



Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
der Technischen Universität München
Klinikum Rechts der Isar

Etablierung sensitiver molekularbiologischer Nachweismethoden zur Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen beim Mammakarzinom

Sabine Lüttke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen
2. Prof. Dr. Wilko Weichert

Die Dissertation wurde am 29.05.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.12.2018 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Brustkrebs.....	7
1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation.....	7
1.1.2 Modelle der Metastasierungskaskade	9
1.1.3 Therapieoptionen.....	10
1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bei Patientinnen mit Brustkrebs	11
1.2.1 Charakteristik und klinische Bedeutung von CTCs	11
1.2.2 Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs	12
1.3 Marker für die molekulargenetische Charakterisierung von CTCs.....	14
1.3.1 Östrogenrezeptor (<i>ER</i>).....	14
1.3.2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>HER2</i>).....	15
1.3.3 Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptortyp C (<i>PTPRC</i>).....	15
1.4 Zielsetzung.....	16
2 Methoden und Material.....	17
2.1 Methoden.....	17
2.1.1 Real-time PCR	17
2.1.2 Auswertung der molekulargenetischen Untersuchungen	18
2.1.3 Probenmaterial.....	20
2.1.4 Überblick über die unterschiedlichen Workflows	22
2.1.5 Workflow zu Experimenten mit unfixierten Zellen	23
2.1.6 Workflow zur Präamplifikation	25
2.1.7 Workflow zu Experimenten mit fixierten Zellen	25
2.1.8 Workflow zu Kontaminations- und Drahtexperimenten.....	26
2.1.9 Verwendete Arbeitskits	28
2.1.10 Nomenklatur der Experimente.....	31
2.2 Material	33
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Etablierung des Östrogenrezeptor (<i>ER</i>) Markersystems.....	35
3.1.1 Verdünnungsreihen der Zelllinie MCF-7.....	35
3.1.2 Versuche mit unfixierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich	40

3.2	Etablierung des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (<i>HER2</i>) Markersystems	42
3.2.1	Verdünnungsreihen der Zelllinie SK-BR-3	42
3.2.2	Versuche mit unfixierten SK-BR-3 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich	47
3.3	Etablierung des Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptortyp C (<i>PTPRC</i>) Markersystems	49
3.3.1	Verdünnungsreihen der Zelllinie U937	49
3.3.2	Versuche mit unfixierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich	53
3.4	Versuche mit fixierten Zellen	56
3.4.1	Vergleich der Fixierungsmethoden in Vorversuchen	56
3.4.2	<i>ER</i> -Expression in Aceton-fixierten MCF-7 Zellen	56
3.4.3	<i>HER2</i> -Expression in Aceton-fixierten SK-BR-3 Zellen	57
3.4.4	<i>PTPRC</i> -Expression Aceton-fixierten U937 Zellen	58
3.5	Kontaminations- und Drahtversuche	59
3.5.1	<i>ER</i> -Expression in cDNA-Mischproben aus MCF-7 und U937 Zellen	59
3.5.2	<i>HER2</i> -Expression in cDNA-Mischproben aus SK-BR-3 und U937 Zellen	60
3.5.3	<i>HER2</i> -Expression in Lysaten aus SK-BR-3 Zellen und Drahtstücken	60
4	Diskussion	62
4.1	Diskussion der Methode	62
4.2	Relative Quantifizierung der Genexpression von <i>ER</i> , <i>HER2</i> und <i>PTPRC</i>	65
4.2.1	Analyse der Versuche mit unamplifizierten cDNA-Proben	65
4.2.2	Analyse der Versuche mit präamplifizierten cDNA-Proben	68
4.2.3	Analyse der Versuche mit fixierten Zellen	71
4.3	Analyse der Kontaminations- und Drahtversuche	72
4.4	Klinischer Bezug und Ausblick	74
4.5	Zusammenfassung	76
4.6	Summary (Englische Zusammenfassung)	77
5	Literaturverzeichnis	78
6	Anhang	89
7	Danksagung	117
8	Lebenslauf	118

Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
APC	Antigen-Presenting Cell
Bp	Basenpaare
BRCA 1,2	Breast Cancer 1,2 (Bezeichnung zweier Genorte für erblichen Brustkrebs)
CA15-3	Cancer-Antigen 15-3 (Tumormarker, u.a. für Brustkrebs)
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CEA	Carcinoembryonales Antigen (Tumormarker, u.a. für Brustkrebs)
CK	Cytokeratin
CT	Cycle threshold
CTCs	Circulating tumor cells
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindole
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
depFFF	Dielectrophoretic Flow-Field Fractionation
DEP-Kanal	Dielectrophoresis-Kanal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
E	Effizienz
EB	Elution buffer
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
EPISPOT	Epithelial Immunospot
<i>ER</i>	Estrogen receptor
ERE	Estrogen-response-element
FAST	Fiberoptic Array Scanning Technology
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration (US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit)
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FRET	Förster-Energietransfer
FSMW	Functionalized structured medical wire
GA733-2	Gastrointestinal tumor associated antigen 733-2
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOI	Gene of interest
<i>GUSB</i>	Glucuronidase, beta

HB-Chip	Herringbone-chip
<i>HER2</i>	Human epidermal growth factor receptor 2
HKG	Housekeeping-Gen
<i>HMBS</i>	Hydroxymethylbilane synthase
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
hTERT	Telomerase reverse transcriptase
ISET	Isolation by size of epithelial tumor cells
ISO	International Organization for Standardization
<i>Ki-67</i>	Proliferationsmarker
MAP	Mitogen-activated protein
MCF-7	Michigan-Cancer Foundation-7 (Brustkrebs-Zelllinie)
MOFF	Multi-Orifice Flow Fractionation
MUC1	Muc-1-gene
MW	Mittelwert
NaOH	Natronlauge
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
NSH	N-hydroxysuccinimid
NTC	No template control (Negativkontrolle)
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
<i>PTPRC</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
RAS	Rat sarcoma (Proto-Onkogen)
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Reverse Transkription
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SK-BR-3	Brustkrebs-Zelllinie
β -ME	Beta-Mercaptoethanol
STABW	Standardabweichung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNM	Klassifikation maligner Tumoren (T= Tumor, N= Nodus, M= Metastasen)
U937	histiozytische Leukämie-Zelllinie

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Brustkrebs ist mit zuletzt rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung der Frau. Für das Jahr 2018 wird eine Inzidenz von 71.900 Frauen geschätzt (Robert Koch-Institut [Hrsg.] und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.] 2017). Das bedeutet, dass etwa jede achte Frau im Laufe ihres Lebens davon betroffen ist (Tabelle 1-1).

Die zwischen den Jahren 2005 bis 2008 sprunghaft angestiegene Neuerkrankungsrate lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass durch vermehrt durchgeführte Früherkennungsprogramme, wie das Mammographie-Screening, Tumore vor allem im Frühstadium häufiger entdeckt wurden. Möglicherweise dadurch, vor allem aber durch Fortschritte in der Entwicklung geeigneter Therapien versterben inzwischen weniger Frauen an Brustkrebs als noch vor 10 Jahren (Abbildung 1-1 und Abbildung 1-2; Robert Koch-Institut [Hrsg.] und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.] 2017).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate von Patientinnen mit Mammakarzinom lag 2013 bis 2014 bei 88% (Tabelle 1-1). Die individuelle Prognose einer an Brustkrebs erkrankten Patientin ist jedoch abhängig vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Tabelle 1-1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C50 (Robert Koch-Institut [Hrsg.] und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.] 2017).

Inzidenz	2013		2014		Prognose für 2018	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	670	70.820	650	69.220	700	71.900
rohe Erkrankungsrate ¹	1,7	172,0	1,6	167,7	1,8	173,0
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	1,1	118,3	1,1	114,6	1,1	116,5
mittleres Erkrankungsalter ³	72	64	71	64		
Mortalität	2013		2014		2015	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Sterbefälle	156	17.853	134	17.670	159	18.136
rohe Sterberate ¹	0,4	43,4	0,3	42,8	0,4	43,7
standardisierte Sterberate ^{1,2}	0,2	23,6	0,2	23,0	0,3	23,0
mittleres Sterbealter ³	74	74	73	74	75	75

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median

Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Prävalenz	2.400	311.400	3.800	559.900
absolute Überlebensrate (2013–2014) ⁴	60	79 (79–81)	45	66 (64–68)
relative Überlebensrate (2013–2014) ⁴	73	88 (87–88)	69	82 (81–83)

⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

1. Einleitung

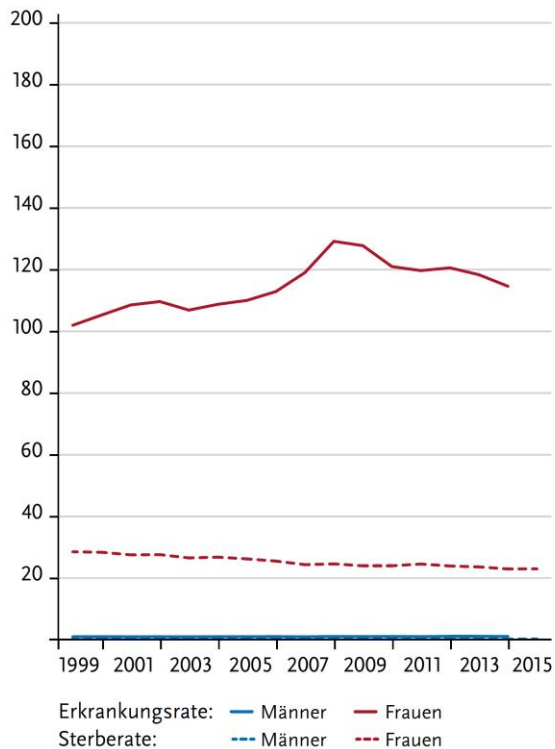


Abbildung 1-1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 1999 – 2014/2015; je 100.000 (Europastandard) (Robert Koch-Institut [Hrsg.] und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.] 2017).

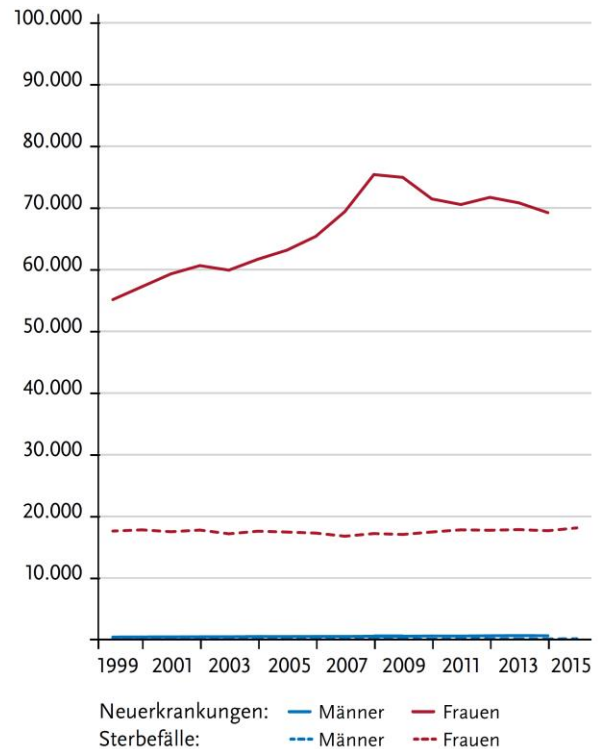


Abbildung 1-2: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 1999 – 2014/2015 (Robert Koch-Institut [Hrsg.] und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.] 2017).

Die Genese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell. Neben hormonellen und exogenen Risikofaktoren wie frühe Menarche, späte Menopause, ausgebliebene Schwangerschaften, erhöhter Body-Mass-Index, übermäßiger Alkoholkonsum und Bewegungsmangel, kann auch ein genetisches Risiko durch Brustkrebsgene bestehen (Mavaddat et al. 2010). Eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 führt zu einem höheren Risiko an Brustkrebs zu erkranken (Antoniou et al. 2003).

Brustkrebs wird morphologisch in invasive und nicht-invasive Karzinome und histologisch in duktales und lobuläres Karzinome eingeteilt. Der häufigste Typ nicht-invasiver Karzinome ist dabei das duktales Carcinoma in situ (DCIS), welches sich in den Milchgängen ausbreitet, ohne dabei die Basalmembranen zu überschreiten. Invasive Karzinome zeigen hingegen ein Wachstum über die Basalmembran hinaus in das Brustgewebe. Die mit 40-75% größte Gruppe aller invasiven Mammakarzinome bildet das klassische invasive duktales Karzinom (Makki 2015). Immunhistochemisch wird weiter spezifiziert und in die Subtypen Luminal A, Luminal B, HER2-überexprimierte und Triple-negative Mammakarzinome eingeteilt. Hierbei wird die Expression der Hormonrezeptoren (Estrogen, Progesteron), HER2 und Ki-67 untersucht (siehe Tabelle 1-2). Je nach Subtyp können das entsprechende Therapiekonzept ausgesucht und bereits Aussagen über die Prognose der Erkrankung getroffen werden (Makki 2015).

1. Einleitung

Tabelle 1-2: Immunhistochemisches Profil der molekularen Subtypen des Mammakarzinoms. Modifiziert nach Aubele et al. 2017 (Tabelle 1, Seite 2) und Makki 2015 (Tabelle 4, Seite 30).

Klassifikation	Luminal A	Luminal B	HER2- Überexpression	Triple negativ
Expression	ER und/oder PR +	ER und/oder PR +	ER und PR –	ER und PR –
	HER2 – Ki-67 (< 14%)	HER2 +/- Ki-67 (≥ 14%)	HER2 +	HER2 –
Häufigkeitsverteilung	~65%	~15%	~5%	~15%

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation. Hierbei werden die Tumorgroße, die Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen berücksichtigt. Zusätzlich erfolgt ein sogenanntes Grading des Tumors, also die Ermittlung des Grades der zellulären Differenzierung, Zellkernatypien, intraluminalen Nekrosen, sowie Mitoserate und Kalzifizierung mittels mikroskopischer Untersuchung (Makki 2015).

1.1.2 Modelle der Metastasierungskaskade

Metastasen bilden sich bei der Brustkrebserkrankung am häufigsten in Lymphknoten, Knochen, Lunge und Leber (Lee 1983; Weigelt et al. 2005). Bei 20-30% der Brustkrebspatientinnen mit Fernmetastasen sind die Lymphknoten jedoch nicht befallen (Braun et al. 2000). Das lässt vermuten, dass Brustkrebszellen den Weg über die Lymphknoten umgehen können und direkt über die Blutbahn Fernmetastasen bilden können (Pantel und Brakenhoff 2004).

Zunächst wurde angenommen, dass Tumoren erst in späteren Stadien der Tumorprogression metastasieren und dass nur Subpopulationen von Primärtumoren die Fähigkeit besitzen, Metastasen zu bilden (Fidler und Kripke 1977). Dem widersprechen jedoch neuere Studien, welche aufzeigen, dass primäre Brustkrebszellen bestimmte Genexpressionsmuster aufweisen, welche eine Metastasenbildung vorhersagen (van't Veer et al. 2002) und dass nicht nur Subpopulationen, sondern die meisten Zellen des Primärtumors die Fähigkeit zur Metastasenbildung besitzen (Bernards und Weinberg 2002). Derzeit geht man davon aus, dass eine Disseminierung von Tumorzellen in die Blutbahn bereits in sehr frühen Tumorstadien geschieht (Weigelt et al. 2005).

In den von Pantel und Brakenhoff (2004) dargestellten Modellen wird zwischen dem lymphogenen und dem hämatogenen Metastasierungsweg unterschieden (siehe Abbildung 1-3). Im ersten Modell wandern im frühen Stadium des Primärtumorwachstums Tumorzellen in einen Lymphknoten, in welchem sie solide Metastasen bilden. Weiterhin wandern einzelne Zellen über die Blutbahn zu entfernteren Stellen im Körper, wo sie entweder zugrunde gehen oder als sogenannte „dormant cells“ ruhen. Im späteren Stadium disseminieren schließlich Tumorzellen in die Peripherie, wo sie beginnen sekundäre Metastasen zu bilden. Im zweiten Modell gelangen schon in frühesten Tumorstadien Zellen, welche sich vom Primärtumor abspalten, direkt in die Blutbahn und bilden Fernmetastasen ohne die Lymphknoten zu passieren.

