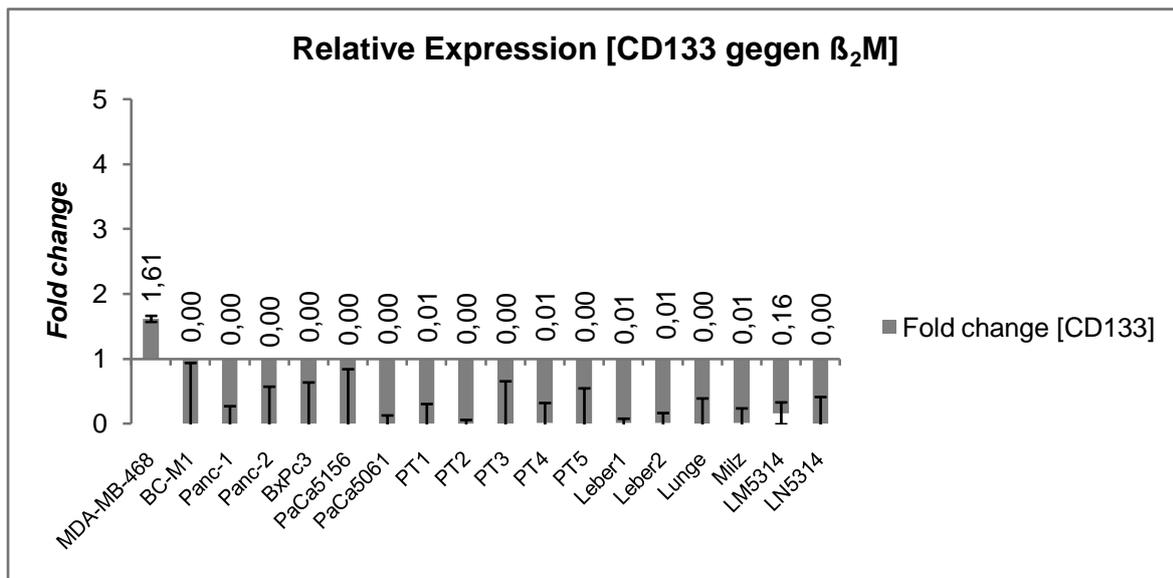


Abbildung 29 Bestimmung der relativen Genexpression des Stammzellmarkers CD133 für die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor, Leber-, Lungen- und Milzmetastase (PT1 - PT5, Leber1 - Leber2, Lunge und Milz), die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468, die DTC-Zelllinie BC-M1 sowie die Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3) und der Fernmetastasen aus Leber und Lunge (LM5314 und LN5314). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Als Referenz dient das *Housekeeping*-Gen β_2M . Die relative Genexpression ist als Mittelwert (n=3) angegeben. Die Fehlerbalken indizieren +/- SD.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigt Tabelle 5. Zusätzlich zeigt Tabelle 6 das zur Bewertung herangezogene Muster.

Tabelle 5 Zusammenfassung der relativen Genexpression prognostischer Marker

	<i>EpCAM</i>	<i>ALCAM</i>	<i>EGFR</i>	<i>CD133</i>	<i>ALDH1</i>	<i>CK17</i>	<i>CK19</i>	<i>VIM</i>
MDA-MB-468	++	+	+++	0	0	++	+++	-
BC-M1	-	++	0	-	-	-	-	+
Panc-1 (2)	-	0	++	-	-	-	-	++
Panc-2	-	-	+	-	+++	-	0	++
BxPc3	0	++	++	-	-	+++	++	-
PaCa5156	-	+	+++	-	-	0	++	0
PaCa5061	0	+	++	-	-	+++	+	-
PT1	0	+	+	-	-	++	+	-
PT2	0	+	+	-	-	+	+	-
PT3	-	0	+	-	-	+	0	-
PT4	0	0	+	-	-	0	+	-
PT5	0	++	+	-	-	++	+	-
Leber1	0	0	+	-	-	+	+	-
Leber2	0	+	+	-	-	+	+	-
Lunge	0	+	+	-	-	+	+	-
Milz	0	+	+	-	-	0	+	-
LM5314	++	0	+	-	-	-	++	-
LN5314	0	0	++	-	-	-	0	0

Tabelle 6 Bewertungsmuster der relativen Genexpression

< 0,5	Unterexprimiert	-
0,5-1,5	Normalexprimiert	0
1,5-3	Überexprimiert schwach	+
>3	Überexprimiert stark	++
>10	Überexprimiert sehr stark	+++

4 Diskussion

Im Fall des Pankreaskarzinoms, welches mit seinen unspezifischen Symptomen häufig erst entdeckt wird, wenn bereits Fernmetastasen bestehen, könnte eine spezifische Detektion der CTCs auf einen invasiven Primärtumor hindeuten [145]. Zudem könnte die Detektion von DTCs prognostisch aussagekräftig sein und zu einer angepassten Therapie führen. Für die Detektion der Pankreas-CTCs/DTCs müssen spezifische Marker gefunden werden, welche eine eindeutige Charakterisierung dieser Zellen zu einem malignen Primärtumor epithelialen Ursprungs herstellen und alle Zellen der heterogenen CTC/DTC-Population erkennt [146].

Da zum heutigen Zeitpunkt keine Pankreas-CTC/DTC-Zelllinien zur Verfügung stehen, erfolgt zunächst die Etablierung eines Markerspektrums für bereits charakterisierte Mammakarzinomzelllinien. Anhand dieses Markerspektrums sollen

- a) Mechanismen der epithelialen Differenzierung durch Markerproteine für die Tumortypen basal, luminal und mesenchymal
 - b) Mechanismen der RTK-Signalübertragung, wie Invasivität und Fähigkeit zur Metastasierung
 - c) Mechanismen der Zelladhäsionsproteine, wie Apoptoseresistenz und Disseminierung
- abgeleitet und deren Anwendbarkeit auf Pankreaskarzinomzelllinien untersucht werden.

Nach der Validierung an Mammakarzinomzelllinien und Charakterisierung von DTC-Zelllinien von Brust, Lunge und Prostata wird dieses Markerspektrum für die Definition von Pankreas-DTCs herangezogen. Hierbei dienen Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5061 und PaCa5156) und Zelllinien aus Fernmetastasen der Leber (LM5314) und des Lymphknotens (LN5314) als Modell. Zusätzlich erfolgt die Anwendung des Modells auf Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien, welche nach orthotoper Injektion der als metastasogen eingestuften Zelllinie PaCa5061 [123] in eine SCID-Maus aus Primärtumor (PT1 - PT5) und Metastasen der Leber (Leber1 - Leber2), Lunge und Milz kultiviert wurden.

4.1 Validierung des prognostischen Markerspektrums

Der Phänotypisierung und Genotypisierung von Adenokarzinomen der Mamma wurde bereits eine Vielzahl von Studien gewidmet, was diese Erkrankung zu einem guten Modell für das Adenokarzinom des Pankreas macht [141, 147, 148]. Innerhalb des ausgewählten Markerspektrums finden sich Zytoskelettproteine, welche für die Phänotypisierung von Mammakarzinomen herangezogen werden. Die für Zytoskelettproteine codierenden Gene sind so konserviert, dass sie auch bei der malignen Zelltransformation erhalten bleiben [149]. Anhand der Expression von Zytoskelettproteinen lässt sich also eine spezifische Zuordnung von malignen Zellen zum Ursprungsgewebe treffen. Diese Funktion wird, neben dem Östrogenrezeptor- (ER), Progesteronrezeptor- (PR) und dem ErbB2-Status, für die Bestimmung der epithelialen Differenzierung des Mammakarzinoms herangezogen.

4.1.1 Der basal-epitheliale Phänotyp/Genotyp

Mammakarzinome, welche „triple-negative“ (ER⁻/PR⁻/ErbB2⁻) sind und CK5/CK6 und CK17 exprimieren, werden als basal-epithelial bezeichnet [149]. Klinische Studien zeigen, dass Mammakarzinome, welche dem basal-epithelialen Phänotyp zugeordnet werden können, mit einer schlechten klinischen Prognose korrelieren [150]. Neben der Expression von CK5/CK6/CK17 lässt sich im basal-epithelialen Typ häufig eine EGFR-Überexpression finden, welche mit einer hohen Proliferationsrate einhergeht und in Zusammenhang mit dem negativen ER-Status gebracht wird [151] [148].

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 zeigt auf mRNA-Ebene ein CK17⁺/CK19⁺/Vimentin⁻-Expressionsmuster (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Zudem zeigt sich auf Proteinebene ein EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Phänotyp. Die EGFR-Expression wird auf mRNA-Ebene bestätigt (Abbildung 22) und stimmt somit mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein [152]. Die gesteigerte Expression von EGFR führt durch EGFR/EGFR-Homodimerbildung zu einer erhöhten Aktivierung von Signaltransduktionswegen, wie RAF-MEK-MAPK oder PT3K/Akt, welche Zellproliferation, Migration und Differenzierung steuern. Die Expression von ErbB3 hat keine proliferationssteigernde Wirkung, da simultan keine Expression von ErbB2 messbar ist. Somit kann es nicht durch ErbB2/ErbB3-Heterodimerbildung zu einer Aktivierung der genannten Signalwege kommen [153]. In der Literatur ist verzeichnet, dass MDA-MB-468 ER⁻ ist [141]. Auf Proteinebene zeigt sich zudem die Expression der Epithelzellmarker E-Cadherin und EpCAM, jedoch keine ALCAM-Expression. (Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9). Unter zusätzlicher Berücksichtigung

der CK5-Expression auf Protein-Ebene, die von verschiedenen Forschungsgruppen gezeigt wurde, zeigt die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 einen basal-epithelialen Phänotyp [130].