1. Einleitung

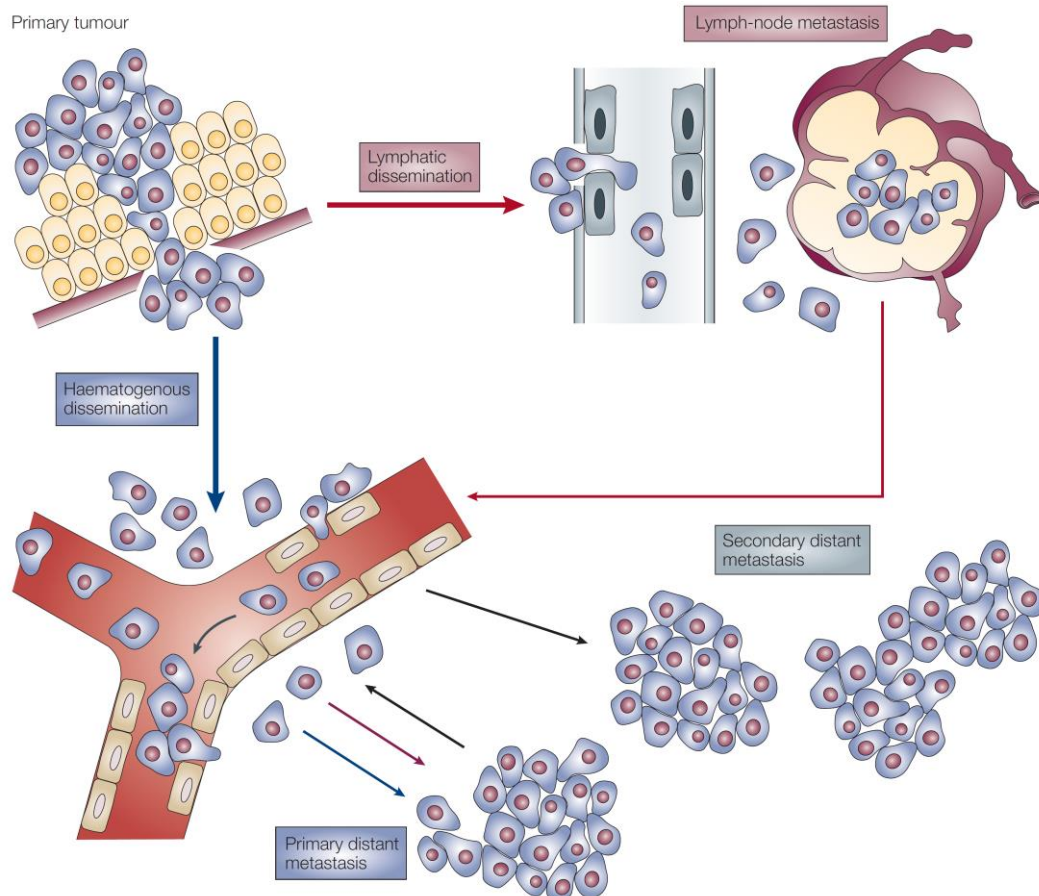


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung unterschiedlicher Modelle der Metastasierung (aus Pantel und Brakenhoff 2004, Abbildung 3, Seite 454).

1.1.3 Therapieoptionen

In Deutschland erfolgen Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms nach der jeweils aktuellen interdisziplinären S3-Leitlinie und den aktuellen Leitlinien und Empfehlungen etwa der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO). Therapieoptionen sind die chirurgische Resektion des Tumors, die Wächter-Lymphknoten-Biopsie/-Exzision bzw. die axilläre Lymphadenektomie und die Bestrahlung sowie die Chemotherapie mit Zytostatika (z.B. Anthrazykline und Taxane), die Antihormontherapie (z.B. Tamoxifen und Aromataseinhibitoren) und sogenannte „zielgerichtete“ Therapien (targeted therapy mit z.B. Trastuzumab und Lapatinib; AGO Breast Committee 2017). Die Therapien werden stadienabhängig und zumeist kombiniert angewendet. Ob Chemo-, antihormonelle oder „zielgerichtete“ Therapien zum Einsatz kommen, ist abhängig von Tumor-Grading, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptorstatus sowie *HER2*-Status. So sollten antihormonelle Therapien nur bei endokrin sensitiven Tumoren eingesetzt werden, beispielsweise bei *ER*-positiven Tumoren mit Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptor Modulator (AGO Breast Committee 2017). Die Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin), einem humanisierten monoklonalen Antikörper, der an *HER2*-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Brustkrebszellen bindet und dadurch deren Wachstum hemmt, ist nur bei der Therapie von *HER2*-positiven Tumoren indiziert (Cho et al. 2003; Jackisch et al. 2015).

Während der Nachsorgebehandlung geben klinischer Befund, bildgebende Verfahren und die Serumkonzentration der Tumormarker Aufschluss über das Ansprechen einer initiierten Therapie. Bei Therapieversagen erfolgt zwar in der Regel die Umstellung auf eine andere Therapie (second-line),

jedoch kann es sein, dass auch diese nicht greift. Für diese Patientinnen ist die post hoc falsche Auswahl der Therapie nicht nur unwirksam, sondern auch mit beträchtlichen Nebenwirkungen behaftet (Fehm et al. 2008). Zusätzlich entstehen Kosten, die das Gesundheitssystem belasten. In der Praxis ist daher die histopathologische Beurteilung von Proben aus dem Metastasen- oder Lymphknotengewebe üblich, jedoch ist die Probenentnahme oft technisch schwierig und mit Risiken verbunden. Die histopathologische Untersuchung von Gewebeproben ist therapiebegleitend somit nur unzureichend geeignet. Aufgrund dieser Problematik besteht Bedarf an prognostischen Variablen, die zum einen Aussagen über das Therapieansprechen zulassen und mit welchen es zum anderen möglich ist, Rezidive und Metastasen frühzeitig zu diagnostizieren und zu behandeln (Martens et al. 2005; Parkinson et al. 2012).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bei Patientinnen mit Brustkrebs

1.2.1 Charakteristik und klinische Bedeutung von CTCs

Zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells = CTCs) sind Krebszellen solider Tumoren, welche im peripheren Blut aufzufinden sind (Engell 1955). Es wird vermutet, dass sich diese Zellen vom Primär- oder Sekundärtumor abspalten und in die Blutbahn streuen. Die Anzahl an CTCs im peripheren Blut ist niedrig. Sie beträgt schätzungsweise nur ein Milliardstel (Yu et al. 2011) aller Blutzellen. Meist wurden CTCs im peripheren Blut von Brustkrebs-Patientinnen in fortgeschrittenem Stadium detektiert, sodass davon ausgegangen wird, dass dies die Phase der hämatogenen Metastasierung widerspiegelt (Yu et al. 2011). Jedoch konnten CTCs auch bei Patientinnen mit Lokaltumoren festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass bei diesen Patientinnen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Metastasen besteht (Müller et al. 2005; Nagrath et al. 2007; Pierga et al. 2008; Riethdorf et al. 2010; Xenidis et al. 2009).

Im Vergleich zu Blutzellen wurden für CTCs bisher phänotypische Charakteristika angenommen wie nicht-leukozytisch, kernhaltig, vom Epithel abstammend und mit bedeutend größerer und vollständiger Membranoberfläche (Parkinson et al. 2012). Inzwischen wird vermutet, dass die Morphologie der CTCs stark abhängt vom Erkrankungstyp, Stadium und Behandlungsstatus. Desweiteren ist inzwischen bekannt, dass einige CTCs im Verlauf der Zeit ihre epithelialen Antigeneigenschaften verlieren und phänotypisch zu mesenchymalen Zellen werden. Dieses Phänomen wird als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Dadurch werden die CTCs unangreifbar gegenüber konventionellen medikamentösen Therapien (Aktas et al. 2009; Bednarz et al. 2010; Joosse et al. 2012; Polyak und Weinberg 2009). Weiterhin steigert sich mit der Expression von EMT Markern die Fähigkeit der CTCs für Migration und Invasion sowie ihre Resistenz gegenüber Anoikis und Apoptose (Lee et al. 2006; Yu et al. 2012).

Eine weitere Eigenschaft der CTCs ist die Fähigkeit der Disseminierung vom Primärtumor zu anderen Organen und deren Wachstum in ihrer neuen Mikroumgebung (Hanahan und Weinberg 2011). Disseminierte Tumorzellen können, selbst nach Totalresektion des Primärtumors, im Körper jahrelang als „dormant cells“ ruhen, ehe sie wieder aktiv werden und Metastasen bilden (Uhr und Pantel 2011). Es wird vermutet, dass Tumorzellen zur Stelle des Primärtumors zurückwandern und noch aggressivere metastatische Varianten bilden können, ein Phänomen, welches auch als „tumor self-seeding“ oder „cross-seeding“ bezeichnet wird (Kim et al. 2009).

In einigen Studien wird von einer Korrelation zwischen der im Blut von Brustkrebspatientinnen gemessenen Konzentration an CTCs und klinikopathologischen Aspekten berichtet. In der auf diesem Gebiet bisher umfangreichsten Studie von Bidard et al. 2014 wurden Daten von 1944 Brustkrebspatientinnen analysiert. Veränderungen in der CTC-Konzentration während der Therapie waren assoziiert mit dem progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen, unabhängig von deren Subgruppe. Auch Hayes et al. zeigten in einer Verlaufsstudie, dass die CTC Konzentration im Blut von Brustkrebspatientinnen mit Metastasen Aussagen über die Prognose der Patientinnen zulässt. Sowohl das mittlere progressionsfreie Überleben als auch die Gesamtüberlebenszeit waren bei Brustkrebspatientinnen mit Metastasen mit ≥ 5 CTCs pro 7,5 ml Blut signifikant kürzer als bei Patientinnen mit < 5 CTCs, und zwar in einem Beobachtungszeitraum von vor Therapie-Einleitung bis zu 9 bis 14 Wochen nach Therapiebeginn (Hayes et al. 2006). Im Gegensatz dazu zeigten sich die Serumtumormarker CEA und CA15-3 in der Verwendung als Prognosevariable limitiert (Bidard et al. 2014).

Es gibt bereits Bestrebungen, CTCs als Biomarker in der Klinik zu etablieren. Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Biomarker-Expression zwischen Tumorgewebe und CTCs sowie unterschiedlichen Metastasenlokalisationen bestehen (Chang et al. 2011; Meng et al. 2004; Wülfing et al. 2006). Ein Grund hierfür könnte sein, dass Metastasen selbst in der Lage sind zu streuen (Alix-Panabières et al. 2012 u.a.). Es wird aber auch vermutet, dass sich die Biomarker-Expression von CTCs im Verlauf einer Therapie verändert (Wang et al. 2010 u.a.). Die molekulare Charakterisierung von CTCs und das Finden aussagekräftiger Biomarker könnte somit einen Durchbruch für die Krebsdiagnostik und die Entwicklung besser geeigneter Medikamente bedeuten (Parkinson et al. 2012).

1.2.2 Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs

Zur Identifikation und Charakterisierung von CTCs werden Methoden mit extrem hoher analytischer Sensitivität und Spezifität benötigt, welche für gewöhnlich aus einer Kombination von Anreicherungs- und Detektionsprozeduren bestehen (Alix-Panabières und Pantel 2013). Zur Anreicherung von CTCs kommen verschiedenste Technologien zum Einsatz, die auf die unterschiedlichen Eigenschaften der CTCs abstellen, durch welche sich CTCs von gewöhnlichen hämatopoetischen Zellen unterscheiden. Hierzu gehören physikalische Eigenschaften, wie z.B. Größe, Dichte, elektrische Ladung und Deformabilität sowie biologische Eigenschaften, wie beispielsweise die Proteinexpression auf der Zelloberfläche, Invasionskapazität und Viabilität (Alix-Panabières und Pantel 2013, 2014). Abbildung 1-4 verschafft einen Überblick über verschiedene Technologien zur Anreicherung von CTCs.

Nutzt man die physikalischen Eigenschaften der CTCs, um sie anzureichern, so ist dies möglich, ohne die Zellen vorher markieren zu müssen. In Tabelle 6-1 im Anhang werden einige Technologien zur Anreicherung von CTCs nach ihren physikalischen Eigenschaften vorgestellt.

Möchte man sich die biologischen Eigenschaften von CTCs zu Nutze machen, so kommen meistens Antikörper zum Einsatz, welche entweder gegen Tumor-assoziierte Antigene, wie EpCAM (epithelial cell adhesion molecule; positive Selektion) oder gegen gewöhnliche Leukozyten-Antigene (negative Selektion) gerichtet sind (Alix-Panabières und Pantel 2014). Beispiele hierzu werden in Tabelle 6-2 im Anhang gegeben.

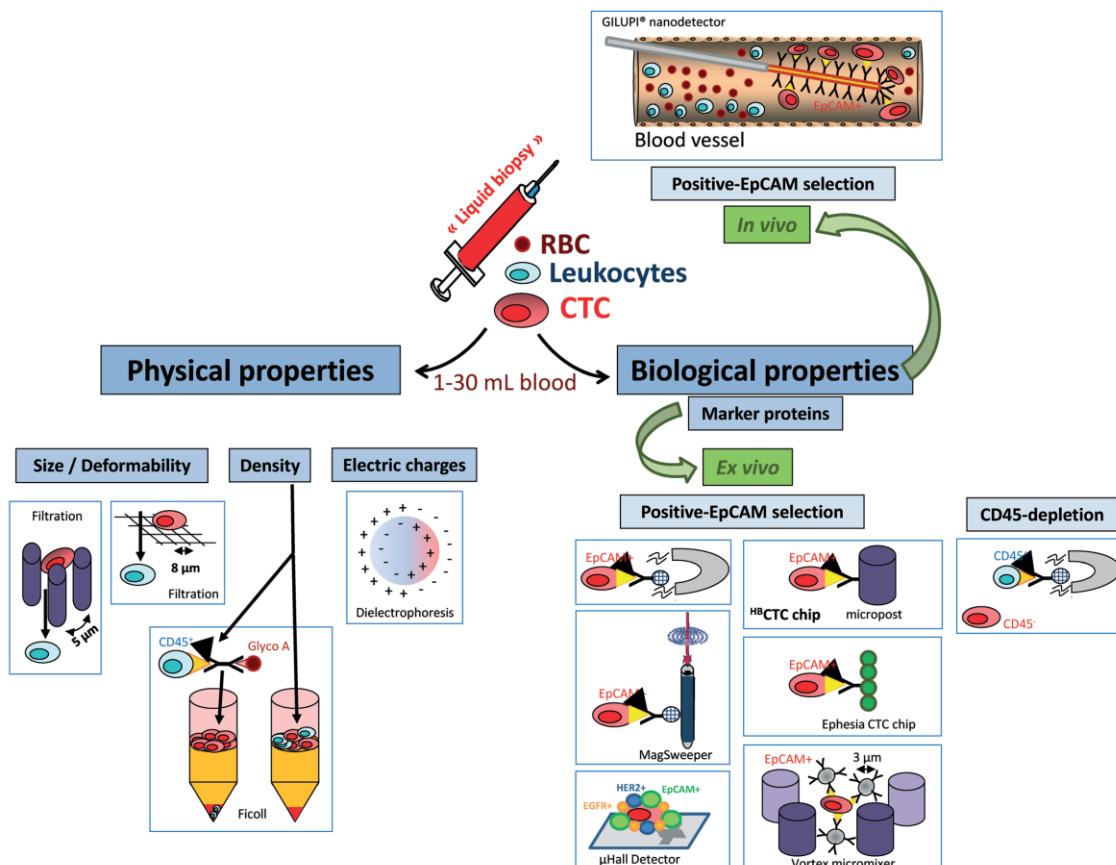


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung unterschiedlicher CTC-Anreicherungsmethoden (angelehnt an Alix-Panabières und Pantel 2014, Abbildung 1, Seite 58).

Auch nach Anreicherung von CTCs kann eine nicht unerhebliche Anzahl von Leukozyten in der CTC-Fraktion vorhanden sein, sodass CTCs auf Einzelzellebene identifiziert werden müssen, um sie von den normalen Blutzellen zu unterscheiden. Am häufigsten werden immunologische Detektionsmethoden mittels Immunfluoreszenzmarkern verwendet wie beispielsweise für Cytokeratine (CKs; positiver Marker für epitheliale Tumorzellen), Leukozytenantigen CD45 (cluster of differentiation 45; Ausschlussmarker) und für die Kernfärbung DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole). CTCs werden im Fluoreszenzmikroskop als CK+/CD45-/DAPI+ definiert (Alix-Panabières und Pantel 2013, 2014).

Der Goldstandard zur Anreicherung von CTCs epithelialen Ursprungs (CD 45-, EpCAM+ und Cytokeratin 8, 18+ und/oder 19+) aus Vollblut ist derzeit das CellSearch CTC Kit von Veridex, Janssen Diagnostics. Hierbei erfolgt die immunomagnetische Anreicherung von CTCs aus 7,5 ml Vollblut unter Verwendung eines Capture-Reagenz auf Ferrofluidbasis mit anschließender Charakterisierung der CTCs mittels Immunfluoreszenzmarkierung (Menarini Silicon Biosystems Inc. 2017). Die CTCs binden an Anti-EpCAM-Antikörper, welche auf Partikeln mit magnetischem Kern befestigt sind (Ferrofluidreagenz). Anschließend erfolgen die Anreicherung der Antigen-Antikörper-Komplexe in einem magnetischen Feld und die Zugabe von Fluoreszenzreagenzien. Charakterisiert werden die Zellen mittels Anti-CK-Phykoerythrin (für Epithelzellen charakteristisches Cytokeratin), DAPI und Anti-CD45-Allophycocyanin. Riethdorf et al. konnten mit dieser Methode 1491 CTCs aus 7,5 ml Blut anreichern (Riethdorf et al. 2007).

Die am häufigsten verwendete Alternative zur immunologischen Detektionsmethode ist die molekulare Detektion von mRNA (Alix-Panabières und Pantel 2013). PCR-basierte Ansätze sind extrem sensitiv und es ist möglich, eine einzelne Zelle unter 2×10^7 weißen Blutkörperchen zu detektieren (Brakenhoff et al. 1999). QIAGEN GmbH (ehemals AdnaGen, Langenhagen, Deutschland) ermöglicht mittels des AdnaTest die immunomagnetische Anreicherung von CTCs aus einer Blutprobe mit anschließender Charakterisierung von *MUC1* (Muc-1 gene), *HER2* und *GA733-2* (Gastrointestinal tumor associated antigen 733-2) durch die multiplex RT-PCR (QIAGEN GmbH 2017). Wang et al. charakterisierten CTCs von Brustkrebspatientinnen unter Verwendung des CircleGen CTC RT-qDx assay (Syantra, Calgary, Canada). Mit diesem Kit ist es mittels real-time PCR möglich, multiple Marker wie EpCAM, CK19, *HER2*, *Ki-67*, hTERT und Vimentin zu untersuchen (Wang et al. 2014).

Das geringe Volumen der Patienten-Blutproben (CellSearch CTC Kit: 7,5 ml), aus welchem die Detektion der CTCs erfolgt, ist ein limitierender Faktor in der Charakterisierung von CTCs. Bei Brustkrebspatientinnen mit nur vereinzelt CTCs im Blut werden die CTCs dabei möglicherweise nicht angereichert, wodurch ihre Detektion und Charakterisierung unmöglich gemacht wird (Alix-Panabières und Pantel 2013; Saucedo-Zeni et al. 2012). Eine vielversprechende Möglichkeit, die Sensitivität im Vergleich zu den bisher bestehenden ex vivo Verfahren zu erhöhen, bietet die Firma Gilupi mit einer in vivo Methode. Hierbei wird ein sog. funktionalisierter Draht (functionalized structured medical wire, FSMW) mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 160 mm, in die venöse Blutbahn eingebracht. Die ersten 20 mm des Drahtes sind beschichtet, beginnend mit einer 2 μ m dicken Goldschicht, mit darauf befestigtem Hydrogel (1-5 μ m), welches lineare synthetische Polycarboxylketten beinhaltet. Nach Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimid hydrochlorid) und NHS (N-hydroxysuccinimid) können gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül CD326 (EpCAM) gerichtete chimerische Antikörper kovalent gebunden werden. So können während einer 30-minütigen Anwendung EpCAM-exprimierende CTCs aus einem Blutvolumen von 1,5 Litern über Interaktion mit dem Draht gefangen und mittels immunzytochemischer Färbung (DAPI-positiv, EpCAM-positiv, CD45-negativ) identifiziert werden (Saucedo-Zeni et al. 2012). Die zusätzliche molekularbiologische Charakterisierung von am Draht haftenden CTCs mittels quantitativer PCR bietet einen vielversprechenden Ansatz, neue prognostische und prädiktive Markersets zu etablieren.

1.3 Marker für die molekulargenetische Charakterisierung von CTCs

1.3.1 Östrogenrezeptor (ER)

Östrogene sind Steroidhormone, die als Liganden an spezifische Östrogen-Rezeptoren binden und dadurch ihre biologischen Wirkungen entfalten. Hierzu zählt insbesondere der Einfluss auf das Wachstum der weiblichen Brustdrüsen (Arendt und Kuperwasser 2015).

Die Östrogenrezeptoren ER α und ER β sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren und liegen, an Chaperone gebunden, im Zytoplasma vor. Nach Diffusion von Östrogen durch die Zellmembran und Bindung an die Östrogenrezeptoren, kommt es zur Konformationsänderung der Rezeptoren in der Tertiärstruktur und zur Lösung der Chaperonbindung. Es erfolgt eine Dimerisierung zweier Rezeptoren und eine Translokation des dimeren Komplexes in den Zellkern (Bedard et al. 2008). Dort binden die Dimere an sogenannte Estrogen-Response-Elements (EREs) in der DNA-Promotorregion verschiedener Gene und erhöhen dadurch deren Transkriptionsrate (Klinge 2001).

Untersuchungen haben ergeben, dass vor allem ER α eine große Rolle in der Mammakarzinogenese zu spielen scheint. Eine Verschiebung des ER α /ER β -Verhältnisses zugunsten von ER α bewirkt in Brustkrebszellen eine steigende Reaktion auf proliferative Stimuli durch Östrogen (Sotoca et al. 2008).

Das Antihormontherapeutikum Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptor Modulator (SERM), der mit Östrogen um die Bindungsstellen am *ER* konkurriert. Durch diesen kompetitiven Antagonismus können antiöstrogene Wirkungen im Brustgewebe erzeugt und die Proliferation östrogenabhängiger Tumorzellen eingedämmt werden (Shelly et al. 2008).

1.3.2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*HER2*)

HER2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR: epidermal growth factor receptor), welche sich aus vier Rezeptoren zusammensetzt: *HER1* = erbB1; *HER2* = erbB2; *HER3* = erbB3; *HER4* = erbB4 (Yarden und Slivkowski 2001). *HER2* ist ein Protoonkogen und kodiert einen transmembranen Glykoproteinrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Die intrazelluläre Domäne des Rezeptors vermag Tyrosinreste intrazellulärer Effektormoleküle zu phosphorylieren und dadurch Wachstums-, Teilungs- und Differenzierungsprozesse der Zelle zu steuern (Akiyama et al. 1986; Hudis 2007). So stimuliert *HER2* beispielsweise die Zellproliferation über den RAS-MAP-Kinase-Weg und hemmt den programmierten Zelltod (Yarden und Slivkowski 2001).

HER2 ist in 20-30% aller Mammakarzinome überexprimiert und geht mit einem aggressiveren Phänotyp und einer schlechteren Prognose einher (Slamon et al. 1987). In gesunden Zellen sind zwei Genkopien des *HER2*-Gens vorhanden, welche ca. zehntausend transmembrane Rezeptoren kodieren. Tumorzellen besitzen jedoch eine erhöhte Anzahl von Genkopien, was zu einer Überexpression der Rezeptoren führt (Nagy et al. 1999; Saxena und Dwivedi 2012). Auswirkungen sind u.a. die verstärkte und verlängerte intrazelluläre Signaltransduktion oder auch die Aktivierung und Unterdrückung zahlreicher Signaltransduktionswege. Dadurch kann die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren beeinflusst werden, indem u.a. die Brustgewebezellen durch Hemmung der Apoptose proliferieren.

Patientinnen, deren Tumorgewebe eine erhöhte *HER2*-Expression aufweisen, können von einer Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab profitieren (Mokbel und Hassanally 2001). In experimentellen Analysen zeigte sich, dass die Wirkung von Trastuzumab auf zwei Mechanismen zurückzuführen ist. Zum einen handelt es sich um eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität und zum anderen werden *HER2*-getriggerte Proliferationssignale blockiert (Saxena und Dwivedi 2012).

1.3.3 Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptortyp C (*PTPRC*)

PTPRC, auch CD45-Antigen genannt, ist ein transmembranes Glykoprotein, das bis zu 10% der Zelloberfläche aller kernhaltigen hämatopoetischen Zellen und ihren Vorläuferzellen bedeckt (Thomas 1989). Die intrazelluläre Domäne beinhaltet zwei Phosphataseregionen, die aktive D1-Domäne und die inaktive D2-Domäne. Während die D1-Domäne durch ihre Phosphataseaktivität andere Moleküle manipuliert, werden für die D2-Domäne modulierende und regulierende Einflüsse auf Zellprozesse diskutiert (Bilwes et al. 1996; Felberg und Johnson 1998). Die Funktionen von *PTPRC* beinhalten u.a. die B- und T-Zellaktivierung, die Stimulation von B-Zellen zur Antikörper-Produktion bis hin zur Beeinflussung der Zellproliferation (HUGO Gene Nomenclature Committee 2017).

1.4 Zielsetzung

Die Konzentration zirkulierender Tumorzellen (CTCs) im Blut von Patientinnen mit Brustkrebs korreliert mit einem progredienten Krankheitsverlauf (Bidard et al. 2008; Bidard et al. 2014; Budd et al. 2006; Cristofanilli et al. 2004; Giordano et al. 2012; Giuliano et al. 2011; Hayes et al. 2006; Liu et al. 2009; Müller et al. 2012; Nakamura et al. 2010; Nolé et al. 2008; Pierga et al. 2012; Reinholz et al. 2011; Tewes et al. 2009; Wallwiener et al. 2013). Somit eignet sich nicht nur die Anreicherung und Auszählung von CTCs als prognostischer Marker bezüglich progressionsfreier Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit. Vielmehr könnte auch die Detektion und molekulargenetische Charakterisierung von CTCs bei der Behandlung des Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle spielen, um möglichst frühzeitig einzugreifen, wenn die Standardtherapie versagt.

Die Firma Gilupi entwickelte eine Methode zur *in vivo* Isolation von CTCs aus dem Blut von Patientinnen mit Brustkrebs, nämlich einen sog. strukturierten Antikörper-beschichteten Draht (functionalized structured medical wire, FSMW). Voraussetzung für die Bestimmung der Genexpression von am Draht haftenden CTCs mittels quantitativer real-time PCR ist dabei ein an die klinische Situation angepasstes, gut etabliertes System. Die Anzahl der zu untersuchenden, am Draht anhaftenden CTCs ist zumeist gering. In der von Saucedo-Zeni et al. durchgeführten Studie wurden zwischen 0 und 50 CTCs am Draht bei Patientinnen mit Brustkrebs angereichert (Saucedo-Zeni et al. 2012). Daher ist es von großer Bedeutung auf ein etabliertes System zugreifen zu können, welches insbesondere im niedrigen Zellkonzentrationsbereich erfolgreich angewendet werden kann.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war daher die eigenständige Etablierung von Marker-Nachweismethoden mittels real-time PCR, sodass zukünftig anhand der erarbeiteten Protokolle die molekulargenetische Charakterisierung von am Draht haftenden CTCs von Brustkrebspatientinnen sowie deren einwandfreie Identifizierung gegenüber Kontaminationen anderer Blutzellen erfolgen kann. Hierzu wurde jeweils die Genexpression des Östrogenrezeptor (*ER*) in MCF-7 Zellen sowie die Genexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktors 2 (*HER2*) in SK-BR-3 Zellen bestimmt. Desweiteren erfolgte die Untersuchung der Genexpression der Tyrosin-Phosphatase, Rezeptortyp C (*PTPRC*) in U937 Zellen als Marker für eine mögliche Kontamination des Drahtes mit Blutzellen.

Wir überprüften die Thesen, ob

1a) die Bestimmung der prognose- und therapielevanten Genexpression von *ER*, *HER2* sowie *PTPRC* (zur Kontaminationskontrolle) in Verdünnungsreihen bis in niedrige Konzentrationsbereiche von wenigen pg cDNA pro well mit ausreichender Sensitivität, Spezifität, Robustheit und Reproduzierbarkeit möglich ist;

1b) eine relative mRNA-Quantifizierung auch im niedrigen Zellzahlbereich (< 50 CTCs) möglich ist;

2) sich die Nachweisgrenze durch Präamplifikation der cDNA weiter senken läßt;

3) die Genexpressionsbestimmung von der Art der Zellfixation abhängen mag und

4) die Anwesenheit von Drahtstücken oder der Zusatz von cDNA von hämatopoetischen Zellen bei der Aufarbeitung und Analyse der Proben keine Störungen evozieren.

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Real-time PCR

Zur Etablierung sensitiver Marker-Nachweismethoden auf mRNA-Ebene wurde die Methode der real-time Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt. Die PCR ermöglicht es, selektive DNA-Abschnitte in vitro zu vervielfältigen (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1985). Hierzu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, die Matrizen-cDNA, Desoxyribonukleosidtriphosphate, Oligonukleotidprimer und geeignete Pufferbedingungen benötigt. Die real-time PCR erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung der Genamplifikation in Echtzeit (real-time). Dies geschieht durch Verwendung fluoreszenzmarkierter, sequenzspezifischer Sonden, die während der Amplifikation detektierbare Fluoreszenzsignale abgeben (siehe Abbildung 2-1).

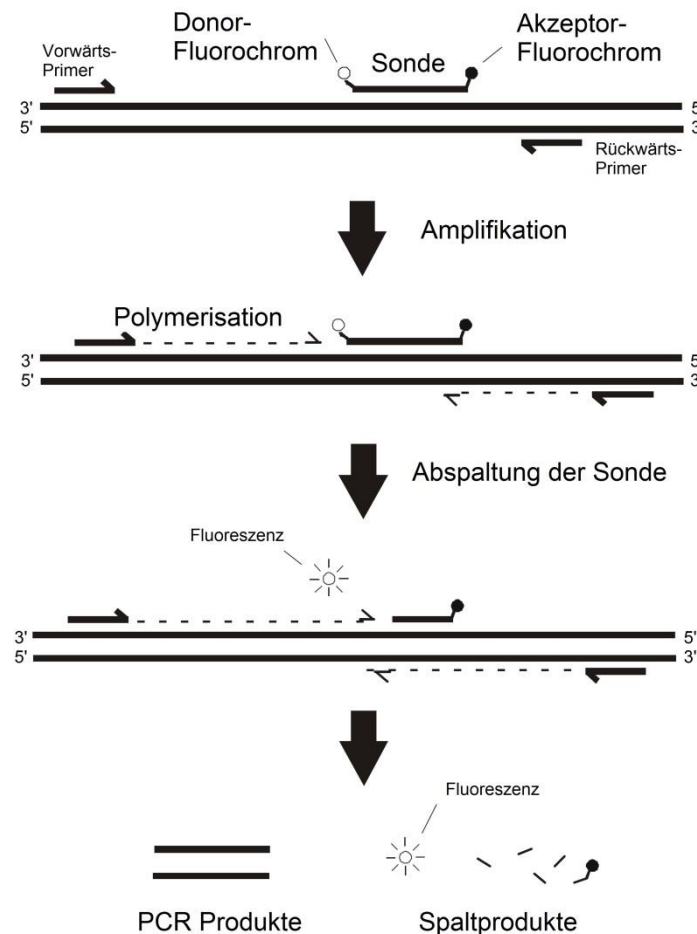


Abbildung 2-1: Darstellung des Funktionsprinzips der real-time PCR. Angelehnt an Abbildung 2 (Seite 4) aus dem Benutzerhandbuch des Brilliant II qPCR Master Mix, Agilent Technologies.