Ein ähnliches Expressionsmuster wie MDA-MB-468 auf Proteinebene zeigt die Zelllinie BT-20. Sie zeigt einen EpCAM⁺/E-Cadherin⁺/ALCAM/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Phänotyp (Kapitel 3.1.1). In der Literatur findet sich die Auskunft über einen ER⁻/PR⁻/ErbB2⁻-Status sowie eine CK5- und EGFR-Proteinexpression [141, 151]. Letztere lässt sich wie bei der Zelllinie MDA-MB-468 auf eine EGFR-Genamplifikation zurückführen [154]. Daher sollte die gemessene ErbB2-Protein-Expression der Zelllinie BT-20 kritisch betrachtet und mittels ErbB2-qPCR zusätzlich analysiert werden. Beiden Zelllinien gemein ist zusätzlich die Expression des Markers CD44, welche auf Proteinebene gezeigt wird (Abbildung 13). Klingbeil *et al.* zeigten, dass CD44 auf metastatischen basal-epithelialen Mammakarzinomen und Zelllinien stärker exprimiert wird als auf luminal-epithelialen Phänotypen [155]. Zudem konnten Noar *et al.* zeigen, dass die Blockierung von CD44 zu einem verringerten Tumorwachstum und einer reduzierten Metastasierung in Versuchstieren führt [156]. Da CD44 der Migration von hämatopoetischen Zellen ins Knochenmark mittels Bindungen an Cadherine wie E-Selectin dient [157], spricht dies für die Möglichkeit von CD44⁺-Tumorzellen in das Knochenmark zu metastasieren. Adenokarzinome, die einen basal-epithelialen Phänotyp mit zusätzlicher CD44-Expression besitzen, sind somit stark proliferierend und besitzen ein hohes Metastasierungspotential. Die Zelllinie BT20 erfüllt diese Kriterien und lässt sich daher ebenfalls dem basal-epithelialen Phänotyp zuordnen.

4.1.2 Der luminal-epitheliale Phänotyp/Genotyp

Mammakarzinome, welche ER⁺ sind und CK8/CK18/CK19 exprimieren, werden als luminal-epithelial bezeichnet [149] [158]. Im luminal-epithelialen Mammakarzinom findet sich häufiger eine ErbB2-Überexpression im Vergleich zum basal-epithelialen Phänotyp [148].

Den bereits in Kapitel 4.1.1 beschriebenen EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Phänotyp zeigen im immunologischen Nachweis ebenfalls die Mammakarzinomzelllinien SKBR-3 und BT-474, wobei in beiden Zelllinien die EGFR-Expression im Vergleich zu den Zelllinien BT-20 und MDA-MB-468 abgeschwächt ist (Kapitel 3.1.1.2). In beiden Zelllinien lässt sich zudem die Proteinexpression der epithelialen Adhäsionsmoleküle EpCAM und E-Cadherin zeigen. Beiden Zelllinien kann zusätzlich anhand von Literaturdaten der CK5-Typ [141, 148] und die Expression der luminalen CKs CK8/CK18/CK19 zugewiesen werden [149]. SKBR-3 und BT-474 sind somit aufgrund ihres CK-Expressionsusters dem luminal-epithelialen Phänotyp zuzuordnen, obgleich sie sich in ihrem ER-

Status unterscheiden (SKBR-3 = ER⁻, BT-474 = ER^{low}). Die gesteigerte ErbB2-Expression geht auch in luminal-epithelialen Zelllinien mit einer erhöhten Fähigkeit zur Invasion einher, wie Roetger *et al.* zeigen konnten. Die Zelllinie MCF-7, welche im Gegensatz zu SKBR-3 und BT-474, ER⁺ ist, zeigt auf Proteinebene keine EGFR/ErbB3-Expression und eine sehr schwache ErbB2-Expression (Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). In Extravasationsversuchen durch ein Endothel war MCF-7 sehr viel schwächer invasiv als die Zelllinie SKBR-3, welche eine ErbB2-Genamplifikation mit Proteinüberexpression besitzt [159]. Dies bestätigt erneut die wichtige Rolle der ErbB2-Expression im invasiven Verhalten von Karzinomen.

4.1.3 Der mesenchymale Phänotyp/Genotyp

Ein dritter Zelltyp ist der mesenchymale Phänotyp, welcher in Tumoren durch einen Verlust der Expression von CKs und E-Cadherin sowie einer Heraufregulierung von Vimentin einhergeht [160]. Zusätzlich exprimiert dieser Phänotyp Adhäsionsmoleküle des hämatopoetischen Systems, wie ALCAM und CD44, was die Metastasierung ins Knochenmark begünstigt

Neben den Zelllinien BT-20 und MDA-MB-468 zeigen die Zelllinien Hs578T und MDA-MB-231 eine CD44-Expression im immunologischen Nachweis, wobei diese bei der Zelllinie MDA-MB-231 am stärksten innerhalb der Mammakarzinomzelllinien ausgeprägt ist. Beide Zelllinien zeigen zudem in der weiteren Analyse der Proteinexpression einen EpCAM⁻/E-Cadherin⁻/ALCAM⁺/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Phänotyp (Kapitel 3.1.1). Berücksichtigt man die Information, dass Hs578T und MDA-MB-231 ER⁻/Vimentin⁺/CK5⁺ sind [141] und ein hohes Metastasierungspotential im Mausmodell zeigen [141], so lässt sich neben den bereits genannten Phänotypen ein weiterer Typ definieren: der mesenchymale Phänotyp. Anhand von Transplantationsstudien mit der Zelllinie MDA-MB-231 konnte eine Forschungsgruppe bestätigen, dass die CD44-Expression ebenfalls auf Karzinomzellen der Migration ins Knochenmark dient [161].

Neben der CD44-Expression zeigt sich in den Mammakarzinomzelllinien HS578T und MDA-MB-231 die Expression aller untersuchten RTKs. Dieses Muster charakterisiert einen aggressiven Phänotyp, da sowohl EGFR/EGFR-Homodimere als auch ErbB2/ErbB3- und EGFR/ErbB2-Heterodimere gebildet werden. Der ErbB2/ErbB3-Heterodimer-Komplex hat hierbei den höchsten Einfluss auf die Transformation und den mitogenen Effekt [162]. ErbB2-Heterodimere zeigen die höchste Aktivität in der verbesserten Nutzung von Downstream-Signalwegen, was zu einer gesteigerten Zellproliferation, Migration und Apoptoseresistenz führt [153].

4.2 Genotypisierung und Phänotypisierung der DTC-Zelllinien

Die Detektion von DTCs im Knochenmark von Mammakarzinompatienten konnte als unabhängiger prognostischer Marker im Bezug auf das Auftreten von Rezidiven und der Überlebensrate in verschiedenen Studien belegt werden [163-165]. DTCs können häufig nicht mit Standardchemotherapeutika eliminiert werden [166], was auf einen abweichenden Phänotyp im Vergleich zum Primärtumor hindeutet, auf den die Chemotherapie angepasst wird. Die vorliegenden DTC-Zelllinien der Mamma (BC-M1 und BC-S1), der Lunge (LC-M1) und der Prostata (PC-E1 und PC-M1) zeigen auf Proteinebene keine Expression der epithelialen Adhäsionsmoleküle EpCAM und E-Cadherin (Abbildung 7, Abbildung 8). Der Verlust der E-Cadherin-Expression korreliert in Studien direkt mit dem Differenzierungsgrad, Invasions- und Metastasierungspotential von Tumoren [167, 168]. Daher kann eine Inaktivierung der Expression epithelialer Zelladhäsionsmoleküle zum Lösen der DTCs aus dem Zellverband geschlussfolgert werden. Diese Inaktivierung findet innerhalb der Zelllinie BC-M1 für EpCAM bereits auf Gentranskriptionsebene statt (Abbildung 24). Die Anwendung von EpCAM als epitheliale Marker für die CTC/DTC-Detektion ist daher kritisch zu hinterfragen, da die vorliegende Untersuchung schlussfolgern lässt, dass EpCAM nicht auf DTCs der Mamma, der Lunge und der Prostata exprimiert wird.

Die DTC-Zelllinie BC-M1 zeigt einen $EGFR^{-}/ErbB2^{+}/ErbB3^{-}$ -Phänotyp, wobei auf Genexpressionsebene ebenfalls kein EGFR detektiert werden kann (Abbildung 22). Vergleiche mit der Literatur belegen, dass DTC-Zelllinien ErbB2-aktivierende Mutationen aufweisen, so dass auf eine zu geringe Belichtungszeit für die Darstellung der ErbB2-Proteinexpression der verbleibenden DTC-Zelllinien geschlussfolgert werden kann (Abbildung 11) [132]. Diese Schlussfolgerung mag ebenfalls für die ErbB3-Proteinexpression zutreffen. Lediglich die Zelllinie PC-E1 lässt die Detektion eines schwachen ErbB3-Signals zu. Bartkowiak *et al.* konnten ebenfalls für die verbleibenden Zelllinien ein schwaches ErbB3-Signal auf Proteinebene detektieren [169]. Alle DTC-Zelllinien weisen somit den $EGFR^{-}/ErbB2^{+}/ErbB3^{+}$ -Phänotyp auf. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, induziert ErbB2 lediglich dann Signalwege zur Zellproliferation, wenn Heterodimerbildung mit einem weiteren Mitglied der RTK-Familie vorliegt. Die detektierte ErbB2-Proteinexpression im Zusammenhang mit der schwachen ErbB3 kann zur Erklärung der geringen Proliferationsrate der disseminierten Tumorzelllinien herangezogen werden. Zeitgleich unterstützt dieses Expressionsmuster die These eines wenig proliferierenden Stammzellcharakters der disseminierten Tumorzelllinien, welche sich innerhalb des Knochenmarks in einem ruhenden Zustand (G_0 -Phase) befinden können [170]. Die Überexpression von ErbB2⁺ auf Mammakarzinom-DTCs wird mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht [171]. Die Detektion von ErbB2⁺-DTCs würde es somit möglich machen, solche Patienten zu

bestimmen, die auf eine ErbB2-gerichtete Therapie, beispielsweise mit Trastuzumab (Herceptin®), ansprechen.

Alle DTC-Zelllinien zeigen die Expression der hämatopoetischen Adhäsionsmoleküle CD44 und ALCAM auf Proteinebene. Zudem zeigt die Zelllinie BC-M1 ALCAM-, und Vimentin-Expression auf Gentranskriptionsebene, ist jedoch negativ für die Marker CD133, ALDH1 und CK17 und CK19 (Kapitel 3.2). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die DTC-Zelllinien das Proteinexpressionsmuster Vimentin⁺/CK5⁺/CK8⁻/CK18⁻ aufweisen [130], was die gemessene Vimentin-Expression der Zelllinie BC-M1 auf mRNA-Ebene bestätigt. Vergleicht man das Proteinexpressionsmuster der DTC-Zelllinien mit dem der Mammakarzinomzelllinien, so ähneln die DTC-Zelllinien am ehesten den Zelllinien MDA-MB-231 und Hs578T, und somit dem mesenchymalen Phänotyp. Unterschiede bestehen hier in der EGFR- und schwach ausgeprägten ErbB3-Expression.

4.3 Anwendbarkeit des epithelialen Differenzierungsmodells

Zusätzlich zu den Mammakarzinomzelllinien wurden humane Zelllinien aus Primärtumoren des Pankreas (Panc-1, Panc-2, BxPc3, PaCa5061 und PaCa5156), Zelllinien der Fernmetastasen aus Leber (LM5314) und Lymphknoten (LN5314) eines G3-Primärtumores und Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien aus Primärtumor (PT1-PT5) und Fernmetastasen der Leber (Leber1-Leber2), Lunge und Milz, die nach orthotoper Injektion der Zelllinie PaCA5061 in eine SCID-Maus entstanden, auf die genannten Marker untersucht. Hierbei soll betrachtet werden, ob sich das Modell der epithelialen Differenzierung, welches für die Mammakarzinomzelllinien Anwendung findet, auch für die Pankreaskarzinomzelllinien anwenden lässt.

4.3.1 Genotypisierung und Phänotypisierung der humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Alle Adenokarzinome des Pankreas zeigen in der Literatur eine Expression von CK7/CK8/CK18/CK19, wobei diese Expression zugunsten der Vimentin-Expression mit zunehmender Dedifferenzierung des Tumors abnimmt, wie es durch das EMT-Modell beschrieben wird [172, 173]. Die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 wurde aus einem schlecht differenzierten Adenokarzinom der Stufe G3 generiert [133]. Diese Zelllinie zeigt keine mRNA-Expression des epithelialen

Adhäsionsmoleküls EpCAM, was auf Proteinebene bestätigt werden kann (Abbildung 7, Abbildung 24). Zusätzlich findet sich eine EGFR-Überexpression, die bestätigt, dass Panc-1 eine EGFR-Amplifikation aufweist [174]. Panc-1 zeigt keine Genexpression von CK17 und CK19. Jedoch kann eine Normalexpression von ALCAM sowie eine Überexpression von Vimentin mittels qPCR gemessen werden. Auf Proteinebene zeigt sich ein EpCAM⁻/E-Cadherin⁻/ALCAM⁺/EGFR⁻/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CD44⁺-Expressionsmuster. Überraschenderweise zeigt sich kein EGFR-Signal auf Proteinebene, obgleich Literaturquellen und die mRNA-Expressionsanalysen auf ein Signal hindeuten [169]. Anhand des vorliegenden Expressionsmusters kann die Zelllinie Panc-1 zum mesenchymalen Phänotyp zugeordnet werden, dessen Zelllinien ein starkes Bestreben zur Migration ins Knochenmark besitzen. Zeitgleich ist die Zelllinie Panc-1 aufgrund des EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Musters hoch invasiv. Die Proteinexpression von EGFR/ErbB2/ErbB3 findet sich, mit Ausnahme der ErbB3-Expression auf der Zelllinie PaCa5061, auf allen weiteren Primärtumorzelllinien des Pankreas (Abbildung 10). Da ErbB2 als Signalverstärker der Induktion der Migration mittels Heterodimerbildung mit EGFR dient, kann geschlussfolgert werden, dass diese Zelllinien ebenfalls hoch invasiv und somit sehr aggressiv sind.

Die Zelllinie Panc-2 zeigt keine EpCAM/CK17/CK19-Genexpression jedoch Vimentin-Expression. Zudem findet sich auf mRNA-Ebene keine ALCAM und eine etwas schwächere EGFR-Expression im Vergleich zur Linie Panc-1 (Abbildung 22, Abbildung 23). Als einzige der untersuchten Zelllinien findet sich in Panc-2 eine starke ALDH1-Genexpression. Panc-2 zeigt auf Proteinexpressionsebene zusätzlich einen CD44⁺/EpCAM⁻/ALCAM⁺-Phänotyp und lässt sich somit anhand des vorliegenden Expressionsmusters dem mesenchymalen Zellenphänotyp zuordnen.

Die Zelllinien BxPc3, PaCa5156 und PaCa5061 zeigen auf mRNA-Ebene eine EGFR⁺/CK19⁺/ALCAM⁺-Genotyp. BxPc3 und PaCa5061 zeigen zusätzlich EpCAM und CK17-Expression, während die Zelllinie PaCa5156 zusätzlich Vimentin-Expression auf mRNA-Ebene zeigt. In allen Zelllinien findet sich E-Cadherin-Expression bei fehlender EpCAM-Expression (Abbildung 7, Abbildung 8). Dieses Expressionsmuster wird in der Literatur für BxPc3 bestätigt [142]. Wendet man das Modell der epithelialen Differenzierung der Mammakarzinomzelllinien an, so ist die Zelllinie PaCa5156 einem Zwischentyp zuzuordnen. Es finden sich sowohl Expressionsmuster des mesenchymalen Phänotyps (ALCAM, Vimentin und CD44) als auch die Expression epithelialer Zelladhäsionsmoleküle und CKs (E-Cadherin und CK19). Studien an Mammakarzinomen konnten zeigen, dass eine Co-Expression von CKs und dem mesenchymalen Marker Vimentin mit einem aggressiveren Verhalten und einer schlechten Prognose einhergingen, im Vergleich zu solchen Mammakarzinomen, die lediglich CK⁺ oder Vimentin⁺ waren [175] [176]. Die Zelllinie PaCa5156 ist also aufgrund ihrer kombinierten Vimentin und CK-Expression hoch aggressiv [175]. Die Zelllinien

BxPc3 und PaCa5061 lassen sich aufgrund ihres Expressionsmusters dem luminal-epithelialen Phänotyp ähnlich dem der Zelllinie BT-474 zuordnen.

Die metastatischen Zelllinien LM5314 und LN5314 weichen in ihrem Expressionsmuster voneinander ab. So zeigt LM5314 auf Proteinebene einen E-Cadherin⁺/ALCAM⁻/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CD44⁻-Phänotyp. Zusätzlich zeigt sich auf Genexpressionsebene ein EGFR⁺/ALCAM⁺/EpCAM⁺/CK17⁻/CK19⁺/Vimentin⁻- Genotyp. Dieses Expressionsmuster lässt die Zelllinie eindeutig dem epithelialen Typ zuordnen und spricht für eine sehr aggressive Zelllinie aufgrund der bereits genannten EGFR/ErbB2/ErbB3-Co-Expression. Die Zelllinie LN5314 zeigt hingegen auf Proteinebene einen E-Cadherin⁻/ALCAM⁺/EGFR⁻/ErbB2⁻/ErbB3⁻/CD44⁻- Phänotyp sowie einen EGFR⁺/ALCAM⁺/EpCAM⁻/CK17⁻/CK19⁻/Vimentin⁺-Genotyp. Aufgrund der vorhandenen Vimentin-Expression und einer nicht detektierbaren CK17/CK19-Expression mit schwacher EGFR-Expression lässt sich diese Zelllinie am ehesten mit den mesenchymalen Zelllinien MDA-MB-231 und Hs578T vergleichen. Aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen der vorliegenden metastatischen Zelllinien mit identischem Ursprungstumor kann geschlussfolgert werden, dass sowohl der Weg der Metastasierung (lymphogen oder hämatogen) als auch die Mikroumgebung Einfluss auf die Phänotypenbildung der Metastasen haben kann. Endothelzellen von Lymphgefäßen sind durch interendotheliale Lücken gekennzeichnet [177]. Somit benötigen Tumorzellen, welche Lymphknotenmetastasen ausbilden, zur Extravasation des Lymphknotenendothels und der Ausbildung von Metastasen andere Fähigkeiten als Tumorzellen, die hämatogen metastasieren. Dies kann durch die vorliegenden Expressionsmuster bestätigt werden. Obgleich in einer Vielzahl von Studien immunohistochemisch gezeigt werden konnte, dass EpCAM in Tumorparaffinschnitten des Pankreas in 36-55% der Fälle überexprimiert wird [34, 47], zeigt sowohl die Analyse auf Genexpressionsebene als auch die Analyse auf Proteinexpressionsebene ein anderes Bild. Lediglich die aus einer Lebermetastase generierte Zelllinie LM5314 zeigt eine relative EpCAM-Genüberexpression. Betrachtet man die vorgefundenen Ergebnisse, so würde dies bedeuten, dass nicht die Bestimmung der EpCAM-Expression des Primärtumors ausreicht, um eine Therapie-Entscheidung zu treffen, da Metastasen die Fähigkeit zur EpCAM-Expression reaktivieren können. Ob dieses Phänomen lediglich für Metastasen der Leber zutrifft, muss in weiterführenden Studien gezeigt werden.

4.3.1 Genotypisierung und Phänotypisierung der Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien

Bei der Analyse der Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien zeigt sich ein homogenes Bild. Die Primärtumorzelllinien PT1-PT5 sowie die Metastasenzelllinien Leber1, Leber2, Lunge und Milz zeigen auf mRNA-Ebene eine Expression von EGFR, ALCAM, CK17 und CK19. Zudem lässt sich eine Normalexpression von EpCAM in 8 von 9 Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien detektieren. Eine

Expression von ALDH1, Vimentin und CD133 konnte nicht detektiert werden (Kapitel 3.2). Auf Proteinexpressionsebene zeigt sich ein E-Cadherin⁺/ALCAM⁺/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CD44⁻ Phänotyp in allen Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien (Kapitel 3.1.2).