Die verwendeten Sonden sind am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM™ (Donor-Fluorochrom) und am 3'-Ende mit einem Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) markiert. Solange die Sonde intakt ist wird im Rahmen des Förster-Energietransfers (FRET) die Energie des angeregten Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs auf den Quencher übertragen (Förster 1948; Lakowicz und Maliwal 1983). Sobald jedoch die Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus*

aquaticus), welche zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Funktion besitzt, die Sonde während der Synthese am 5'-Ende abspaltet, entfernen sich Reporter und Quencher voneinander, wodurch das Fluoreszenzsignal des Reporters ansteigt (siehe Abbildung 2-1). Die Fluoreszenzintensität wird am Ende der Elongation eines jeden PCR-Zyklus gemessen. Sie nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Das ermöglicht, die Menge der amplifizierten DNA während des PCR-Laufs zu bestimmen und Rückschlüsse auf die Genexpression in der untersuchten Probe zu ziehen (Brilliant II qPCR Master Mix, Instruction Manual, Agilent Technologies). Wir verwendeten für die quantitative real-time PCR das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, genannt TaqMan (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und die SDS Sequence Detection Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

2.1.2 Auswertung der molekulargenetischen Untersuchungen

2.1.2.1 PCR-Kinetik und Cycle Threshold-Wert

Während der PCR werden vier kinetische Phasen durchlaufen, die in einer sigmoidalen Kurve (Abbildung 2-2) dargestellt werden können. In der lag-Phase (Verzögerungsphase) findet bereits eine exponentielle Amplifikation statt, welche jedoch aufgrund der höheren Hintergrundfluoreszenzintensität nicht detektierbar ist. In der exponentiellen Phase überschreitet das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenzintensität, sodass das sich im Idealfall verdoppelnde PCR-Produkt messbar wird. Der in Zyklen ausgedrückte Zeitpunkt, bei welchem die Amplifikationskurve den Treshold (Hintergrundfluoreszenz) überschreitet, wird als Cycle Threshold-Wert (CT-Wert) bezeichnet. In der linearen Phase wird die Reaktion durch das Fehlen von Enzymen und Substraten verlangsamt, was im Diagramm an einem Abflachen der Kurve zu erkennen ist. In der Plateauphase finden keine Reaktionen mehr statt.

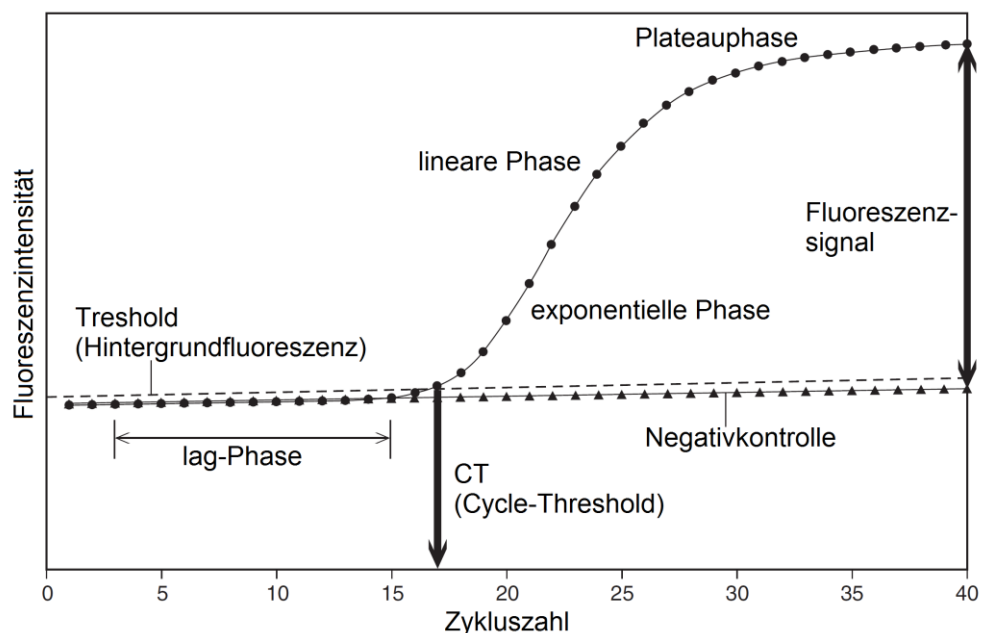


Abbildung 2-2: Beispielhafte Darstellung der Amplifikationskurve während der real-time PCR. Aufgetragen ist die Intensität des Fluoreszenzsignals der zu untersuchenden Probe gegen die Zykluszahl. Angelehnt an die Abbildung aus dem Benutzerhandbuch des ABI PRISM 7000 Sequence Detections System, Applied Biosystems.

2.1.2.2 Effizienz und Regressionskoeffizient

Die Auswertung der PCR Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2010. Jede cDNA-Probe wurde in einem dreimaligen Ansatz (Triplikate) untersucht. Aus den CT-Werten der Triplikate jeder untersuchten Probe wurden der Mittelwert (siehe Gleichung 1) und die Standardabweichung berechnet.

Gleichung 1

$$CT_{MW} = \frac{(CT_1 + CT_2 + CT_3)}{3}$$

Bei der Erstellung der Standardverdünnungsreihe wurden die mittleren CT-Werte in ein Punktediagramm übertragen (x-Achse: log cDNA; Y-Achse: CT_{MW}) und deren Regressionsgerade bestimmt. Mithilfe der Steigung der Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihe konnte die real-time PCR-Effizienz (E; siehe Gleichung 2) errechnet werden (Higuchi et al. 1993; Meuer S., Wittwer C., Nakagawara KI. 2001; Rasmussen 2001).

Gleichung 2

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Zusätzlich wurde der Regressionskoeffizient r^2 bestimmt. Durch diesen wird das Maß der Abweichung der einzelnen Fluoreszenzrohdaten von der Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihe ermittelt. Ein Wert $> 0,999$ wird als sehr gute Linearität definiert (Tichopad et al. 2002).

2.1.2.3 Genexpressionsbestimmung durch Normalisierung mit „Housekeeping“-Genen

Housekeeping-Gene (HKG) findet man in allen kernhaltigen Zellen und sie sind essentiell für den Erhalt von Zellfunktionen (Pfaffl 2001). Sie sind idealerweise unter den experimentell veränderten Bedingungen nicht oder nur schwach reguliert sowie ubiquitär und homogen exprimiert (Pfaffl 2004). Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des zu untersuchenden Zielgens (GOI = gene of interest) mit der Expression eines solchen Housekeeping-Gens normalisiert. Das bedeutet, dass die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen (HKG) bezogen wird. Dabei wird der mittlere CT-Wert des Housekeeping-Gens vom mittleren CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (siehe Gleichung 3) und das Verhältnis (ratio) gebildet (siehe Gleichung 4).

Gleichung 3

$$\Delta CT = CT(GOI) - CT(HKG)$$

Gleichung 4

$$Ratio = 2^{-\Delta CT}$$

Die Berechnung des Gesamtfehlers erfolgte nach dem Gauß'schen Gesetz der Fehlerfortsetzung. Da es sich bei CT-Werten immer um eine logarithmische Größe handelt, erfolgte eine Umskalierung der fortgesetzten CT-Wert-Fehlerraten mit einem Normierungsfaktor (ln2), der mit der fehlerfortgesetzten Standardabweichung und der Ratio multipliziert wurde (Gleichung 5).

Gleichung 5

$$\text{Fehlerfortsetzung} = \ln 2 \sqrt{\frac{[STABW(GOI)^2 + STABW(HKG)^2]}{2}} \times Ratio$$

2.1.2.4 Sensitivität, Spezifität, Robustheit und Reproduzierbarkeit der real-time PCR

Die Sensitivität der real-time PCR wird durch die Messung von richtig positiven Fluoreszenzsignalen charakterisiert. Sie ist umso höher, je niedriger der ermittelte CT-Wert ist. In allen Versuchen wurden stets Positivkontrollen mitgeführt, um falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können. Als Positivkontrollen dienten cDNA-Proben mit 1 und 10 ng/well, welche jeweils in Duplikaten auf die 96-Loch-Platte pipettiert wurden. Dadurch wurde sichergestellt, dass die PCR-Läufe zuverlässig funktionierten.

Die Spezifität der real-time PCR wurde zum einen durch Negativkontrollen und zum anderen durch die Auswahl der Primer und Sonden überprüft. Als Negativkontrollen dienten No Template Controls (NTC), die in Duplikaten in den PCR-Läufen mitgeführt wurden und welche neben den üblichen Reagenzien RNase freies Wasser, anstelle von cDNA beinhalten. Ebenso wurde in Duplikaten die nicht transkribierte RNA anstelle von cDNA zu den üblichen Reagenzien gegeben. Hierdurch konnte die RNA auf Verunreinigungen mit DNA überprüft werden.

Niedrige Intra- und Inter-Assay Varianzen zwischen den Proben weisen auf eine gute Robustheit der einzelnen Assays hin. Durch die Berechnung der Intra-Assay Varianz werden Unterschiede in der Genexpression der jeweiligen Triplikate von Housekeeping-Gen und untersuchtem Gen berücksichtigt. Zur Bestimmung der Intra-Assay Varianz wurde die fortgesetzte relative Fehlerrate der Triplikate errechnet (siehe Gleichung 6). Bei der Inter-Assay Varianz werden Expressionsunterschiede zwischen zwei voneinander unabhängigen real-time PCR-Läufen mit vergleichbarem Versuchsaufbau verglichen. Die Inter-Assay Varianz setzt sich aus der Berechnung der jeweiligen Ratio-Mittelwerte im Nenner und der Berechnung der entsprechenden Standardabweichungen im Zähler zusammen (siehe Gleichung 7).

Gleichung 6

$$\text{Intra - Assay - Varianz} = \frac{\ln 2 \sqrt{\left\{ \frac{[STABW(GOI)^2 + STABW(HKG)^2]}{2} \times 2^{-\Delta CT} \right\}}}{2^{-\Delta CT}}$$

Gleichung 7

$$\text{Inter - Assay - Varianz} = \frac{STABW[\text{Ratio (Lauf } x); \text{Ratio (Lauf } y)]}{MW[\text{Ratio (Lauf } x); \text{Ratio (Lauf } y)]}$$

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche (dieselbe cDNA Probe und / oder dieselbe RNA Probe bzw. entsprechend gleiche Ausgangszellzahl) mit wenigen Ausnahmen zumindest zweimal wiederholt. Eine Intra-Assay Varianz von 20% und eine Inter-Assay Varianz von 30% wurden in dieser Arbeit als Schwellenwerte für eine ausreichende Qualität des gemessenen Markers angestrebt.

2.1.3 Probenmaterial

Verwendete Marker und Zelllinien

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden die Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 sowie die histiozytische Leukämie-Zelllinie U937 verwendet (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland). Die zu untersuchende Expression für brustkrebspezifische Gene erfolgte durch die Marker *ER* (estrogen receptor) in MCF-7 Zellen und durch *HER2* (human epidermal growth factor

receptor 2) in SK-BR-3 Zellen. Die Genexpressionsbestimmung von *PTPRC* (Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C), d.h. CD45-Antigen in U937 Zellen diente als Marker für eine eventuelle Kontamination mit weißen Blutzellen. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 2-1 dargestellt. Die in dieser Arbeit zur Normalisierung eingesetzten Housekeeping-Gene waren *HMBS* (Hydroxymethylbilane synthase) und *GUSB* (Glucuronidase, beta).

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden von Applied Biosystems / Life Technologies.

Gene	cat.no (ABI)	Interrogated Sequence	Translated Protein	Exon Boundary	Assay Location	Amplicon Length
<i>HMBS</i>	Hs00609297_m1	NM_000190.3	NP_000181.2	1 - 2	186	64
<i>GUSB</i>	Hs99999908_m1	NM_000181.3	NP_000172.2	11 - 12	1925	81
<i>ER</i>	Hs00174860_m1	NM_000125.3	NP_000116.2	3 - 4	995	62
<i>HER2</i>	Hs00170433_m1	NM_001005862.1	NP_001005862.1	18 - 19	2329	120
<i>PTPRC</i>	Hs00236304_m1	NM_002838.3	NP_002829.2	26 - 27	3018	81

Zellkultur

Bebrütet wurde die adhärenzte Zelllinie MCF-7 mit einem Nährmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), hoher Glukose-Konzentration (high glucose) und GlutaMAX (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Für die adährente Zelllinie SK-BR-3 wurde das McCoy's 5A Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erwies sich als optimale Nährlösung für die nicht adhärenzte Zelllinie U937. Um die Zelllinien zu kultivieren, wurde zu Beginn ein Auftau-Medium hergestellt, welches zu 70% das für jede Zelllinie beschriebene Nährmedium und zu 30% foetales Kälberserum (FCS; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) enthielt. Nachdem die Zellen im Auftau-Medium resuspendiert wurden, erfolgten zwei Waschschrirte bei 1200 rpm für 3 Minuten. Schließlich wurde das Zellpellet mit reinem Nährmedium versetzt und für die Kultivierung der Zelllinien bereitgestellt.

Kultiviert wurden die Zelllinien in oben genannten Nährmedien, welche zu 10% mit FCS durchsetzt wurden. Zum Einsatz kamen dabei Kulturflaschen mit Filterdeckel mit einer Fläche von 25cm², 75cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) oder 150cm² (Cellstar; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Der Filterdeckel diente der Zufuhr von fünfprozentigem CO₂, welches die Zellen für ihr Wachstum benötigten. Die Kulturflaschen mit adhärenzten Zelllinien wurden bei 37 °C im Brutschrank (HeraCell; Heraeus, Hanau, Deutschland) waagrecht und die Flaschen mit der nicht-adhärenzten Zelllinie U937 senkrecht gelagert. Zweimal pro Woche wurden die Zelllinien gesplittet und Zellen für die Versuche entnommen. Hierzu wurde bei den adhärenzten Zelllinien das Medium abgesaugt und die Kulturflasche mit Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gespült. Anschließend wurde DPBS mit einem Anteil von 0,05% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Biochrom, Berlin, Deutschland) hinzugegeben und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert, um den Zellen das Ablösen von der Oberfläche der Kulturflasche zu ermöglichen. Bei der Verarbeitung der nicht-adhärenzten Zelllinie U937 entfiel der Arbeitsschritt der Adhäsionolyse. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) übertragen und zweimal mit DPBS bei 1200 rpm für 3 Minuten gewaschen. Schließlich wurden die Zellen wieder in Kulturflaschen übergeführt oder im Nährmedium zur weiteren Verarbeitung gezählt.

Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Zur Zellzählung kam die Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) zum Einsatz. Es wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zur Anfärbung abgestorbener Zellen vermengt und in die Zählkammer gegeben. Nachdem ein Deckglas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf die Zählkammer platziert wurde, konnte sie unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland) bei zehnfacher Vergrößerung eingestellt werden. Aus 3 mal 3 Großquadraten wurden die Zellen in 4 Quadraten gezählt und der Mittelwert errechnet. Das Ergebnis wurde mit 10^4 multipliziert, woraus die Zellzahl pro ml resultierte. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus dem Volumen der Suspension. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde daraufhin der Zellsuspension entnommen und entweder als Vorbereitung zur RNA-Isolation mit dem Lysepuffer des verwendeten RNA-Extraktionskits vermengt oder fixiert (siehe Kapitel 2.1.6, Seite 25).

Zell-Picking bei Zellzahlen ≤ 10

Zur Gewinnung von einzelnen Zellen wurde ein Teil der Zellsuspension mit dem entsprechenden Nährmedium stark verdünnt. Davon wurden 5 µl auf eine Petrischale pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen gezählt und mit Hilfe einer 2,5 µl-Pipettenspitze (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) unter Sicht die benötigte Anzahl an Zellen gepickt und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit flachem Grund (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Die erfolgreiche Übertragung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Im Falle einer geplanten Fixierung der Zellen wurde DPBS hinzugegeben. Ansonsten konnte nach Zugabe von Lysepuffer die RNA-Extraktion aus den gepickten unfixierten Zellen erfolgen.

2.1.4 Überblick über die unterschiedlichen Workflows

Es erfolgte die Etablierung sensitiver Markersysteme zur Analyse der Genexpression von *ER*, *HER2* und *PTPRC* mit Überprüfung der Sensitivität, Spezifität, Robustheit und Reproduzierbarkeit der real-time PCR. Mit folgenden Experimentblöcken erfolgte die schrittweise Adaptation der Assays an die klinische Situation:

1. Versuche mit unfixierten Zellen
 - a. Erstellung von seriellen Verdünnungsreihen (1:2-Schritte) mit cDNA-Endkonzentrationen bis zu 1,7 pg/µl und Berechnung der PCR-Effizienz.
 - b. Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Verdünnungsreihen in Versuchen in niedrigen Zellzahlbereichen (2000 Zellen bis hin zu 1 Zelle).
2. Präamplifikation der cDNA aus den Verdünnungsreihen und einigen Proben aus den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich und Vergleich der PCR-Ergebnisse mit den unamplifizierten cDNA Proben, u.a. durch Berechnung der Präamplifikationsuniformität.
3. Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und Aceton und Überprüfung der entsprechenden Auswirkungen auf die PCR-Ergebnisse.
4. Konzipierung von „Kontaminationsversuchen“ durch Spiken von Brustkrebs-cDNA (MCF-7 und SK-BR-3) mit cDNA aus U937 und anschließender Genexpressionsbestimmung sowie Zugabe von Drahtstücken zu SK-BR-3 Zellen und Überprüfung der Auswirkungen auf die relative Genexpression.