Vergleicht man die Gen- und Proteinexpressionsebenen so fällt im immunologischen Nachweis auf, dass die EGFR-Signalintensität der Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien wesentlich höher ist als die der Zelllinie MDA-MB-468, wobei dies auf Genexpressionsebene nicht der Fall ist (Vergleich Abbildung 10, Abbildung 18, Abbildung 22). Dies würde bedeuten, dass bei Pankreaskarzinomen die EGFR-Expression nicht streng an die EGFR-Genamplifikation gekoppelt ist wie bei der Zelllinie MDA-MB-468. Dieser posttranskriptionale Mechanismus würde somit den Pankreaskarzinomzellen ermöglichen, dynamisch auf Umwelteinflüsse zu reagieren. EGFR wäre somit ein Beispiel für epigenetische Regulation des Pankreaskarzinoms.

In allen Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien findet sich das EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Expressionsmuster, welches einen sehr aggressiven Krebsphänotyp charakterisiert und bereits auf Primärtumorzelllinien des Pankreas detektiert werden konnte (Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Dies geht mit der Beobachtung eines raschen Versterbens der Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas einher. Betrachtet man den vorliegenden Phänotyp, so lassen sich die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien einem epithelialen-Typ zuordnen und entsprechen in ihrem Expressionsmuster der luminal-epithelialen Zelllinie BT-474. Es kann keine Unterscheidung zwischen Primärtumor- und Metastasen-Zelllinie getroffen werden, da sich diese Zelllinien genotypisch und phänotypisch gleichen. Zieht man das Modell der EMT zur Erläuterung der Tumorzeldisseminierung im Organismus heran, so kann davon ausgegangen werden, dass CTCs/DTCs in der Lage sind, sich während der Metastasierung einer transdienten Differenzierung während der Ausbildung von Fernmetastasen zu unterziehen. Dies würde erklären, warum sich Primärtumor und Metastasen in ihrem Phänotyp und Genotyp ähneln, während die analysierten DTC-Zelllinien ein mesenchymales Expressionsmuster aufweisen.

4.3.2 Vergleich der Primärtumorzelllinien PaCa5061 und PT1-PT5

Um die Anwendbarkeit der Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien für humane Karzinome des Primärtumors zu untersuchen, wurde ebenfalls die Zelllinie PaCa5061 charakterisiert, welche aus einem Pankreaskarzinom des Differenzierungsgrades G3 stammt [123]. Der Vergleich zwischen PaCa5061 und den Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien PT1-PT5 zeigt eine EpCAM-Normalexpression allen Zelllinien auf Genexpressionsebene (Abbildung 24). Die Intensität des

immunologisch bestimmten E-Cadherin lässt ebenfalls keine Unterschiede erkennen. ALCAM zeigt sich auf Genexpressionsebene ebenfalls ohne große Unterschiede zwischen Xenograft-Primärtumorzelllinien und der Zelllinie PaCa5061. Auffällig ist hier jedoch, dass auf Proteinexpressionsebene kein Signal für die Zelllinie PaCa5061 detektiert werden kann. Die RTK-Expression zeigt auf Genexpressionsebene für EGFR eine Verdopplung von PaCa5061 im Vergleich zur am schwächsten exprimierenden Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinie PT3. Auf Proteinebene zeigt sich ein umgekehrtes Verhalten (Abbildung 10, Abbildung 18, Abbildung 22). Ob dies auf eine Aktivierung auf Translationsebene zurückzuführen ist, muss, wie bereits angedeutet, genauer untersucht werden und ist in der Literatur nicht beschrieben. Die ErbB2-Expression zeigt keine Unterschiede auf Proteinebene. Lediglich ErbB3 ist bei der Ursprungszelllinie PaCa5061 nicht detektierbar, während es in den Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien auf Proteinebene detektiert werden kann. Für die Betrachtung der Stammzellmarker zeigen sich ebenfalls auf Proteinebene (CD44) und Genexpressionsebene (ALDH1 und CD133) keine signifikanten Unterschiede. Zudem können keine Unterschiede in der Expression von CK17 und CK19 detektiert werden. Die vorliegenden Primärtumorzelllinien des Pankreas-Xenograft-Modells unterscheiden sich durch eine erhöhte Expression von EGFR und ErbB3 von der Ursprungszelllinie. Dies könnte zum einen auf die veränderte Wachstums Umgebung, zum anderen auf die in-vitro-Kultivierung zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass schon die Kultivierung von Zelllinien aus Primärtumor oder auch Xenograft zu einem veränderten Phänotyp und Genotyp der Zellen führt [178]. Den aggressiven luminal-epithelialen Phänotyp der Zelllinie PaCa5061, welcher in Transplantationsversuchen in SCID-Mäuse bestätigt wurde [123], spiegeln ebenfalls die Zelllinien des Xenograft-Modells wider. Anhand des Expressionsmusters lässt sich bestätigen, dass die vorliegenden Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien von der humanen Zelllinie PaCa5051 abstammen und somit einen tumorigenen Phänotyp besitzen

4.4 Anwendbarkeit der Prognosemarker zur CTC/DTC-Detektion des Pankreaskarzinoms

Da postuliert wurde, dass CTCs aus einer Kombination von epithelialen/mesenchymalen Markern und dem Gewinn von Stammzeleigenschaften entstehen [118], wäre eine Kombination dieser Marker mit Stammzellmarkern für eine Detektion sinnvoll. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, so könnte für die Detektion von Pankreas-CTCs/DTCs das Zelladhäsionsmolekül CD44 herangezogen werden. Die Expression findet sich sowohl auf den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 als auch Hs578T sowie auf den untersuchten DTC-Zelllinien und führt zum *Homing* ins Knochenmark. Die

Zelllinien Panc-1, Panc-2 und PaCa5156 besitzen somit das Potential, DTCs im Knochenmark auszubilden. Eine Bestätigung dieser These muss in weiterführenden Versuchen überprüft werden. In Pankreas-Xenograft-Modellen konnte gezeigt werden, dass Gemcitabin-Therapie zur Anreicherung einer CD44⁺/CD24⁻-Zellpopulation führte, welche nach Absetzen des Chemotherapeutikums ein neues Tumorwachstum induzierte [179]. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass CD44⁺ für einen Stammzellphänotyp innerhalb des Pankreaskarzinoms charakterisiert, welcher sich ebenfalls auf CTCs/DTCs finden lässt.

CD133 und ALDH1 werden als Stammzellmarker angesehen (Kapitel 1.3.3). So konnte in Brustkrebspatienten in 79% von 66 analysierten CTCs ALDH1-Expression nachgewiesen werden [118]. Die Genexpressionsanalyse der Stammzellmarker CD133 und ALDH1 lassen keine Detektion in den Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien, der Ursprungszelllinie PaCa5061 sowie der disseminierten Tumorzelllinie BC-M1 zu. Lediglich die Zelllinie Panc-2 zeigt eine ALDH1-Expression auf mRNA-Ebene. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass nicht in allen hoch aggressiven Tumoren CTCs/DTCs mit ALDH1 oder CD133 detektiert werden können, sondern dieses Vorgehen lediglich für eine Subpopulation von Pankreaskarzinom-Patienten möglich ist. Für die Bewertung von ALDH1 und CD133 als CTC/DTC-Marker des Pankreaskarzinoms sollten daher weiterführende Studien durchgeführt werden.

Innerhalb der Gruppe der untersuchten Adhäsionsmoleküle könnte ALCAM in der Detektion von Pankreas-CTCs/DTCs Verwendung finden. Tendenziell scheint ALCAM in der Zelllinie BC-M1 im Vergleich zu Primärtumorzelllinien und Metastasen höher exprimiert, was eine Aktivierung der ALCAM-Transkription während der EMT und einhergehender Tumorzell dissemination vermuten lässt. ALCAM wird sowohl auf den analysierten DTC-Zelllinien als auch auf hoch aggressiven metastatischen Pankreas-Karzinomzelllinien wie Panc-1 gefunden. ALCAM kann jedoch lediglich als zusätzlicher Marker in einer Gruppe von Markern für die Detektion genutzt werden, da ALCAM ebenfalls sowohl auf Knochenmarksstammzellen als auch auf lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert wird [142]. EpCAM und E-Cadherin lassen sich auf den vorliegenden DTC-Zelllinien nicht detektieren, finden sich jedoch auf den Mammakarzinomzelllinien der Primärtumore. Dies entspricht der Theorie des Verlustes epithelialer Zelladhäsionsmoleküle während der Tumorprogression. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass 64,5% aller Mammakarzinom-Patienten mit CK-positiven DTCs ebenfalls EpCAM-Expression zeigten [15]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass EpCAM lediglich eine Subpopulation von CTCs/DTCs detektiert, welche einen nichtvollständigen Phänotypen-Transformationsprozess durchlaufen haben. Die Heterogenität von CTCs/DTCs auch innerhalb eines Patienten konnte von Klein *et al.* gezeigt werden [146]. In den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien findet sich sowohl in den Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors als auch der Metastasen eine EpCAM-Expression. Da EpCAM

lediglich auf Epithelzellen und malignen epithelialen Zellen vorgefunden wird, ist EpCAM bei der Detektion von CTCs/DTCs ein häufig eingesetzter Antikörper [41, 180, 181]. Die vorliegenden Ergebnisse der Pankreaskarzinomzelllinien zeigen auf, dass auch bei Pankreaskarzinompatienten die Detektion von CTCs/DTCs mit EpCAM möglich ist, jedoch vom Phänotyp des Primärtumors abhängt.

Interessanterweise exprimieren sowohl die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien des Primärtumors als auch deren Metastasen E-Cadherin in einer deutlich höheren Menge als die Positivkontrolle MDA-MB-468. Betrachtet man die Ergebnisse von Hazan *et al.*, wird klar, dass eine Tumorzeldisseminierung auch bei hoher Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin stattfinden kann, falls RTKs exprimiert werden. Diese RTKs stören die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion an das Zytoskeletts, wodurch es zur Migration kommen kann [182]. Da die vorliegenden Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien alle minimal 2 RTKs exprimieren, kann die Ausbildung von Metastasen somit erfolgen. Die vorliegenden DTC-Zelllinien zeigen keine E-Cadherin-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass in Pankreaskarzinomen eine Verringerung der E-Cadherin-Expression mit einem erhöhten Metastasierungspotential einhergeht [183]. Anhand der vorliegenden Daten kann die Nutzung von E-Cadherin als Marker für die Detektion von CTCs/DTCs des Pankreaskarzinoms weder bestätigt noch ausgeschlossen werden und bedarf weiterführender Analysen.

Alle untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zeigen das EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺-Expressionmuster kombiniert man die Ergebnisse von Protein und Genanalysen ErbB2/ErbB3 ist ebenfalls auf den untersuchten DTC-Zelllinien exprimiert, während sich keine EGFR-Expression auf mRNA oder Proteinebene messen lässt. In Studien von beispielsweise Mammakarzinom und Kolonkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Detektion von EGFR⁺-CTCs mittels qPCR gute Ergebnisse erzielt [184, 185]. Die Nutzung von EGFR kann anhand der vorliegenden Ergebnisse ebenfalls für die CTC-Detektion des Pankreaskarzinoms herangezogen werden, da sowohl Primärtumorzelllinien als auch Zelllinien aus Metastasen eine hohe EGFR-Proteinexpression zeigen und somit vermutet werden kann, dass Pankreas-CTCs ebenfalls EGFR-Expression zeigen. Als DTC-Marker für das Pankreaskarzinoms sollte EGFR aufgrund der Ergebnisse der DTC-Zelllinien nicht die erste Wahl sein.

Innerhalb der RTKs stellt ErbB2 den Marker dar, welcher auf die CTC/DTC-Detektion des Pankreaskarzinoms und, aufgrund seiner Auswirkungen auf Proliferation und Migration, für die gezielte Therapie Anwendung finden kann. Sowohl die DTC-Zelllinien als auch alle untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zeigen ErbB2-Expression. In CTCs/DTCs des Mammakarzinoms konnten ErbB2⁺-CTCs/DTCs detektiert werden [186]. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass der ErbB2-Status von Mammakarzinomen nicht zwingend mit dem ErbB2-Status der detektierten CTCs korrelierte [187]. Demnach lässt sich auch für das Pankreaskarzinom schlussfolgern, dass ErbB2 für die Detektion von CTCs/DTCs ein interessanter Marker ist, dessen Nutzung für die Detektion und Therapie sich nicht vom ErbB2-Status des Primärtumors ableiten lässt.

Betrachtet man die mRNA-Expression der Zytoskelettproteine CK17/CK19/Vimentin, so zeigt sich, dass auch für die Nutzung dieser Marker eine Kombination sinnvoll wäre, um alle CTCs/DTCs unabhängig vom Differenzierungsgrad des Primärtumors zu detektieren. DTCs scheinen anhand ihres mesenchymalen Phänotyps gut anhand der Expression von Vimentin und CK5 detektierbar, während die basalen/luminalen Phänotypen anhand von CK17/CK18/CK19 detektierbar sind. Die Nutzung solcher kombinierten Antikörper für die CTC/DTC-Detektion findet bereits für das Mammakarzinom Anwendung [188] und kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auch für eine erfolgreiche Detektion von CTCs/DTCs des Pankreaskarzinoms genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Das Ablösen von Tumorzellen aus dem Gewebsverband des Primärtumors und die Migration der CTCs/DTCs in umliegende Gewebe und distante Organe ist ein kritisches Ereignis während der Tumorprogression, welches bereits frühzeitig stattfindet. Die Detektion von CTCs/DTCs könnte somit bei Karzinomen des Pankreas zu einer frühzeitigen Diagnose und einer angepassten Therapie führen. Hierfür muss die Detektion der Pankreas-CTCs/DTCs durch ein spezifisches und sensitives Verfahren mittels CTC/DTC-Charakteristiken erfolgen. Zurzeit sind keine Pankreas-CTC/DTC-Zelllinien erhältlich, anhand derer Charakteristiken abgeleitet werden können. Daher erfolgte die Wahl eines Markerspektrums, welches es ermöglicht den epithelialen Differenzierungsstatus, (CK17, CK19, Vimentin), Mechanismen der RTK-Signalübertragung (EGFR, ErbB2, ErbB3) und der Zelladhäsion (EpCAM, E-Cadherin, ALCAM) abzuleiten. Zusätzlich wurden die Stammzellmarker CD44, ALDH1 und CD133 untersucht. Das gewählte Markerspektrum konnte anhand der etablierten Mammakarzinomzelllinien validiert werden und lässt eine Einteilung in basal-epitheliale (BT-20, MDA-MB-468), luminal-epitheliale (MCF-7, BT-474, SKBR-3) und mesenchymale (MDA-MB-231, Hs578T) Phänotypen/Genotypen zu, wie sie anhand von Literaturdaten für die analysierten Mammakarzinomzelllinien bestätigt werden können. Die Anwendung dieses validierten Markerspektrums durch die Kombination der Ergebnisse aus Protein- und mRNA-Expressionsebene lässt eine Zuordnung weiterer Zelllinien zu den genannten Phänotypen/Genotypen zu. Die DTC-Zelllinien der Mamma (BC-M1, BC-S1), Lunge (LC-M1) und Prostata (PC-E1, PC-M1) zeigen ein EpCAM⁻/E-Cadherin⁻/EGFR⁻/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CK17⁻/CK19⁻/ALCAM⁺/Vimentin⁺/ALDH1⁻/CD133⁻/CD44⁺-Expressionsprofil und sind somit zum mesenchymalen Phänotyp/Genotyp zuzuordnen. Zudem bestätigt die Expression der hämatopoetischen Adhäsionsmoleküle ALCAM und CD44 die Fähigkeit von DTCs, ins Knochenmark zu migrieren.

Die vorliegenden Pankreaskarzinomzelllinien des Primärtumors Panc-1 und Panc-2 lassen sich mit dem Expressionsmuster EpCAM⁻/E-Cadherin⁻/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CK17⁻/CK19⁻/ALCAM⁺/Vimentin⁺/ALDH1⁻/CD133⁻/CD44⁺ ebenfalls dem mesenchymalen Phänotyp/Genotyp zuordnen, während BxPc3 und PaCa5061 mit dem Expressionsmuster EpCAM⁻/E-Cadherin⁺/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CK17⁺/CK19⁺/ALCAM⁻/Vimentin⁻/ALDH1⁻/CD133⁻/CD44⁻ dem luminal-epithelialen Phänotyp/Genotyp zugeordnet werden können. Die Zelllinie PaCa5156 stellt einen Zwischentyp dar, da sowohl die Expression mesenchymaler Marker (ALCAM, Vimentin und CD44) als auch die Expression epithelialer Zelladhäsionsmoleküle und CKs (E-Cadherin und CK19) gezeigt werden kann. In den Pankreaskarzinomzelllinien lässt sich auf Proteinebene, mit Ausnahme

der Zelllinien PaCa5061 (kein ErbB3) und Panc-1 (kein EGFR), das EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁻-Expressionsmuster detektieren, welches einen hoch aggressiven Zelltyp kennzeichnet. Dieses Expressionsmuster zeigen ebenfalls die Pankreas-Xenograft-Tumorzelllinien. Diese lassen sich, unabhängig von Ursprung aus Primärtumor oder Metastasen, einem luminal-epithelialen Phänotyp/Genotyp durch das EpCAM⁺/E-Cadherin⁺/ALCAM⁺/EGFR⁺/ErbB2⁺/ErbB3⁺/CK17⁺/CK19⁺/Vimentin⁻/ALDH1⁻/CD133⁻/CD44⁻Expressionsprofil zuordnen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die hämatopoetischen Adhäsionsmoleküle CD44⁺ und ALCAM einen mesenchymalen Zellphänotyp des Pankreaskarzinoms charakterisieren welcher sich ebenfalls auf CTCs/DTCs finden lässt. Daher stellen diese Marker ein interessantes Ziel für die CTC/DTC-Detektion dar. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM kann anhand der Analysen ebenfalls als Marker für die CTC/DTC-Detektion genutzt werden, wobei hier das Expressionsmuster des Primärtumors zu berücksichtigen ist. Dies gilt ebenfalls für E-Cadherin, da zwar eine Reduktion der Expression mit einer erhöhten Migrationsrate im Pankreaskarzinom einhergeht, eine Migration jedoch auch mit simultaner RTK-Expression möglich ist. Innerhalb der RTKs hat EGFR für die CTC-Detektion sowie ErbB2 für die CTC/DTC-Detektion das Potential, als Marker zu dienen. Aufgrund der heterogenen Expression der Zytoskelettproteine CK17, CK19 und Vimentin sollten auch bei der Detektion von Pankreas-CTCs/DTCs kombinierte CK-Antikörper eingesetzt werden, wobei Vimentin als zusätzlicher mesenchymaler Marker dienen kann.