Abhängig von zu bearbeitender Zellzahl und Fixierungsmethode wurden in den Experimenten unterschiedliche RNA-Extraktions-Kits zur Bearbeitung der Zellen verwendet. Zur Übersicht sind die verschiedenen Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Proben auf die Untersuchung in der real-time PCR in Abbildung 2-3 dargestellt.

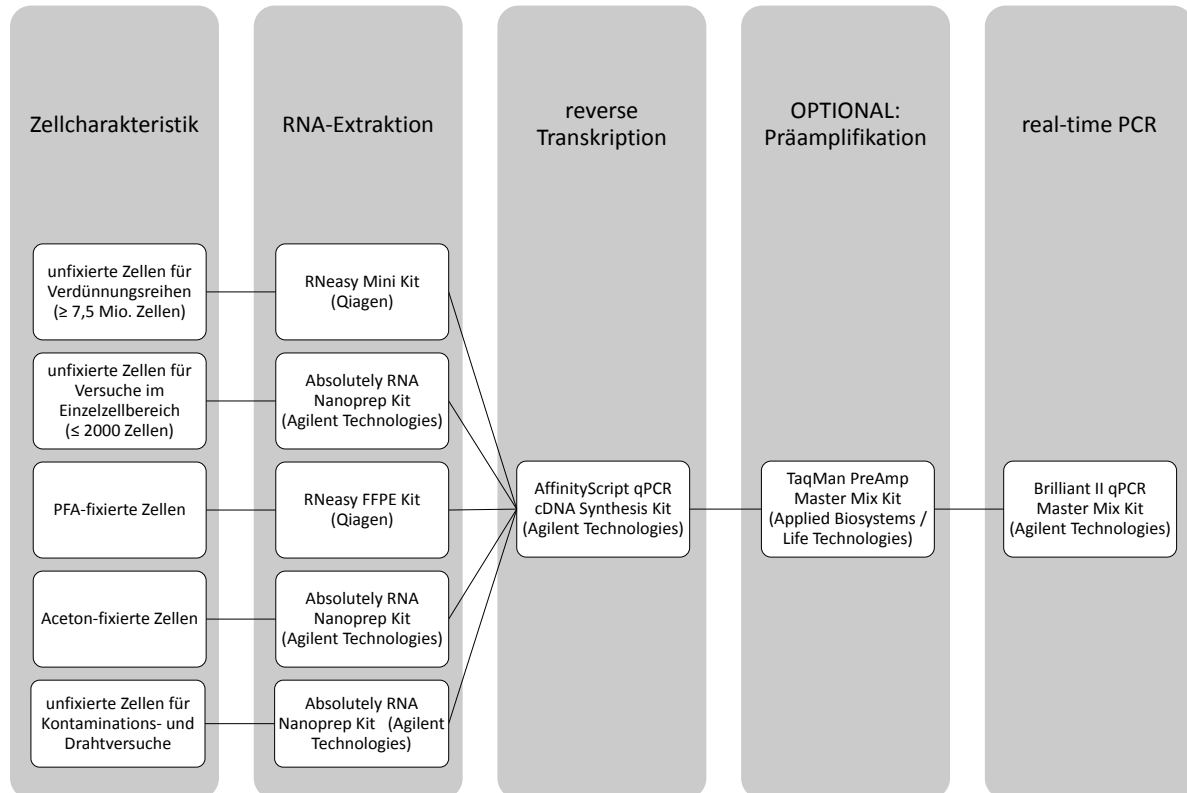


Abbildung 2-3: Übersicht über die unterschiedlichen Workflows und die in dieser Arbeit verwendeten Kits.

2.1.5 Workflow zu Experimenten mit unfixierten Zellen

Standardverdünnungsreihen

Zur generellen Bestimmung der Effizienz und Reproduzierbarkeit der einzelnen Assay on Demand Markersysteme wurden Verdünnungsreihen erstellt. Hierzu wurde die RNA der Zelllinien MCF-7, SK-BR-3 und U937 unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (siehe Kapitel 2.1.9.1) extrahiert und deren Konzentration am Nano Drop 2000c Spektrophotometer (siehe Kapitel 2.1.9.4) gemessen. Von jeder Zelllinie wurden zwei Proben à 500 ng RNA über den Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (siehe Kapitel 2.1.9.4) in cDNA umgeschrieben (Einsatzmenge 6 μ l RNA). Anschließend wurden serielle Verdünnungsreihen in 1:2 Verdünnungsschritten erstellt. Die Ausgangskonzentration lag bei 3571,5 μ g/ μ l und reduzierte sich in 12 Verdünnungsschritten auf eine Endkonzentration von 1,74 μ g/ μ l. Hierbei stammte die zu untersuchende cDNA der beiden Läufe aus unterschiedlichen RT-Ansätzen. Die Analyse der Marker mittels real-time PCR erfolgte unter Verwendung des Brilliant II QPCR Master Mix Kits (siehe Kapitel 2.1.9.7) auf dem ABI 7000 TaqMan System mit 2 μ l cDNA-Einsatzmenge in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l in Triplikaten pro Probe in 2 separaten Läufen.

Desweiteren wurden jeweils 6,25 μ l der Proben der cDNA 1.1a mittels des TaqMan PreAmp Master Mix Kits (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) präamplifiziert (siehe Kapitel 2.1.9.6), ehe anschließend die real-time PCR in zwei separaten Läufen durchgeführt wurde (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2).

2. Methoden und Material

Die einzelnen Arbeitsschritte zur Erstellung der Standardverdünnungsreihen und der präamplifizierten Verdünnungsreihen sind in Abbildung 2-4 dargestellt.

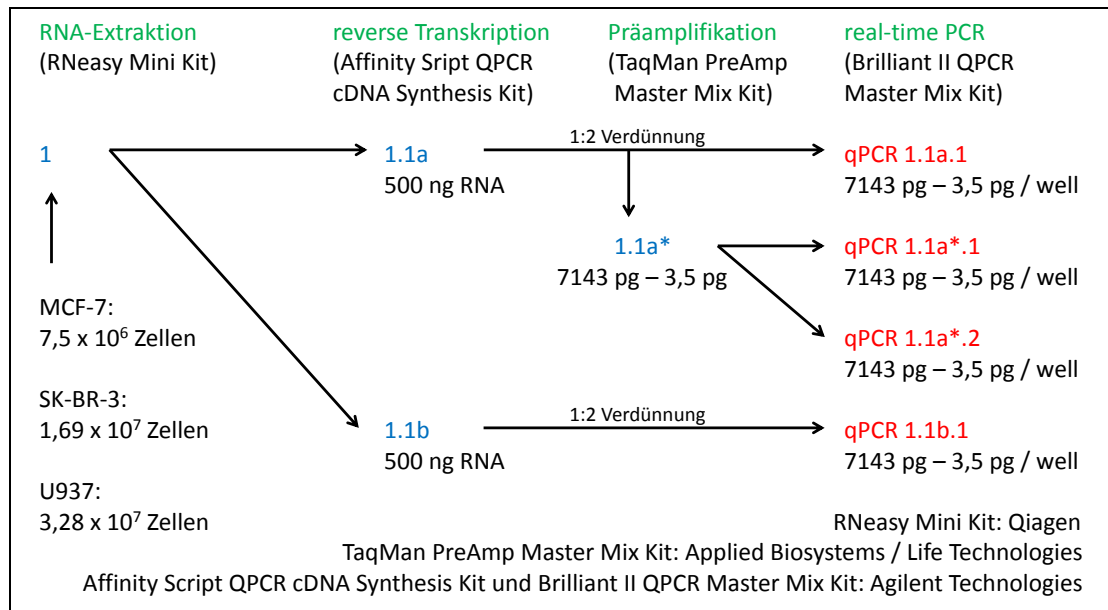


Abbildung 2-4: Arbeitsschritte zur Erstellung der Standardverdünnungsreihen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1) und der präamplifizierten Verdünnungsreihen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2) der Zelllinien MCF-7, SK-BR-3 und U937.

Versuche im niedrigen Zellzahlbereich

Für die Bestimmung der Genexpression im niedrigen Zellzahlbereich wurden pro Zelllinie mehrere Versuchsansätze erstellt, deren Aufbau im Anhang detailliert abgebildet ist. Zellen für Proben mit einer Ausgangszellzahl von 2000 bis ≥ 10 wurden in der Neubauer Zählkammer gezählt, die entsprechende Menge aus der Zellsuspension abpipettiert und weiterverarbeitet. Die Zellen von Proben mit einer Zellzahl von ≤ 10 Zellen wurden einzeln unter dem Mikroskop gepickt. Für die RNA-Extraktion im niedrigen Zellzahlbereich kam der Absolutely RNA Nanoprep Kit (siehe Kapitel 2.1.9.2) zum Einsatz. Die reverse Transkription erfolgte mit dem Affinity Sript QPCR cDNA Synthesis Kit (siehe Kapitel 2.1.9.4). Im Falle einer Präamplifikation der cDNA-Proben erfolgte diese mit dem TaqMan PreAmp Master Mix Kit (siehe Kapitel 2.1.9.6). Die Analyse in der real-time PCR erfolgte unter Verwendung des Brilliant II QPCR Master Mix Kits (siehe Kapitel 2.1.9.7).

Die exakte RNA-Konzentration von ≤ 2000 Zellen wurde nicht bestimmt. Laut Herstellerangaben (Absolutely RNA Nanoprep Kit, User Manual, Agilent Technologies) liegt die Gesamtausbeute von 10³ Zellen bei etwa 10 ng, was umgerechnet einer Gesamtausbeute von ca. 10 pg RNA aus einer Zelle entspricht. Wird die RNA aus einer bestimmten Anzahl an Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch real-time PCR analysiert, so muss berücksichtigt werden, dass die Genexpression aus einem geringeren RNA-Anteil als dem aus der ursprünglichen Ausgangszellzahl bestimmt wird. Bei der Verwendung des Absolutely RNA Nanoprep Kits erhält man am Ende der Verarbeitungsschritte RNA in 10 μ l Lösung. Davon werden beim Affinity Sript QPCR cDNA Synthesis Kit 6 μ l in die reverse Transkription eingesetzt. Die erhaltene cDNA in 40 μ l entspricht somit nur dem 0,6-fachen der Ausgangszellzahl. In die real-time PCR werden von den 40 μ l schließlich 2 μ l cDNA eingesetzt, was einen effektiven Anteil von 0,03 der Ausgangszellzahl widerspiegelt. Um also die Ergebnisse aus den Verdünnungsreihen mit den Ergebnissen aus den Versuchen im niedrigen Zellbereich vergleichen zu

können, wurden 10 pg RNA pro Zelle definiert und die cDNA-Konzentration der Verdünnungsproben in die entsprechende Zellzahl folgendermaßen umgerechnet:

Gleichung 8

$$\text{Zellzahl} = \text{cDNA in pg/well} \div 0,03 \div 10$$

2.1.6 Workflow zur Präamplifikation

Häufig können aus niedrigen Zellzahlen u.a. aufgrund der nötigen Arbeitsschritte nur geringe Mengen an RNA isoliert werden, sodass die Sensitivität der real-time PCR nicht ausreicht um Signale detektieren zu können. Es besteht jedoch die Möglichkeit, die Menge an cDNA mittels eines Präamplifikationsschrittes vor Durchführung der real-time PCR zu vervielfältigen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung des TaqMan PreAmp Master Mix Kits von Applied Biosystems / Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) zuverlässige Genexpressionsanalysen aus Proben mit geringen RNA-Konzentrationen möglich waren (Ciotti et al. 2009; Klatsky et al. 2010; Li et al. 2008; Mengual et al. 2008; Noutsias et al. 2008). Daher fiel in den vorliegenden Untersuchungen die Entscheidung, einige Proben unter Verwendung des TaqMan PreAmp Master Mix Kits (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) zu präamplifizieren und die real-time PCR Ergebnisse mit denen der unamplifizierten Proben zu vergleichen. Hierzu wurden die cDNA Proben der Standardverdünnungsreihe (qPCR 1.1a.1) sowie vereinzelt cDNA Proben aus den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich präamplifiziert, ehe anschließend die real-time PCR mit dem Brilliant II QPCR Master Mix Kit nach bereits beschriebenem Protokoll durchgeführt wurde.

Berechnung der Präamplifikationsuniformität

Nach Präamplifikation von cDNA-Proben soll die relative Genexpression der präamplifizierten Proben proportional zur ursprünglichen Genexpression der unamplifizierten Proben bleiben. Zur Beurteilung der Präamplifikationsuniformität wurde daher der sog. ‚delta-delta-CT-Wert‘ ($\Delta\Delta CT$) berechnet, indem der ΔCT -Wert (siehe Gleichung 3 auf Seite 19) der unamplifizierten cDNA-Proben vom ΔCT -Wert der präamplifizierten Proben subtrahiert wurde (siehe Gleichung 9). Laut Herstellerangaben des TaqMan PreAmp Master Mix Kits (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) liegt eine gleichmäßige Präamplifikation von cDNA-Proben vor, wenn der $\Delta\Delta CT$ -Wert gegen Null geht. Proben mit Abweichungen der $\Delta\Delta CT$ -Werte bis zu $\pm 1,5$ werden dabei als ausreichend uniform eingestuft.

Gleichung 9

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{präamplifizierte Proben}) - \Delta CT(\text{unamplifizierte Proben})$$

2.1.7 Workflow zu Experimenten mit fixierten Zellen

Um CTCs unter dem Fluoreszenzmikroskop charakterisieren zu können, ist deren Fixierung am Draht notwendig. Deshalb wurden auch die Auswirkungen unterschiedlicher Fixierungsmethoden auf die Genexpressionsbestimmung von CTCs untersucht. Für die Versuche mit fixierten Zellen wurden nach erfolgter Zählung die Zellen entweder mit Aceton (Merck KgAa, Darmstadt, Deutschland) oder Paraformaldehyd (PFA; Serva, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Bei den Aceton-fixierten Zellen erfolgte die RNA-Extraktion mit dem Absolutely RNA Nanoprep Kit (siehe Kapitel 2.1.9.2), während zur RNA-Extraktion aus den PFA-fixierten Zellen das RNeasy FFPE Kit zum Einsatz kam (siehe Kapitel 2.1.9.3). Die reverse Transkription wurde mit dem Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit

durchgeführt. Im Falle einer Präamplifikation der cDNA-Proben erfolgte diese mit dem TaqMan PreAmp Master Mix Kit (siehe Kapitel 2.1.9.6). Zur real-time PCR Analyse wurde das Brilliant II QPCR Master Mix Kit (siehe Kapitel 2.1.9.7) verwendet.

Aceton-Fixierungsprotokoll

Bis zu 10×10^6 Zellen wurden mit 1000 μ l Aceton, welches bei -20°C gelagert wurde, in einem Falconröhrchen fixiert. Nach 30 Sekunden wurde das Falconröhrchen mit 1x DPBS aufgefüllt und durch den Vortexmischer vermischt. Nach Zentrifugieren auf bis zu 1500 rpm wurde die wässrige Lösung bis auf das Zellpellet abpipettiert und der Waschschrift wiederholt.

PFA-Fixierungsprotokoll

Für die PFA-Fixierung wurde eine Fixierlösung hergestellt, welche zu 96% aus DPBS und zu 4% aus PFA bestand. Dazu wurden 4 g PFA in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung durch Hinzugabe von Natronlauge (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nach Kontrolle mit einem pH-Papier wurde der Ansatz auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Für bis zu 10×10^6 Zellen wurden 1000 μ l PFA-Fixierlösung hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgten, wie bei der Aceton-Fixierung, zwei Waschschriffe.

2.1.8 Workflow zu Kontaminations- und Drahtexperimenten

Kontaminationsversuche

Bei der Genexpressionsbestimmung von am Draht haftenden CTCs muss berücksichtigt werden, dass sich ebenso am Draht gebundene Blutzellen als Störfaktor erweisen könnten. Um diesem Problem zu begegnen wurde ein Versuch entworfen, bei welchem die cDNA von Brustkrebszellen mit der cDNA von Blutzellen in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und durch die real-time PCR untersucht wurden.

Tabelle 2-2: Mischverhältnisse von Zellen der MCF-7- bzw. SK-BR-3-Linie und Zellen der Linie U937.