Literaturverzeichnis

1. Gasbarrini, A., [*Exocrine pancreatic function in cancer of the head of the pancreas.*]. *Concours Med*, 1950. **72**(40): p. 2902-13.
2. Dubarry, J.J. and J. Chambaud, [*A clinician's unknown: the pancreas; function tests of the endocrine pancreas.*]. *J Med Bord*, 1955. **132**(7): p. 700-13.
3. Birmingham, A., *The Topographical Anatomy of the Spleen, Pancreas, Duodenum, Kidneys, &c: Illustrated by a Cast of these Viscera hardened In Situ.* *J Anat Physiol*, 1896. **31**(Pt 1): p. 95-113.
4. Winslow, T. *Normal Pancreas Anatomy.* 2009 [cited].
5. Dent, T.L., *Pancreatic disease: diagnosis and therapy.* 1983: Grune & Stratton Inc.
6. Bardeesy, N. and R.A. DePinho, *Pancreatic cancer biology and genetics.* *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(12): p. 897-909.
7. Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, *Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer.* *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006. **20**(2): p. 197-209.
8. Erikson, R.A. *Carcinomas of the gastrointestinal tract: Pancreatic Cancer.* 2009 [cited].
9. Gold, E.B. and S.B. Goldin, *Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer.* *Surg Oncol Clin N Am*, 1998. **7**(1): p. 67-91.
10. Ikeda, N., et al., *Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer.* *Br J Cancer*, 1999. **79**(9-10): p. 1553-63.
11. Fidler, I.J., *Recent concepts of cancer metastasis and their implications for therapy.* *Cancer Treat Rep*, 1984. **68**(1): p. 193-8.
12. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it.* *Dev Dyn*, 2005. **233**(3): p. 706-20.
13. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer.* *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(2): p. 118-32.
14. Fidler, I.J. and G. Poste, *The "seed and soil" hypothesis revisited.* *Lancet Oncol*, 2008. **9**(8): p. 808.
15. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade.* *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 448-56.
16. Bidard, F.C., et al., *Time to metastatic relapse and breast cancer cells dissemination in bone marrow at metastatic relapse.* *Clin Exp Metastasis*, 2008. **25**(8): p. 871-5.
17. Wu, C., et al., *Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients.* *J Thorac Oncol*, 2009. **4**(1): p. 30-6.

18. Janni, W., et al., *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer, 2005. **103**(5): p. 884-91.
19. 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.
20. DelMaschio, A., et al., *Pancreatic cancer versus chronic pancreatitis: diagnosis with CA 19-9 assessment, US, CT, and CT-guided fine-needle biopsy*. Radiology, 1991. **178**(1): p. 95-99.
21. DKFZ. *Empfehlungen für eine standardisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge* 1996 [cited].
22. Bowen, M.A., et al., *Characterization of mouse ALCAM (CD166): the CD6-binding domain is conserved in different homologs and mediates cross-species binding*. Eur J Immunol, 1997. **27**(6): p. 1469-78.
23. Lunter, P.C., et al., *Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8801-8.
24. Degen, W.G., et al., *MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule)*. Am J Pathol, 1998. **152**(3): p. 805-13.
25. Bowen, M.A. and A. Aruffo, *Adhesion molecules, their receptors, and their regulation: analysis of CD6-activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) interactions*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 795-6.
26. Bowen, M.A., et al., *The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17390-6.
27. Bowen, M.A., et al., *Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2213-20.
28. Uchida, N., et al., *The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells*. Blood, 1997. **89**(8): p. 2706-16.
29. van Kempen, L.C., et al., *Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 769-74.
30. Ihnen, M., et al., *Predictive impact of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(3): p. 419-27.
31. Kristiansen, G., et al., *ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions*. Prostate, 2003. **54**(1): p. 34-43.
32. Kahlert, C., et al., *Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse*. Br J Cancer, 2009. **101**(3): p. 457-64.

33. Munz, M., P.A. Baeuerle, and O. Gires, *The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling*. *Cancer Res*, 2009. **69**(14): p. 5627-9.
34. Went, P.T., et al., *Frequent EpCam protein expression in human carcinomas*. *Hum Pathol*, 2004. **35**(1): p. 122-8.
35. Osta, W.A., et al., *EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5818-24.
36. Cimino, A., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009.
37. Yanamoto, S., et al., *Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy*. *Oral Oncol*, 2007. **43**(9): p. 869-77.
38. Marhaba, R., et al., *CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers*. *Curr Mol Med*, 2008. **8**(8): p. 784-804.
39. Yamashita, T., et al., *EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(3): p. 1012-24.
40. Baeuerle, P.A. and O. Gires, *EpCAM (CD326) finding its role in cancer*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(3): p. 417-23.
41. Coumans, F.A., et al., *All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer*. *Ann Oncol*.
42. Spizzo, G., et al., *Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2006. **103**(2): p. 483-8.
43. Litvinov, S.V., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(5): p. 1337-48.
44. Balzar, M., et al., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. *J Mol Med*, 1999. **77**(10): p. 699-712.
45. Kimura, H., et al., *Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer*. *Int J Oncol*, 2007. **30**(1): p. 171-9.
46. Seligson, D.B., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(8): p. 2659-69.
47. Fong, D., et al., *Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance*. *J Clin Pathol*, 2008. **61**(1): p. 31-5.
48. Frixen, U.H., et al., *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells*. *J Cell Biol*, 1991. **113**(1): p. 173-85.
49. Schipper, J.H., et al., *E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis*. *Cancer Res*, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6328-37.
50. Behrens, J., et al., *Cell adhesion in invasion and metastasis*. *Semin Cell Biol*, 1992. **3**(3): p. 169-78.

51. Pignatelli, M., et al., *Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage*. J Pathol, 1994. **174**(4): p. 243-8.
52. Karayiannakis, A.J., et al., *Aberrant E-cadherin expression associated with loss of differentiation and advanced stage in human pancreatic cancer*. Anticancer Res, 1998. **18**(6A): p. 4177-80.
53. Li, Y.J. and X.R. Ji, *Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(2): p. 368-72.
54. Shin, S.J., et al., *Expression of E-cadherin and uPA and their association with the prognosis of pancreatic cancer*. Jpn J Clin Oncol, 2005. **35**(6): p. 342-8.
55. Wagener, C., *Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Vol. 3. 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
56. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
57. Taylor, J.M., W.M. Mitchell, and S. Cohen, *Characterization of the binding protein for epidermal growth factor*. J Biol Chem, 1974. **249**(7): p. 2188-94.
58. Cohen, S., G. Carpenter, and L. King, Jr., *Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity*. J Biol Chem, 1980. **255**(10): p. 4834-42.
59. Cohen, S., G. Carpenter, and L. King, Jr., *Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions*. Prog Clin Biol Res, 1981. **66 Pt A**: p. 557-67.
60. Koutselini, H., et al., *Relationship of epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and vimentin expression and various prognostic factors in breast cancer patients*. Cytopathology, 1995. **6**(1): p. 14-21.
61. Liu, S., B. Zhang, and S. Zhang, *[Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), platelet growth factor receptor (PGFR) and insulin growth factor-1 receptor (IGF-1R) on lung cancer cell]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 1998. **21**(12): p. 733-4.
62. Spano, J.P., et al., *Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival*. Ann Oncol, 2005. **16**(1): p. 102-8.
63. Korc, M., *Role of growth factors in pancreatic cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 1998. **7**(1): p. 25-41.
64. Hakariya, T., et al., *EGFR signaling pathway negatively regulates PSA expression and secretion via the PI3K-Akt pathway in LNCaP prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(1): p. 92-100.
65. Soares, R., et al., *Expression of TGF-alpha and EGFR in Breast Cancer and its Relation to Angiogenesis*. Breast J, 2000. **6**(3): p. 171-177.
66. Zhang, J.Y., et al., *[Association between the survival time and high-expression of EGFR and HER-2 in breast cancer]*. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003. **23**(10): p. 1090-2.

67. Storkel, S., et al., *EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas--a valuable tool in estimating the patient's prognosis*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1993. **29B**(4): p. 273-7.
68. Laimer, K., et al., *High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis*. Oral Oncol, 2007. **43**(2): p. 193-8.
69. Garcea, G., et al., *Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review*. Eur J Cancer, 2005. **41**(15): p. 2213-36.
70. Friess, H., et al., *Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors*. J Mol Med, 1996. **74**(1): p. 35-42.
71. Tsutsui, S., et al., *Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer*. J Surg Oncol, 2002. **79**(4): p. 216-23.
72. Lohrisch, C. and M. Piccart, *HER2/neu as a predictive factor in breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2001. **2**(2): p. 129-35; discussion 136-7.
73. Maurer, C.A., et al., *Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2*. Hum Pathol, 1998. **29**(8): p. 771-7.
74. Li, J.D., et al., *[Relationship between expressions of p53, c-erbB2 genes, proliferating cell nuclear antigen and prognosis of patients with ovarian epithelial carcinoma]*. Ai Zheng, 2002. **21**(3): p. 292-6.
75. Klufftinger, A.M., et al., *Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer*. Surg Oncol, 1992. **1**(1): p. 97-105.
76. Mahlamaki, E.H., et al., *Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **35**(4): p. 353-8.
77. Zhang, L. and S.Z. Yuan, *Expression of c-erbB-2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and TGF-beta1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002. **1**(4): p. 620-3.
78. Standop, J., et al., *ErbB2 growth factor receptor, a marker for neuroendocrine cells?* Pancreatology, 2005. **5**(1): p. 44-58.
79. Kraus, M.H., et al., *Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9193-7.
80. Sliwkowski, M.X., et al., *Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14661-5.
81. Alimandi, M., et al., *Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas*. Oncogene, 1995. **10**(9): p. 1813-21.
82. Rajkumar, T., et al., *Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB2 and c-erbB3 in bladder cancer*. J Pathol, 1996. **179**(4): p. 381-5.
83. Shintani, S., et al., *Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 1995. **95**(1-2): p. 79-83.

84. Shen, K., J. Lang, and L. Guo, [*Overexpression of C-erbB3 in transitional cell carcinoma of the ovary*]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 1995. **30**(11): p. 658-61.
85. Rajkumar, T., et al., *c-erbB3 protein expression in ovarian cancer*. *Clin Mol Pathol*, 1996. **49**(4): p. M199-M202.
86. Holbro, T., et al., *The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(15): p. 8933-8.
87. Stern, D.F., *ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008. **13**(2): p. 215-23.
88. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
89. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
90. Clarkson, B., et al., *Studies of cellular proliferation in human leukemia. I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine*. *J Clin Invest*, 1967. **46**(4): p. 506-29.
91. Dicke, K.A., et al., *Leukemic cell colony formation in soft agar by bone marrow cells and peripheral blood cells from untreated acute leukemia patients*. *Exp Hematol*, 1983. **11**(4): p. 341-50.
92. Dicke, K.A., et al., *In vitro colony growth of acute myelogenous leukemia*. *Hamatol Bluttransfus*, 1976. **19**: p. 63-77.
93. Moore, M.A., N. Williams, and D. Metcalf, *In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: interaction between colony-forming and colony-stimulating cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **50**(3): p. 591-602.
94. Metcalf, D., M.A. Moore, and N.L. Warner, *Colony formation in vitro by myelomonocytic leukemic cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1969. **43**(4): p. 983-1001.
95. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
96. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
97. Kristiansen, G., et al., *CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(13): p. 4906-13.
98. Kristiansen, G., et al., *CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(4): p. 1215-21.
99. Kristiansen, G., et al., *CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(2): p. 231-6.
100. Ahmed, M.A., et al., *CD24 shows early upregulation and nuclear expression but is not a prognostic marker in colorectal cancer*. *J Clin Pathol*, 2009. **62**(12): p. 1117-22.
101. Lee, J.H., et al., *CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis*. *Oncol Rep*, 2009. **22**(5): p. 1149-56.

102. Takada, M., M. Yamamoto, and Y. Saitoh, *The significance of CD44 in human pancreatic cancer: II. The role of CD44 in human pancreatic adenocarcinoma invasion*. *Pancreas*, 1994. **9**(6): p. 753-7.
103. Gotoda, T., et al., *Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer*. *Jpn J Cancer Res*, 1998. **89**(10): p. 1033-40.
104. Hong, S.P., et al., *CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(10): p. 2323-31.
105. Balic, M., et al., *Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(19): p. 5615-21.
106. LaBarge, M.A. and M.J. Bissell, *Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells?* *J Clin Invest*, 2008. **118**(6): p. 2021-4.
107. Shmelkov, S.V., et al., *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(6): p. 2111-20.
108. Beier, D., et al., *CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors*. *Brain Pathol*, 2008. **18**(3): p. 370-7.
109. Horst, D., et al., *Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(8): p. 844-50.
110. Horst, D., et al., *CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(8): p. 1285-9.
111. Maeda, S., et al., *CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(8): p. 1389-97.
112. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(3): p. 313-23.
113. Croker, A.K., et al., *High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8B): p. 2236-52.
114. Hess, D.A., et al., *Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2006. **107**(5): p. 2162-9.
115. Ran, D., et al., *Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem cell features and correlates with adverse clinical outcomes*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(12): p. 1423-34.
116. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(5): p. 555-67.
117. Charafe-Jauffret, E., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer*. *Clin Cancer Res*. **16**(1): p. 45-55.

118. Aktas, B., et al., *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(4): p. R46.
119. Moll, R. and W.W. Franke, *Intermediate filaments and their interaction with membranes. The desmosome-cytokeratin filament complex and epithelial differentiation*. Pathol Res Pract, 1982. **175**(2-3): p. 146-61.
120. Steinert, P.M. and D.R. Roop, *Molecular and cellular biology of intermediate filaments*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 593-625.
121. Vora, H.H., et al., *Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer*. Int J Biol Markers, 2009. **24**(1): p. 38-46.
122. Liu, Z.B., et al., [*Expression of CK5/6 and CK17 and its correlation with prognosis of triple-negative breast cancer patients*]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2008. **30**(8): p. 610-4.
123. Kalinina, T., et al., *Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung*. Under Revision at BMC Cancer, 2010.
124. Cailleau, R., M. Olive, and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. In Vitro, 1978. **14**(11): p. 911-5.
125. Sheridan, C., et al., *CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(5): p. R59.
126. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
127. Lasfargues, E.Y. and L. Ozzello, *Cultivation of human breast carcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1958. **21**(6): p. 1131-47.
128. Lasfargues, E.Y., W.G. Coutinho, and A.S. Dion, *A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus replication*. In Vitro, 1979. **15**(9): p. 723-9.
129. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **59**(1): p. 221-6.
130. 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.
131. Willipinski-Stapelfeldt, B., et al., *Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(22): p. 8006-14.
132. Putz, E., et al., *Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 241-8.
133. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. Int J Cancer, 1975. **15**(5): p. 741-7.

134. Jaffee, E.M., et al., *Development and characterization of a cytokine-secreting pancreatic adenocarcinoma vaccine from primary tumors for use in clinical trials.* Cancer J Sci Am, 1998. **4**(3): p. 194-203.
135. Tan, M.H., et al., *Characterization of a new primary human pancreatic tumor line.* Cancer Invest, 1986. **4**(1): p. 15-23.
136. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
137. Fermentas. *Protocol: Semi-dry Protein Transfer for Western Blotting.* [cited.
138. Hiraguri, S., et al., *Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines.* Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1972-7.
139. Lombaerts, M., et al., *E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines.* Br J Cancer, 2006. **94**(5): p. 661-71.
140. Jezierska, A., W. Matysiak, and T. Motyl, *ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy.* Med Sci Monit, 2006. **12**(8): p. BR263-73.
141. Lacroix, M. and G. Leclercq, *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.* Breast Cancer Res Treat, 2004. **83**(3): p. 249-89.
142. Sipos, B., et al., *A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform.* Virchows Arch, 2003. **442**(5): p. 444-52.
143. Xu, H., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells.* Mol Cancer Ther, 2005. **4**(3): p. 435-42.
144. Kim, A., et al., *Functional interaction between mouse erbB3 and wild-type rat c-neu in transgenic mouse mammary tumor cells.* Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. R708-18.
145. Paterlini-Brechot, P. and N.L. Benali, *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions.* Cancer Lett, 2007. **253**(2): p. 180-204.
146. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.* Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
147. Abd El-Rehim, D.M., et al., *Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma.* J Pathol, 2004. **203**(2): p. 661-71.
148. Korsching, E., et al., *Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis.* Lab Invest, 2002. **82**(11): p. 1525-33.
149. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.* Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
150. van de Rijn, M., et al., *Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.* Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 1991-6.
151. Davidson, N.E., et al., *Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines.* Mol Endocrinol, 1987. **1**(3): p. 216-23.

152. Filmus, J., et al., *MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **128**(2): p. 898-905.
153. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
154. deFazio, A., et al., *Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines*. *Int J Cancer*, 2000. **87**(4): p. 487-98.
155. Klingbeil, P., et al., *CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification*. *Breast Cancer Res Treat*. **120**(1): p. 95-109.
156. Naor, D., R.V. Sionov, and D. Ish-Shalom, *CD44: structure, function, and association with the malignant process*. *Adv Cancer Res*, 1997. **71**: p. 241-319.
157. Sackstein, R., et al., *Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone*. *Nat Med*, 2008. **14**(2): p. 181-7.
158. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
159. Roetger, A., et al., *Selection of potentially metastatic subpopulations expressing c-erbB-2 from breast cancer tissue by use of an extravasation model*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(6): p. 1797-806.
160. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(7): p. 973-81.
161. Ling, L.J., et al., *A novel mouse model of human breast cancer stem-like cells with high CD44+CD24-/lower phenotype metastasis to human bone*. *Chin Med J (Engl)*, 2008. **121**(20): p. 1980-6.
162. Bailey, J.M., P.K. Singh, and M.A. Hollingsworth, *Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins*. *J Cell Biochem*, 2007. **102**(4): p. 829-39.
163. Mansi, J.L., et al., *Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1987. **295**(6606): p. 1093-6.
164. Wiedswang, G., et al., *Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(16): p. 5342-8.
165. Braun, S., 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*, 2000. **342**(8): p. 525-33.
166. 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.
167. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-15.
168. Behrens, J., et al., *The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility*. *EXS*, 1991. **59**: p. 109-26.

169. Bartkowiak, K., et al., *Discovery of a novel unfolded protein response phenotype of cancer stem/progenitor cells from the bone marrow of breast cancer patients*. J Proteome Res.
170. Bhagwandin, V.J. and J.W. Shay, *Pancreatic cancer stem cells: fact or fiction?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(4): p. 248-59.
171. Braun, S., et al., *ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1890-5.
172. Herzig, K.H., M. Altmannsberger, and U.R. Folsch, *Intermediate filaments in rat pancreatic acinar tumors, human ductal carcinomas, and other gastrointestinal malignancies*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1326-32.
173. Hoorens, A., et al., *Undifferentiated carcinoma of the pancreas: analysis of intermediate filament profile and Ki-ras mutations provides evidence of a ductal origin*. J Pathol, 1998. **185**(1): p. 53-60.
174. Tzeng, C.W., et al., *EGFR genomic gain and aberrant pathway signaling in pancreatic cancer patients*. J Surg Res, 2007. **143**(1): p. 20-6.
175. Thomas, P.A., et al., *Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2698-703.
176. Hendrix, M.J., et al., *Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 483-95.
177. Karkkainen, M.J., T. Makinen, and K. Alitalo, *Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. E2-5.
178. Daniel, V.C., et al., *A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3364-73.
179. Jimeno, A., et al., *A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(2): p. 310-4.
180. Antolovic, D., et al., *Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies*. BMC Biotechnol. **10**: p. 35.
181. Myung, J.H., et al., *Enhanced Tumor Cell Isolation by a Biomimetic Combination of E-selectin and anti-EpCAM: Implications for the Effective Separation of Circulating Tumor Cells (CTCs)*. Langmuir.
182. Hazan, R.B. and L. Norton, *The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9078-84.
183. von Burstin, J., et al., *E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 361-71, 371 e1-5.

184. Xi, L., et al., *Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers*. Clin Chem, 2007. **53**(7): p. 1206-15.
185. Wang, J.Y., et al., *Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis*. World J Surg, 2006. **30**(6): p. 1007-13.
186. Wulfing, P., et al., *HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1715-20.
187. Fehm, T., et al., *Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. R74.
188. Effenberger, K.E., et al., *Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern*. Breast Cancer Res Treat.