	Zellzahl von MCF-7 bzw. SK-BR-3		Zellzahl von U937
1.	1000	+	0
2.	100	+	900
3.	50	+	950
4.	10	+	990
5.	5	+	995
6.	2,5	+	997,5
7.	1,25	+	998,75
8.	0	+	1000

Mittels des RNeasy Mini Kit (siehe Kapitel 2.1.9.1) wurde die RNA aus > 1 Millionen Zellen der Linien MCF-7, SK-BR-3 und U937 getrennt voneinander extrahiert und die RNA-Konzentration am Nanodrop Spektrophotometer gemessen. Nach Transkription in cDNA unter Verwendung des Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kits (Kapitel 2.1.9.5) wurden bestimmte cDNA-Mengen der Brustkrebszelllinie MCF-7 bzw. SK-BR-3 mit bestimmten cDNA-Mengen der Zelllinie U937 vermengt. Die Mischverhältnisse sind in Tabelle 2-2 dargelegt. Wie auch bei den vorhergehenden Versuchen wurde pro Zelle eine RNA-Menge von 10 pg definiert. Eine Zellzahl von 100 entsprach also der in cDNA transkribierten RNA von 1000 pg. Mittels real-time PCR (Brilliant II QPCR Master Mix Kit, Kapitel 2.1.9.7) wurden die Expression der Marker *ER* (im MCF-7/U937-Mix) bzw. *HER2* (im SK-BR-3/U937-

Mix) sowie die Expression von *PTPRC* und *HMBS* in den Proben 1-8 bestimmt und ausgewertet. Hierzu wurden die erwarteten und die gemessenen CT-Werte sowie die auf das Housekeeping-Gen *HMBS* normalisierten Ratios gegenübergestellt. Die erwarteten CT-Werte für die Marker *HMBS*, *ER* bzw. *HER2* sowie *PTPRC* wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse aus den Geradengleichungen der Standardverdünnungsreihen der jeweiligen Zelllinien ermittelt.

Drahtversuche

Für die Analyse von am FSMW gefangenen CTCs muss gewährleistet sein, dass die Anwesenheit des Drahtes während der Aufbereitung der Proben zur real-time PCR keine Verfälschung der Ergebnisse verursacht. Es wurden 3 Experimente mit mehreren Proben zu je 100 Zellen aus der SK-BR-3 Linie vorbereitet. Die verwendeten Drähte (FSMW) waren steril verpackt und zuvor nicht bei Patienten angewendet worden. Für die Verarbeitung der Drähte wurde eine Drahtschere mit Ethanol-HCl und RNaseZap (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) vorbehandelt, um sie Nukleinsäure- und Nuklease-frei verwenden zu können. Die ersten 2 cm des Drahtes wurden in ca. 4 mm große Abschnitte zerteilt und in ein 1,5 ml-Sammelröhrchen übertragen. Nach Zugabe der in Lysepuffer gelösten SK-BR-3 Zellen konnte nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis die RNA mit dem Absolutely RNA Nanoprep Kit isoliert werden (siehe Kapitel 2.1.9.2). Die reverse Transkription erfolgte mit dem Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (siehe Kapitel 2.1.9.5), die real-time PCR Analyse mit dem Brilliant II QPCR Master Mix Kit (siehe Kapitel 2.1.9.7). Im Falle einer Präamplifikation erfolgte diese mit dem TaqMan PreAmp Master Mix Kit (siehe Kapitel 2.1.9.6). Die *HER2*-Expression wurde auf das Housekeeping-Gen *HMBS* normalisiert. Als Bezugswerte wurden die Ergebnisse aus den SK-BR-3-Standardverdünnungsreihen herangezogen. Die Arbeitsschritte der einzelnen Experimente sind in Abbildung 2-5 zur Übersicht dargestellt.

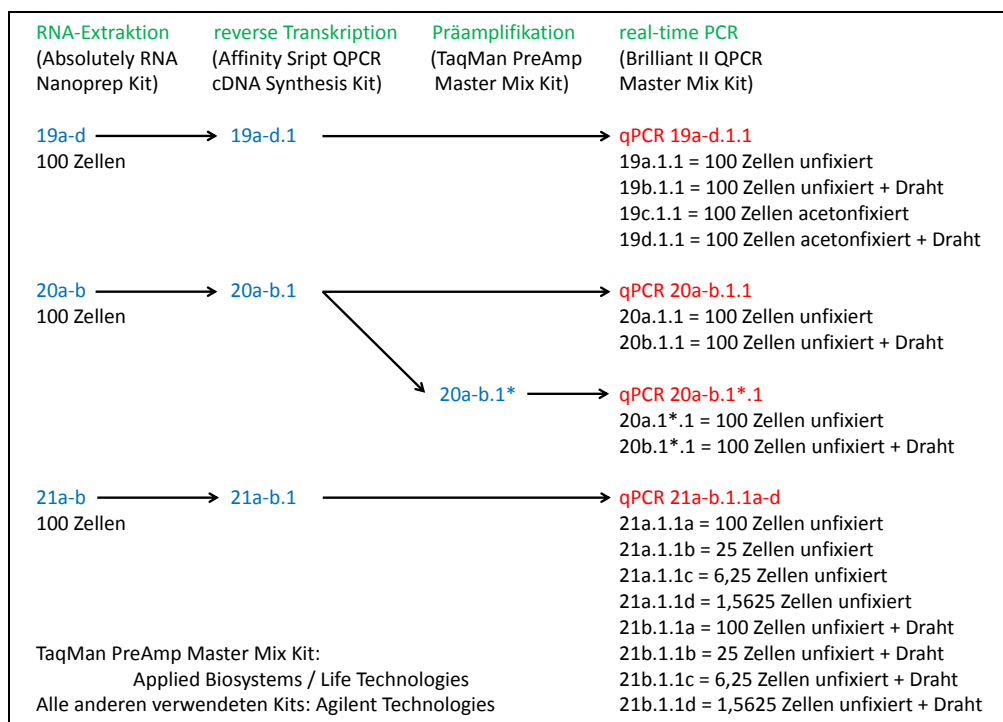


Abbildung 2-5: Experimente mit entsprechenden Arbeitsschritten im Rahmen der Versuche mit dem funktionalisierten Draht (FSMW) der Firma Gilupi.

2.1.9 Verwendete Arbeitskits

2.1.9.1 RNA-Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit

RNA von bis zu 5×10^6 Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Dieses Arbeitskit enthielt unterschiedliche Pufferlösungen, deren exakte Zusammensetzung vertraulich ist. Zu Beginn wurde zum abzentrifugierten Zellpellet 350 μ l RLT Puffer zugegeben und dieselbe Menge 70 prozentigen Ethanol (Apotheke, Klinikum Rechts der Isar) hinzugefügt. Nach Mischen der Proben wurden sie jeweils auf eine Silica-Membran enthaltende RNeasy Mini-Spin Säule übertragen, welche auf ein 2 ml Sammeltube gesetzt wurde. Der RLT Puffer enthält laut Herstellerangaben eine hohe Konzentration an Guanidin Isothiocyanat, welches die RNA-Bindung an die Silica-Membran unterstützt. Die Proben wurden bei 13200 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert (Centrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und das Filtrat verworfen. Daraufhin wurde auf die Säulen 350 μ l von einem Waschpuffer (RW1) übertragen und nach Zentrifugieren bei 13200 rpm für 15 Sekunden der Durchfluss entfernt. Der RW1 Waschpuffer enthält laut Hersteller ein Guanidinsalz und Ethanol, wodurch Biomoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine und Fettsäuren, die nicht an die Silica-Membran gebunden wurden, effektiv entfernt werden. Um einen DNase-Verdau durchführen zu können, musste zunächst eine DNase-Stocklösung hergestellt werden, indem 1500 Kunitz units lyophilisierter DNase I (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 550 μ l RNase freiem Wasser durch langsames Auf- und Abpipettieren vermischt wurden. Die DNase-Stocklösung wurde aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C für maximal 9 Monate eingefroren. Anschließend wurde ein DNase I Inkubationsmix hergestellt, indem 10 μ l DNase-Stocklösung mit 70 μ l RDD Puffer vorsichtig vermischt wurde. Je 80 μ l DNase Inkubationsmix wurden direkt auf die Säulen pipettiert und die Proben bei 25°C für 15 Minuten inkubiert. Laut Qiagen ermöglicht die Zusammensetzung und Salzkonzentration des RDD Puffers einen effizienten Verdau der DNA und stellt gleichzeitig sicher, dass die RNA an den Säulen gebunden bleibt. Es folgten Waschschrte mit 350 μ l RW1 Puffer und anschließend mit 500 μ l RPE Puffer durch Zentrifugierung für jeweils 15 Sekunden mit 13200 rpm. Abschließend erfolgte ein Waschgang mit 500 μ l RPE Puffer für 2 Minuten bei 13200 rpm, um Reste von Salzen aus den vorgängig verwendeten Pufferlösungen und Alkoholreste vollständig zu entfernen. Die Säulen wurden auf 1,5 ml Elutionsröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert und je 50 μ l RNase freies Wasser auf die Silica-Matrix gegeben. Nach Elution der RNA bei 13200 rpm für 1 Minute wurde dieser Arbeitsschritt wiederholt, um ein Endvolumen von 100 μ l zu erhalten. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde am Nano Drop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) gemessen und die RNA anschließend weiterverarbeitet oder bei -20°C bis zum nächsten Arbeitsschritt eingefroren.

2.1.9.2 RNA-Extraktion mit dem Absolutely RNA Nanoprep Kit

Laut Herstellerangaben ermöglicht das Absolutely RNA Nanoprep Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) die RNA Extraktion aus extrem geringen Zellmengen. Um ein möglichst standardisiertes Arbeitsprotokoll zu etablieren, testeten wir dieses Arbeitskit sowohl für unfixierte als auch Aceton-fixierte Zellen. Da sich dieses Kit in Vorversuchen für unfixierte und Aceton-fixierte Zellen bewährte, wurde für die RNA-Extraktion aus Zellzahlen ≤ 2000 ebenfalls das Absolutely RNA Nanoprep Kit verwendet. Zellsuspensionen von 1 Zelle bis zu 2000 Zellen wurden in 20 μ l DPBS gehalten. 0,1 μ l Poly-A carrier RNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde durch Auf- und Abpipettieren hinzugemischt. Für jede Probe wurde eine Lysepuffer- β -Mercaptoethanol-Mixtur (β -ME) zur Inaktivierung von eventuell vorhandenen RNasen hergestellt, indem jeweils 0,7 μ l β -Mercaptoethanol (β -ME), welches im Kit enthalten und einmal geöffnet bei 4°C aufbewahrt wurde,

mit 100 µl Lysepuffer versetzt wurde. Anschließend wurden je 100 µl des Gemischs zu den Proben gegeben und zur Resuspendierung gevortext. Daraufhin wurden jedem Zellysat 100 µl von 80% Sulfolan (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugeführt und die Mixtur auf eine RNA-bindende Nano-spin Säule übertragen, welche auf einem 2 ml fassenden Sammelröhrchen platziert wurde. Die Proben wurden für 60 Sekunden bei 13500 rpm zentrifugiert, das Filtrat dekantiert und die Säulen auf ihre Sammelröhrchen zurückgesetzt. Im nächsten Schritt wurden 300 µl von salzarmem Puffer auf die Säulen übertragen und für 60 Sekunden bei 13500 rpm zentrifugiert. Nachdem das überschüssige Filtrat entfernt wurde, erfolgte eine weitere Zentrifugierung der Proben bei 13500 rpm für 2 Minuten um die Matrix zu trocknen. Vor Durchführung der DNase Behandlung wurde die im Kit enthaltene lyophilisierte RNase-freie DNase I (2600 U) in 290 µl DNase-Rekonstitutionspuffer gelöst, aliquotiert und bis zum weiteren Verbrauch bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde eine frische DNase Master Lösung hergestellt, indem für jede Probe 2,5 µl RNase-freie DNase mit 12,5 µl DNase-Inkubationspuffer vorsichtig durch hin- und herschwenken vermischt wurden. Je 15 µl der DNase Master Lösung wurden direkt auf die Matrix innerhalb der Säulen gegeben und bei 37 °C für 15 Minuten in einem Thermostinkubator inkubiert. Anschließend wurden 300 µl salzreichen Waschpuffers hinzugefügt, die Proben bei 13500 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat entfernt. Daraufhin erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit jeweils 300 µl salzarmen Puffers für je 60 Sekunden in der Zentrifuge bei 13500 rpm. Nach Verwerfung des Filtrates wurden die Säulen zurück auf ihre 2 ml fassenden Sammelröhrchen gesetzt und bei 13500 rpm für 3 Minuten zentrifugiert um die Matrix zu trocknen. Dann erfolgte der Transfer der Säulen auf neue 1,5 ml fassende Sammelröhrchen. Der Elutionspuffer wurde auf 60 °C vorgewärmt und je 10 µl direkt auf die Matrix platziert. Es folgte die Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugierung bei 13500 rpm für 5 Minuten. Schließlich wurde die aufgereinigte RNA in 1,5 ml fassenden Sammelröhrchen revers transkribiert oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.9.3 RNA-Extraktion mit dem RNeasy FFPE Kit

Laut Herstellerangaben ermöglicht das RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) die Aufhebung von Modifikationen durch Formaldehyd ohne größere Schädigung der RNA. Daher erfolgte die RNA-Isolierung aus PFA-fixierten Zellen unter Verwendung des RNeasy FFPE Kits. Zuerst wurden den Proben jeweils 150 µl PKD Puffer zugegeben, gevortext und anschließend 10 µl Proteinase K (im Kit enthalten) sowie 0,1 µl Poly-A carrier RNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) durch Auf- und Abpipettieren hinzugemischt. Es folgten Inkubationen der Proben bei 55 °C für 90 Minuten in einem Thermoschüttelinkubator (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) bei 450 rpm und danach bei 80°C für 15 Minuten zur Inaktivierung der Proteinase K. Die Röhrchen wurden für 1 Minute bei 13500 rpm abzentrifugiert, um Kondensat im Deckel der Sammelröhrchen mit dem Lysat zu vereinigen. Für die restlichen Arbeitsschritte wurde das QIAcube System (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, ein Arbeitssystem für die halbautomatisierte Verarbeitung von Qiagen Mini-Spinsäulen-Kits, welches u.a. für die entsprechenden Arbeitsschritte des RNeasy FFPE Kits nach erfolgtem Proteinase K-Verdau programmiert war. Vor Beginn wurde der QIAcube mit 1000 µl Filterspitzen, RNeasy MinElute Bindungssäulen und 1,5 ml Sammelröhrchen ausgestattet. Als Reagenzien wurden RBC- und RPE-Puffer, 96-prozentiger Ethanol und RNase freies Wasser an die entsprechenden Positionen im QIAcube gesetzt. Bis zu 12 Proben konnten in den QIAcube gesetzt und gleichzeitig bearbeitet werden. Die extrahierte RNA befand sich nach Auslösung in 14 µl RNase freiem Wasser. Sie wurde

anschließend entweder in cDNA umgeschrieben oder bis zum weiteren Einsatz bei -20 °C eingefroren.

2.1.9.4 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA mit dem Nano Drop 2000c Spektrophotometer

Zur Erstellung der Verdünnungsreihen wurde nach erfolgter RNA-Extraktion die Konzentration der Proben am Nano Drop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) gemessen. Als Blankoprobe dienten hierbei die Elutionspuffer der entsprechenden Extraktionskits. Es wurde 1 µl der Probe auf den unteren Messsockel des Nanodrop pipettiert und der Tasthebel geschlossen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte über die Nano Drop 2000/2000c Software (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Nach erfolgter Messung wurden die Kontaktflächen gesäubert. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wurde sie bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen und die Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm sowie bei 260 nm und 230 nm zueinander ins Verhältnis gesetzt. Eine OD 260/280 Ratio von 1,9-2,1 und eine OD 260/230 Ratio von ungefähr 2,2 entspricht einer reinen RNA (RNeasy Mini Handbook, RNeasy FFPE Handbook, Qiagen; Nano Drop 2000c Spektrophotometer User Manual, Thermo Fisher Scientific). Liegen die gemessenen Ratiowerte deutlich unterhalb dieser Werte, so kann davon ausgegangen werden, dass Proteine, Phenol oder andere die RNA-Proben verunreinigende Substanzen im Eluat enthalten sind.