A1 Häufig verwendete Materialien

Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Analysenwaage Satorius BP6100	MS Laborgeräte – Wiesloch, Deutschland
Biosphere® Filter Tips 20µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt – Nümbrecht, Deutschland
Blottingkammer Protean® II xi cell	Bio-Rad Laboratories GmbH – München, Deutschland
Cassettes 1.0mm	Invitrogen™ Ltd. – Paisley, UK
Cellstar tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one – Kremsmünster, Österreich
Durchlichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH – Wetzlar, Deutschland
Filme: Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare – Buckinghamshire, UK
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR – Darmstadt, Deutschland
Gel Blot Paper Whatman®	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems Inc. – Foster City, USA
Hypercassette™	Amersham Life Science – Buckinghamshire, UK
Immobilon™ Transfer Membranes	Millipore™ – Billerica, USA
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, USA
T25-, T75-Zellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, USA
Dampfsterilisator	H+P – Oberschleißheim, Deutschland
Hera150 – Brutschrank Hereaus	Kendro – Langenselbold, Deutschland
pH-Meter inoLab	WTW – Heidelberg, Deutschland
Küvetten 10x4x45mm	Sarstedt – Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesiv Film	Applied Biosystems Inc. – Foster City, USA
Mikro 20	Hettich Zentrifugen – Tuttlingen, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
Mr. Frosty Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, USA
PerlPrimer v. 1.1.18	Free Software Foundation – Boston, USA

Appendix

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Photometer 6138	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte – Everstadt, Deutschland
realplex4 Mastercycler epgradient S	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
ReverseComplement	Bioinformatics – Hudson, USA
Spitzen MultiFlex Round Tips 1-200µl	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
Twin.tec real-time PCR plates 96	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
UCSC in-silico PCR	UCSC Genome Bioinformatics Group – Santa Cruz, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc – Bohemia, USA
Werkbank Hera safe	Kendro – Langensbold, Deutschland
Xcell SureLock™ Mikroreaktionsgefäße	Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
Primer3Plus	Free Software Foundation – Boston, USA

Tabelle 8 Übersicht der verwendeten analytischen Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, USA
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas – St. Leon-Roth, Deutschland
QIAshredder™	QIAGEN – Hilden, Deutschland
Rnase-free Dnase Set	QIAGEN – Hilden, Deutschland
Rneasy® Mini Kit	QIAGEN – Hilden, Deutschland
Venor®GeM	Minerva Biolabs GmbH – Berlin, Deutschland

Tabelle 9 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
anti- α -Tubulin antibody (clone 11H10)	Cell Signaling Technology® – Danvers, USA
anti-CD24 antibody (clone 24C02, SN3b)	Dianova – Hamburg, Deutschland
anti-CD44 antibody	Abcam – Cambridge, USA
E-Cadherin (clone EP700Y)	Epitomics® – Burlingame, USA
anti-EGFR antibody (clone sc-03)	Santa Cruz Biotechnology® – Santa Cruz, USA
anti-EpCam antibody (clone VU-1D9)	Abcam – Cambridge, USA
anti-ErbB-3 antibody (C17)	Santa Cruz Biotechnology® – Santa Cruz, USA
anti-ALCAM/CD166 antibody	Abcam – Cambridge, USA
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin	Dako – Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulin	Dako – Glostrup, Dänemark

Tabelle 10 Übersicht der verwendeten Zytokine

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Basic Fibroblast Growth Factor (human)	PeproTech GmbH – Hamburg, Deutschland
Epidermal Growth Factor	PeproTech GmbH – Hamburg, Deutschland

Tabelle 11 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
100 bp Molekulargewichtsmarker	Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
SeaKem® LE Agarose	Lonza Cologne AG – Köln, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
RNase free H ₂ O	QIAGEN – Hilden, Deutschland
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus	Eurogenetec – Seraing, Belgium
Isopropanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland

Appendix

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH – Heidelberg, Deutschland
Acrylamid Rotiophorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Trizma® Base (Tris/HCL)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	SERVA Electrophoresis GmbH – Heidelberg, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V. – Deventer, Niederlande
N,N,N,N-Tetramethylendiamin (TEMED)	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Coomassie brilliant blue	Bio-Rad Laboratories – München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Mallinckrodt Baker B.V. – Deventer, Niederlande
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
DPBS	Gibco® Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Gibco® Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid > 99,6%	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
Rnase Zap®	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco® Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS) EU approved	PAA Laboratories GmbH – Pasching, Österreich
Transferrin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland

Appendix

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Gentamycin	Biochrom AG – Berlin, Deutschland
RPMI 1640	Gibco® Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Gibco® Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD Protein-Marker V	peqlabs Biotechnologie GmbH – Erlangen, Deutschland
Substratlösung: Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare – Buckinghamshire, UK
Phosphorsäure	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen™ – Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH – Heidelberg, Deutschland

A2 Primerpaare und gemessene Effizienz

Tabelle 12 Übersicht der getesteten Primer-Sequenzen

Zielgen	cDNA-Seq.	Bezeichnung	Sequenz(5'-3')	Effizienz	T _m (°C)
β-2-Microglobulin	NM_004048	B2M-1F	GCTATCCAGCGTACTCCAAAGA	1,14	60,3
		B2M-1R	GAAAGACAAGTCTGAATGCTCCAC		61
		B2M-2F	CTCCGTGGCCTTAGCTGTG	0,97	61
		B2M-2R	CCATTCTCTGCTGGATGACG		59,4
EGFR	NM_201282	EGFR-1F	GGACTCTGGATCCCAGAAGGTG	0,94	64
		EGFR-1R	GCTGGCCATCACGTAGGCTT		61,4
		EGFR-2F	TCTTGACAGCGATACAGCTCAG	0,91	59,8
		EGFR-2R	TTGGGAACGGACTGGTTTATG		57,9
ALCAM	NM_001627	ALCAM-1F	GCTCTTCTGCCTCTTGATCTCC	1,06	62,1
		ALCM-1R	TACGTCAAGTCGGCAAGGTATG		60,3
		ALCAM-2F	GCTTCAACAGCCATCACAGTTC	0,95	60,3
		ALCAM-2R	CCATACCACAGTTGCATTCTG		60,3
ALDH1	NM_000689	ALDH1-1F	GATGCCGACTTGGACAATG	1,33	56,7
		ALDH1-1R	CTTCTTAGCCCGCTCAACAC		59,4
		ALDH1-2F	AACTCCTCTCACTGCTCTCCACG	0,92	64,2
		ALDH1-2R	GTCACCCTCTTCAGATTGCTTTTCC		63
CD133	NM_006017	CD133-1F	ACAATCACTGAGCACTCTATACC	0,95	58,9
		CD133-1R	GTTCTCCCATACTTCTTAGTTTCC		59,3
		CD133-2F	CTGAATAGCAACCCTGAACTG	1,32	57,9
		CD133-2R	GATTGATAGCCCTGTTGGAC		57,3
EpCAM	NM_002354	EpCAM-1F	TTGCTGTTATTGTGGTTGTGG	1,23	55,9
		EpCAM-1R	CCCTATGCATCTCACCCATC		59,4
		EpCAM-2F	TATGAGAAGGCTGAGATAAAGGAG	0,95	59,4
		EpCAM-2R	TTGTGTCCATTTGCTATTTCCC		56,5
CK19	NM_002276	CK19-1F	CTTCCGAACCAAGTTTGAGAC	1,06	57,9
		CK19-1R	AGCGTACTGATTTCCCTCCTC		57,3
		CK19-2F	GACTACAGCCACTACTACACG	0,88	57,3
		CK19-2R	ACTGATTTCTCCTCATGGT		61,4
CK17	NM_000422	CK17-1F	CTTCCGCACCAAGTTTGAGAC	0,94	59,8
		CK17-1R&2R	GAGGTTCTCAATCTGCATCTCCA		60,6
		CK17-2F	TTCCGCACCAAGTTTGAGAC	0,71	57,2
Vimentin	NM_003380	Vimentin-1F	GCCCTTGACATTGAGATTGCC	0,89	61
		Vimentin-1R	ATCCAGATTAGTTCCCTCAGGT		58,9
		Vimentin-2F	CCCTTGACATTGAGATTGCCAC	0,72	60,3
		Vimentin-2R	AATCCAGATTAGTTCCCTCAGGT		59,3

A3 Konzentrationsmessung der RNA mittels Nanodrop

Tabelle 13 RNA-Konzentration nach Isolierung mittels RNeasy Mini Kit

<i>Zelllinie</i>	<i>Konzentration</i>	<i>A260</i>	<i>A280</i>	<i>A260/280</i>	<i>µl für cDNA-Synthese (2,5 µg)</i>
MDA-MB-468	1003,4	25,08	11,8	2,18	2,49
BC-M1	388,6	9,71	4,71	1,98	6,48
Panc-1	619,15	15,47	7,18	2,16	4,04
Panc-2	676,58	16,91	7,86	2,15	3,69
BxPc3	558,7	13,96	6,49	2,15	4,47
PaCa5156	429,83	10,74	5,27	2,04	6,82
PaCa5061	402,83	10,07	4,85	2,07	6,21
PT1	690,1	17,25	7,97	2,16	3,62
PT2	630,8	15,77	7,37	2,14	3,96
PT3	441,74	11,04	5,44	2,03	5,66
PT4	356,1	8,9	4,28	2,08	7,02
PT5	681,7	17,04	7,95	2,14	3,67
Leber1	370,4	9,26	4,48	2,16	6,75
Leber2	597	14,92	6,91	2,16	4,19
Lunge	419,58	10,49	5,14	2,15	5,96
Milz	267,2	6,68	3,17	2,1	9,36
LM5314	661,76	16,54	7,73	2,14	3,78
LN5314	547,3	13,68	6,35	2,16	4,57

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde am Institut für Tumorbilogie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Harms-Effenberger durchgeführt.

Mein Dank gilt dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Pantel und Frau Dr. Harms-Effenberger für die Möglichkeit der Bearbeitung des Projektes und die hervorragende Betreuung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wacker für die Betreuung seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Kai Bartkowiak und Dr. Sönke Meyer-Staeckling, ohne deren fachliche Kompetenz und Engagement die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie Diplom-Biologin Iris Alpers und cand. med. Cornelia Schroeder für vielseitige Unterstützung und kritische Reflektion.

Antje Andreas, Andreas Bauche, Christin Beneken und Julia Schröder danke ich für zahlreiche Hilfestellungen, Aliquots und ihre fortwährende Geduld.

Ein Dank von Herzen geht an meine Eltern und meine Schwester. 11 ³/₄.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

Datum

Unterschrift