2.1.9.5 Reverse Transkription mit dem AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA erfolgte mit dem AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Hierzu wurde für jede Probe ein Master Mix vorbereitet, welcher 10 µl eines Erststrang Mastermixes (2x), 3 µl oligo(dT) Primer und 1 µl der Affinity Script RT/RNase Block Enzym Mischung enthält. Von diesem Master Mix wurden für jede Probe 14 µl entnommen und in ein 1,5 ml fassendes bedeckeltes Reaktionsröhrchen gegeben. Anschließend folgten die Hinzugabe von 6 µl RNA und die Inkubation bei 25 °C für 5 Minuten, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Durch die Inkubation der Proben bei 42 °C für 45 Minuten erfolgte die cDNA Synthese, welche schließlich durch Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten beendet wurde. Das vollendete Reaktionsgemisch wurde mit RNase freiem Wasser in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.9.6 Präamplifikation mit dem TaqMan PreAmp Master Mix Kit

Für die Präamplifikation der cDNA wurde der TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zuerst wurde ein gepoolter Assay Mix von allen zu messenden Biomarkern (*HMBS*, *GUSB*, *ER*, *HER2*, *PTPRC*) hergestellt, indem 5 µl von jedem 20X TaqMan Assay on Demand Primer and Probe Mix (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) vermengt und in einem Verhältnis von 1:100 mit EB Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) verdünnt wurden, sodass eine 0,2X Endkonzentration entstand (Endvolumen 500 µl). Der gepoolte Assay Mix wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Vorbereitung des Präamplifikationsvorgangs wurden für jede Probe 12,5 µl TaqMan PreAmp Master Mix und 6,25 µl des gepoolten Assay Mix in ein 0,5 ml fassendes PCR Reaktionsröhrchen (Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden jeweils 6,25 µl cDNA hinzugegeben und die Reaktionsröhrchen in einen PCR Cycler (Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) transferiert, welcher auf folgendes Programm eingestellt wurde:

2. Methoden und Material

Tabelle 2-3: Darstellung des zyklischen Ablaufs und des Temperaturprofils der Präamplifikation.

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung (1 Zyklus)	95 °C	10 Minuten
Amplifizierung (10 Zyklen):		
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
Anlagerung und Elongation	60 °C	4 Minuten

Daraufhin wurden die präamplifizierten Proben mit EB Puffer in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und die real-time PCR durchgeführt oder die Proben wurden bis zur weiteren Verwertung bei -20 °C eingefroren.

2.1.9.7 Real-time PCR mit dem Brilliant II QPCR Master Mix Kit

Zu jedem PCR-Lauf wurde ein Layout für die 96-Loch-Reaktionsplatten erstellt und die Menge der Mixtur aus den Reagenzien für die entsprechende Anzahl an Proben eines jeden Markers nach folgendem Schema errechnet:

Tabelle 2-4: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für die real-time PCR.

Menge	Substanz / Kit	Firma
10 µl	Brilliant II qPCR Master Mix	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
2 µl	20X Assay on Demand Primer and Probe Mix	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
6 µl	RNase freies Wasser	
2 µl	zu untersuchende cDNA	

Die Mixtur wurde gevortext und davon jeweils 18 µl in jedes benötigte Loch der Reaktionsplatte (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden für jede zu untersuchende Probe als dreifacher Reaktionsansatz (Triplet) jeweils 2 µl cDNA zur Mixtur auf die Reaktionsplatte pipettiert. Die 96-Loch-Reaktionsplatte wurde mit einer durchsichtigen Klebefolie (BZO seal film; Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) sorgfältig verschlossen und für 1 Minute bei 4000 g zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 L-R; Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) um homogene Reaktionsgemische ohne Blasen zu erhalten. Die real-time PCR wurde an einem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (TaqMan) mit dem folgenden Zyklusprofil durchgeführt:

Tabelle 2-5: Darstellung des zyklischen Ablaufs und des Temperaturprofils der real-time PCR.

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung (1 Zyklus)	95°C	10 Minuten
Amplifizierung (45 Zyklen):		
Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Anlagerung und Elongation	60°C	1 Minute

2.1.10 Nomenklatur der Experimente

Zur besseren Übersicht wurde für die Experimente (Vorversuche ausgeschlossen) eine systematische Nomenklatur erstellt. Die jeweiligen Arbeitsschritte der RNA-Extraktion, der reversen Transkription und der real-time PCR wurden, durch einen Punkt getrennt, jeweils mit arabischen Zahlen

durchnummeriert (siehe Abbildung 2-6). Wurden in einem Experiment zur gleichen Zeit mehrere Proben aus einem Zellbatch bearbeitet, so wurden sie zusätzlich mit kleingeschriebenen Buchstaben des römischen Alphabets gekennzeichnet. Im Falle einer Präamplifikation wurde hinter die arabische Zahl bzw. hinter den römischen Zusatzbuchstaben, welche die reverse Transkription kennzeichnen, ein Stern eingefügt.

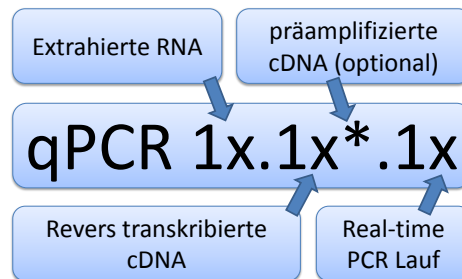


Abbildung 2-6: Erklärung der Nomenklatur der Experimente anhand eines Beispiels mit Beschriftung der unterschiedlichen Positionen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche, ausschließlich der Vorversuche, wurden nach Zelllinie geordnet und sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (siehe Tabelle 6-3 für MCF-7, Tabelle 6-4 für SK-BR-3 und Tabelle 6-5 für U937).

2.2 Material

Tabelle 2-6: verwendete Arbeitsmaterialien.

96-Well-Platte mit flachem Grund	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryogenic Vials (Einfrierröhrchen) 1,2 ml	Thermo Fisher Scientific Nalgene, Neerijse, Belgien
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Drahtschere	Dieckhoff & Ratschow Praxisdienst GmbH & Co.KG, Longuich, Deutschland
Elutionröhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen (10 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
FSMW (functionalized structured medical wire)	GILUPI, Potsdam, Deutschland
GeneAmp Thin-Walled Reaction Tube, with flat cap, 0.5 ml	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Klebefolie BZO seal film	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Kulturflaschen (Cellstar) mit Filterdeckel 150 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kulturflaschen mit Filterdeckel 25 cm ² , 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten (0.1 – 2.5 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10 / 20 / 100 / 200 / 1000 µl)	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettierspitzen mit Filter (2,5 / 10 / 20 / 100 / 200 / 1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettierspitzen mit Filter, verworfbar (200 µl, 1000 µl, 1000 µl wide-bore)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsplatte PCR 96-Well TW-MT-plate	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock microcentrifuge tubes, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sammelröhrchen 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2-7: verwendete organische Substanzen, Chemikalien, Lösungen, Puffer.

Aceton	Merck KgAa, Darmstadt, Deutschland
carrier RNA (poly A)	Qiagen, Hilden, Deutschland
DMEM, high glucose, GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium, (+) 4,5g/l D-Glucose, (-) Pyruvat, (+) GlutaMAX)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Elution Buffer (EB)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat EDTA Versen 1% (w/v)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ethanol 70%	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
foetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
McCoy's 5 A Medium (1X) (Modified), (+) L-Glutamine, (-) Serum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2. Methoden und Material

Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Primer und Sonden - <i>ER</i> : Hs00174860_m1 - <i>GUSB</i> : Hs99999908_m1 - <i>HER2</i> : Hs00170433_m1 - <i>HMBS</i> : Hs00609297_m1 - <i>PTPRC</i> : Hs00236304_m1	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNaseZap	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) (1X) + L-Glutamine	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol (β -ME)	im Absolutely RNA Nanoprep Kit enthalten
Sulfolan	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Zelllinien MCF-7, SK-BR-3, U937	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland

Tabelle 2-8: verwendete Kits.

Absolutely RNA Nanoprep Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Brilliant II qPCR Master Mix Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
RNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan PreAmp Master Mix Kit	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2-9: verwendete Geräte, Hard- und Software.

ABI 7000 TaqMan System	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems / Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland
Nano Drop 2000/2000c Software	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Nano Drop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
QIAcube	Qiagen, Hilden, Deutschland
SDS Sequence detection software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Thermo cell mixing block (Thermoschüttelinkubator)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Östrogenrezeptor (ER) Markersystems

3.1.1 Verdünnungsreihen der Zelllinie MCF-7

Für die Erstellung der Verdünnungsreihen der MCF-7 Zelllinie wurde RNA aus $7,5 \times 10^6$ unfixierten Zellen isoliert, die RNA-Konzentration gemessen und die Qualität der isolierten RNA überprüft. Die OD 260/280 Ratio betrug 2,0 und die 260/230 Ratio 2,1.

3.1.1.1 Standardverdünnungsreihen der Zelllinie MCF-7 von 7143 pg – 3,5 pg pro well

Die Standardverdünnungsreihen der Zelllinie MCF-7 ergaben sowohl für das Housekeeping-Gen *HMBS* als auch für das zu untersuchende Zielgen *ER* sehr gute Linearitäten der Signale von 7143 pg bis zu 3,49 pg pro well. Beide Regressions-Koeffizienten (r^2) der *HMBS* Verdünnungsreihen lagen mit 0,9978 (qPCR 1.1a.1) und 0,9983 (qPCR 1.1b.1) in einem sehr guten Korrelationsverhältnis (siehe Abbildung 3-1). Ebenso zeigten sich beim *ER* in beiden Läufen sehr gute Regressions-Koeffizienten von 0,9983 (qPCR 1.1a.1) und 0,9987 (qPCR 1.1b.1) (siehe Abbildung 3-2).

Die Untersuchung der Markergene ergab eine gute PCR-Effizienz, berechnet aus der Steigung der Geraden der seriellen Probenverdünnungen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Die mittlere Effizienz lag für *HMBS* bei 2,07 mit einer Abweichung von nur 0,42%. Ebenso war die Effizienz der beiden Läufe für den Marker *ER* vergleichbar. Der Mittelwert war bei 1,98 mit einer Abweichung von 0,88% (siehe Tabelle 3-1).

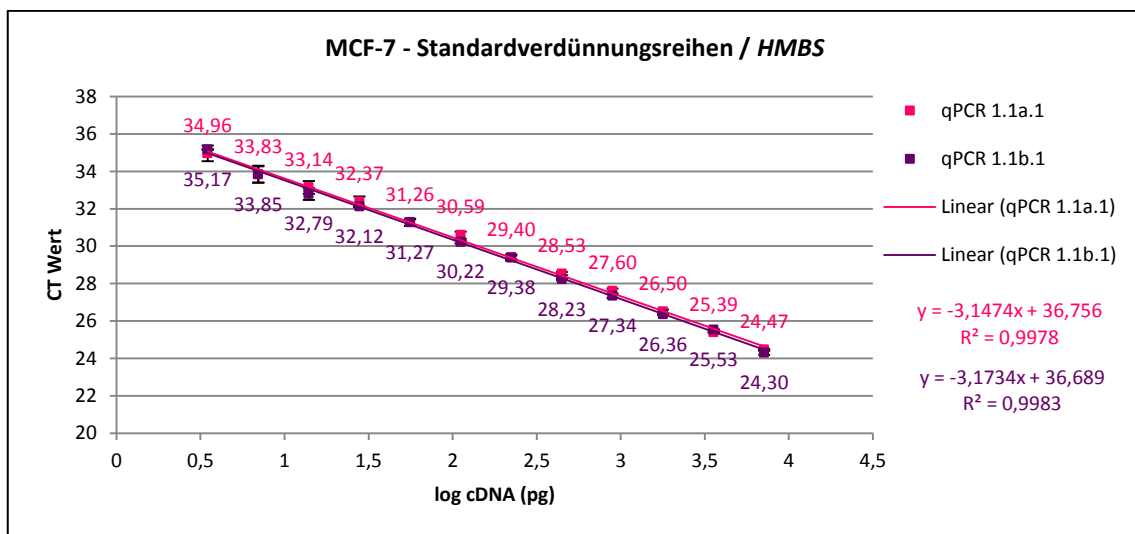


Abbildung 3-1: Expressionsmuster von *HMBS* anhand der Standardverdünnungsreihen aus der MCF-7 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (pg). Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

3. Ergebnisse

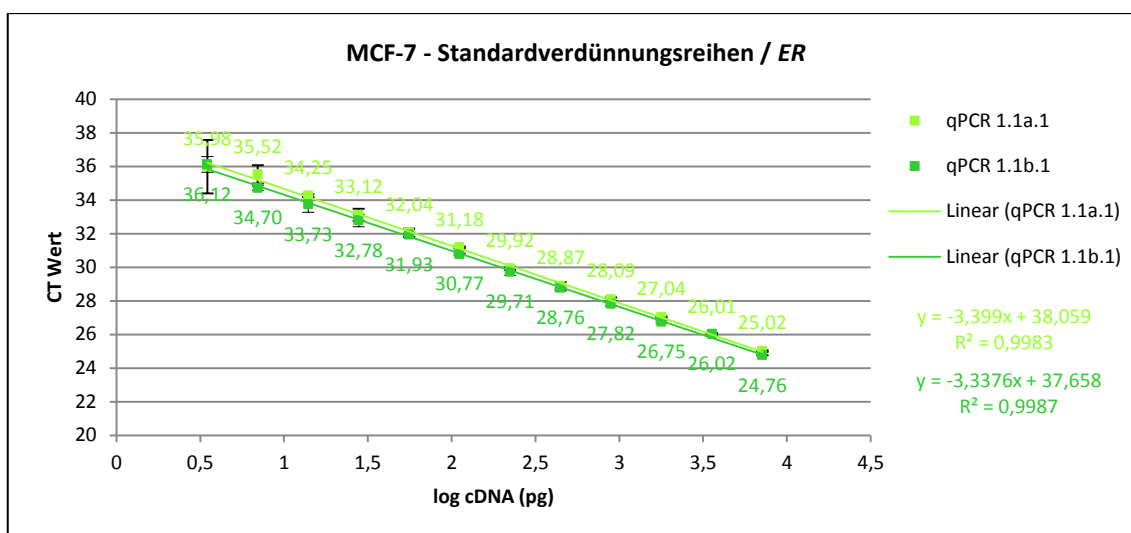


Abbildung 3-2: Expressionsmuster von *ER* anhand der Standardverdünnungsreihen aus der MCF-7 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (pg). Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

Tabelle 3-1: Real-time PCR Effizienzen der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der Zelllinie MCF-7 für die Marker *HMBS* und *ER*. Aufgeführt sind die aus den jeweiligen Standardverdünnungsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

MCF-7	<i>HMBS</i>		<i>ER</i>	
	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1
Steigung	-3,1474	-3,1734	-3,399	-3,3376
Steigung-Varianz (MW)	-3,1604		-3,3683	
Steigung-Varianz (STABW)	0,018384776		0,043416356	
Abweichung der Steigung in %	0,58%		1,29%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	2,078368563	2,06594821	1,968811682	1,993501152
Effizienz-Varianz (MW)	2,072158386		1,981156417	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,008782516		0,017458091	
Abweichung der Effizienz in %	0,42%		0,88%	

Die Analyse der $2^{-\Delta CT}$ -Werte ergab für *HMBS* und *ER* eine Abweichung zu den technisch durch Verdünnung zu erwartenden $2^{-\Delta CT}$ -Werten zwischen 2 und 18%. Eine Abweichung über 20% zeigte sich beim Marker *HMBS* erst ab der Verdünnungsstufe von 6,98 pg/well und beim Marker *ER* ab 13,95 pg/well (siehe Tabelle 6-6, Anhang). Die Abweichung der $2^{-\Delta CT}$ -Werte von den zu erwartenden Werten für gematchte Verdünnungsstufen (7142,86 pg/well aus qPCR 1.1a.1 versus 7142,86/well pg aus qPCR 1.1b.1 etc.) lag sowohl für den Marker *HMBS* als auch für *ER* stets unter 30%.

Die mittlere *ER*-Expression der Verdünnungen 1-7, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS*, betrug 0,71. Eine maximale Abweichung von 30% vom Mittelwert der Verdünnungen 1-7 (7142,86 pg/well – 111,61 pg/well) wurde für eine ausreichende Robustheit des Markersystems angestrebt. Diese lag für die *ER/HMBS* Ratio bei 0,50 und 0,93 (siehe Tabelle 3-3). Für die Auswertung der Versuche im niedrigen Zellzahlbereich wurde der sich innerhalb dieser Grenzwerte befindende Bereich als Zielbereich definiert.

3. Ergebnisse

Zur Übersicht sind die normalisierten Werte der qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 in Tabelle 3-2 dargestellt. In der qPCR 1.1a.1 zeigten sich ab 27,90 pg/well Intra-Assay Varianzen über 20%. Im zweiten Lauf dagegen erst ab 13,95 pg/well. Die Inter-Assay Varianzen lagen mit Ausnahme von 6,98 pg/well stets unter 30%. In Abbildung 3-3 sind die Ratio-Werte mit den 30-prozentigen Abweichungsgrenzen in Form von roten Linien wiedergegeben. Es ist ersichtlich, dass die Signale bis einschließlich einer Einsatzmenge von 27,90 pg/well innerhalb der 30-prozentigen Abweichungsgrenzen lagen. Somit war die *ER/HMBS* Ratio der Proben aus den Standardverdünnungsreihen bis zu 27,90 pg/well konstant und stabil. Unter Annahme von 10 pg RNA pro Zelle und nach Berücksichtigung von Verlusten durch den Aufarbeitungsprozess der prä-PCR würde dies einer Zellzahl von 93 entsprechen.

Tabelle 3-2: Darstellung der aus den Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der MCF-7 Zelllinie errechneten *ER/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für beide Läufe sowie als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1) und Darstellung von Intra- und Inter-Assay-Varianzen. Abweichungen der normalisierten Werte ($2^{-\Delta CT}$) von über 30% vom Mittelwert der Verdünnungsschritte 1-7 sind rot markiert. Intra-Assay-Varianzen über 20% und Inter-Assay-Varianzen über 30% sind gelb markiert.

MCF-7		ER/HMBS					
		qPCR 1.1a.1		qPCR 1.1b.1		beide Läufe	
cDNA in pg/well	± Zellzahl am Draht	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$ - MW	Inter-AV
7142,86	23810	0,69	3,49%	0,73	5,39%	0,71	4,08%
3571,43	11905	0,65	4,31%	0,72	2,43%	0,68	6,53%
1785,71	5952	0,69	6,04%	0,76	3,51%	0,72	7,18%
892,86	2976	0,71	8,63%	0,72	7,18%	0,71	0,82%
446,43	1488	0,79	12,96%	0,69	3,02%	0,74	9,30%
223,21	744	0,70	6,13%	0,80	12,74%	0,75	9,46%
111,61	372	0,67	9,41%	0,68	5,08%	0,67	1,47%
55,80	186	0,58	15,43%	0,63	10,32%	0,61	6,04%
27,90	93	0,60	23,08%	0,63	18,34%	0,61	4,25%
13,95	47	0,46	17,32%	0,52	26,82%	0,49	8,32%
6,98	23	0,31	34,28%	0,55	23,36%	0,43	40,05%
3,49	12	0,49	80,70%	0,52	22,80%	0,50	3,51%

Tabelle 3-3: Darstellung des aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der MCF-7 Zelllinie errechneten normalisierten Mittelwertes ($2^{-\Delta CT}$) inklusive Abweichung von 30% und dem sich daraus ergebenden minimalen und maximalen normalisierten Grenzwert.

MW über Verdünnungen 1-7	30% Abweichung	Min Limit	Max Limit
0,71	0,21389111	0,50	0,93

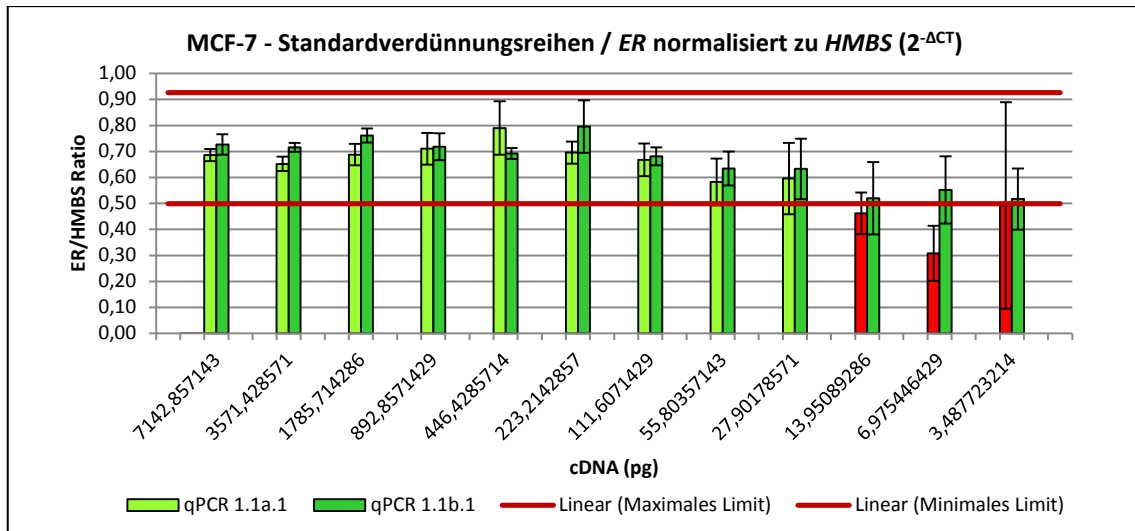


Abbildung 3-3: Expressionsmuster von *ER* der Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *ER/HMBS* Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (MCF-7, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Für die Berechnung der Ratio wurden die jeweils aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte aus den Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 verwendet. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen. Normalisierte Werte, die sich außerhalb dieser Grenzen befinden, sind rot markiert.

3.1.1.2 Präamplifizierte Verdünnsreihen der Zelllinie MCF-7 von 7143 pg – 3,5 pg pro well

Die Fluoreszenzsignale für *HMBS* wurden in den präamplifizierten Proben, im Vergleich zu den Proben der Standardverdünnsreihen, um durchschnittlich 5,17 Zyklen früher registriert. Beim *ER* lag der Unterschied bei durchschnittlich 5,39 CT-Werten. Es zeigten sich in beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2) sehr gute Linearitäten mit Regressionskoeffizienten von 0,997 für *HMBS* und 0,989 bzw. 0,991 für *ER* (Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2, Anhang). Die mittlere PCR-Effizienz betrug für *HMBS* 2,08 mit einer Standardabweichung von 0,59% und für *ER* 1,95 mit einer Abweichung von 0,38% (Tabelle 6-7, Anhang). Die Abweichungen der jeweiligen $2^{-\Delta CT}$ -Werte von den technisch durch Verdünnung zu erwartenden Werten betragen in beiden Läufen unter 20% und im Vergleich beider Läufe ausnahmslos unter 30% (Tabelle 6-8, Anhang). Die aus den Verdünnungsstufen 1-7 errechnete mittlere *ER/HMBS* Ratio war mit 0,85 bis 13,95 pg/well konstant (Abbildung 3-4 und Tabelle 6-9, Anhang). Intra- und Inter-Assay Varianzen lagen durchgehend unter 20 bzw. 30%.

3. Ergebnisse

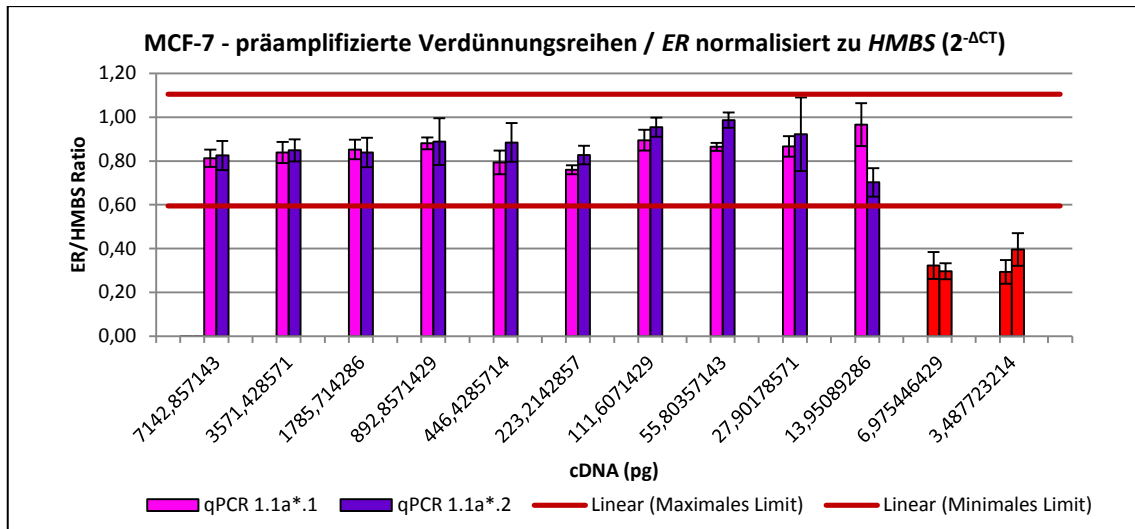


Abbildung 3-4: Expressionsmuster von *ER* der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *ER/HMBS* Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (MCF-7, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Für die Berechnung der Ratio wurden die jeweils aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 verwendet. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen. Normalisierte Werte, die sich außerhalb dieser Grenzen befinden, sind rot markiert.

Abbildung 3-5 gibt eine Übersicht über die Uniformität der Präamplifikation der Standardverdünnungsreihe qPCR 1.1a.1. Es zeigte sich in allen Verdünnungsstufen eine gleichmäßige Präamplifikation mit mittleren $\Delta\Delta CT$ -Werten von -0,13 in der qPCR 1.1a*.1 und -0,18 in der qPCR 1.1a*.2. Die $\Delta\Delta CT$ -Werte sowie die Standardabweichung nahmen mit absteigender cDNA-Menge zwar kontinuierlich bis auf einen Wert von 0,9 zu, doch wurden die Grenzwerte von $\pm 1,5$ in keiner Verdünnungsstufe überschritten.

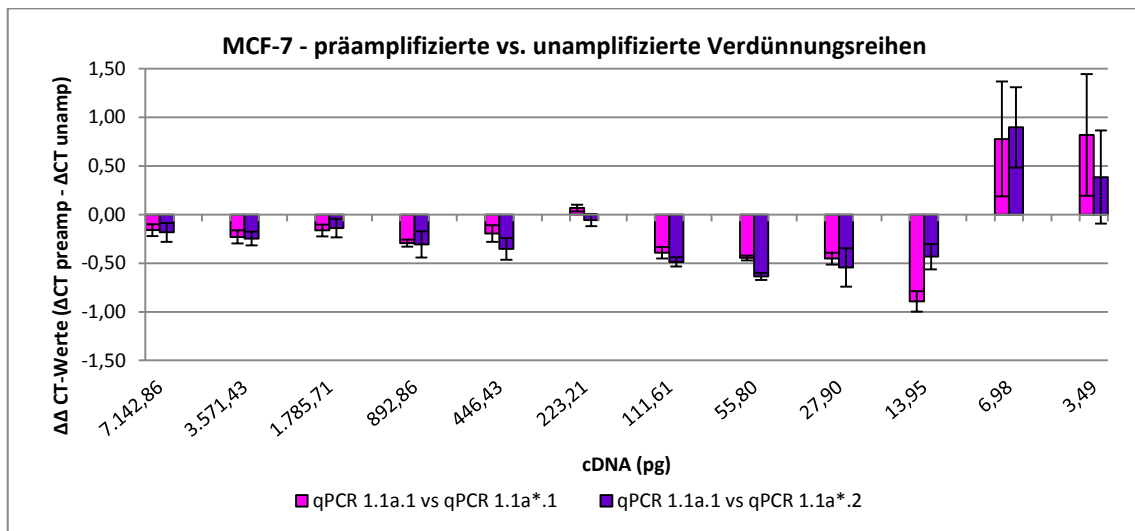


Abbildung 3-5: Präamplifikationsuniformität der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 in Bezug auf die Standardverdünnungsreihe qPCR 1.1a.1 der MCF-7 Zelllinie. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (MCF-7, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Berechnung der $\Delta\Delta CT$ -Werte erfolgte durch Subtraktion der ΔCT -Werte der (unamplifizierten) Standardverdünnungsreihe qPCR 1.1a.1 von den ΔCT -Werten der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2.

3.1.2 Versuche mit unfixierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich

Die Versuche zur Untersuchung der *ER*-Expression in unfixierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich sind zur Übersicht in Abbildung 6-3 im Anhang dargestellt. In Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 im Anhang werden zudem die CT-Werte aller Versuche der MCF-7-Zelllinie zusammengestellt, jeweils getrennt für die Marker *HMBS* und *ER*. Beim Marker *HMBS* wurden ab 20 Zellen ($\log 0,77815125$) erstmals vereinzelt keine Fluoreszenzsignale mehr detektiert (n.d.). Beim *ER* lag die Sensitivitätsgrenze bei 25 Zellen ($\log 0,875061263$). Insgesamt wurden im Bereich von 10 Zellen bis 1 Zelle für *ER* bei 6 Proben keine Signale aufgezeichnet (n.d.), dreimal konnte nur ein Signal aus dem Triplet detektiert werden (1/3) und sechsmal wurden Signale bei nur zwei aus drei registriert (2/3). Bei *HMBS* dagegen blieben nur bei 4 Proben die Fluoreszenzsignale komplett aus (siehe Tabelle 6-10 im Anhang).

3.1.2.1 Unamplifizierte Proben der MCF-7 Zellen (2000 Zellen – 1 Zelle)

Die Expressionsmuster von *ER* sind in Tabelle 3-4 und Abbildung 3-6 dargestellt. Im Vergleich der Proben von 2000 bis 25 Zellen ($n=23$) war der Mittelwert der *ER/HMBS* Ratio mit 0,73 vergleichbar mit der aus den Standardverdünnungsreihen errechneten mittleren Ratio von 0,71 (0,50-0,93). Es errechneten sich eine Inter-Assay Varianz von 13% und Intra-Assay Varianzen bis 33% (qPCR 6c.1.1) bei einer Sensitivität von 96%. Bei Betrachtung des Bereiches zwischen 50 und 10 Zellen ($n=18$) lag die Sensitivität noch bei 78%, bei einer mittleren *ER*-Expression von 0,67 und einer Inter-Assay Varianz von 26%. Hier zeigten sich Intra-Assay Varianzen zwischen 9 und 51%.

Tabelle 3-4: Darstellung der *ER/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus unfixierten und unamplifizierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 2000 bis 1 Zelle.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra AV
qPCR 2.1.1	2000	0,78	3,70%	qPCR 4c.1.1	60	0,86	7,46%	qPCR 4f.1.1	10	0,54	19,61%
qPCR 2.1.2a	1000	0,74	3,17%	qPCR 5c.1.1	50	0,68	10,63%	qPCR 7b.1.1	10	0,64	25,15%
qPCR 2.1.2b	500	0,87	4,78%	qPCR 6c.1.1	50	0,68	33,16%	qPCR 7c.1.1	10	0,80	51,46%
qPCR 2.1.2c	250	0,87	5,97%	qPCR 4d.1.1	40	0,72	30,87%	qPCR 8c.1.1	10	n.d.	n.d.
qPCR 2.1.2d	125	0,86	7,85%	qPCR 2.1.2f	31,3	0,80	9,31%	qPCR 9a.1.1	10	0,66	20,73%
qPCR 3a.1.1	125	0,54	11,10%	qPCR 3c.1.1	31,3	0,71	16,80%	qPCR 3e.1.1	7,8	0,98	73,08%
qPCR 4a.1.1	100	0,72	6,10%	qPCR 5d.1.1	25	0,70	13,30%	qPCR 7d.1.1	5	0,50	n.d.
qPCR 5a.1.1	100	0,75	4,94%	qPCR 6d.1.1	25	n.d.	n.d.	qPCR 7e.1.1	5	0,42	n.d.
qPCR 6a.1.1	100	0,68	8,75%	qPCR 4e.1.1	20	n.d.	n.d.	qPCR 8d.1.1	5	0,42	10,58%
qPCR 8a.1.1	100	0,55	9,74%	qPCR 7a.1.1	20	0,89	24,92%	qPCR 3f.1.1	3,9	0,45	37,71%
qPCR 4b.1.1	80	0,78	13,01%	qPCR 8b.1.1	20	n.d.	n.d.	qPCR 9a.1.1	2	0,58	15,11%
qPCR 5b.1.1	75	0,59	9,20%	qPCR 9a.1.1	20	0,73	13,07%	qPCR 7f.1.1	1	n.d.	n.d.
qPCR 6b.1.1	75	0,76	16,22%	qPCR 2.1.2g	15,6	0,75	15,31%	qPCR 8e.1.1	1	n.d.	n.d.
qPCR 2.1.2e	62,5	0,85	9,02%	qPCR 3d.1.1	15,6	0,12	n.d.	qPCR 9a.1.1	1	0,36	8,37%
qPCR 3b.1.1	62,5	0,62	4,39%								

3. Ergebnisse

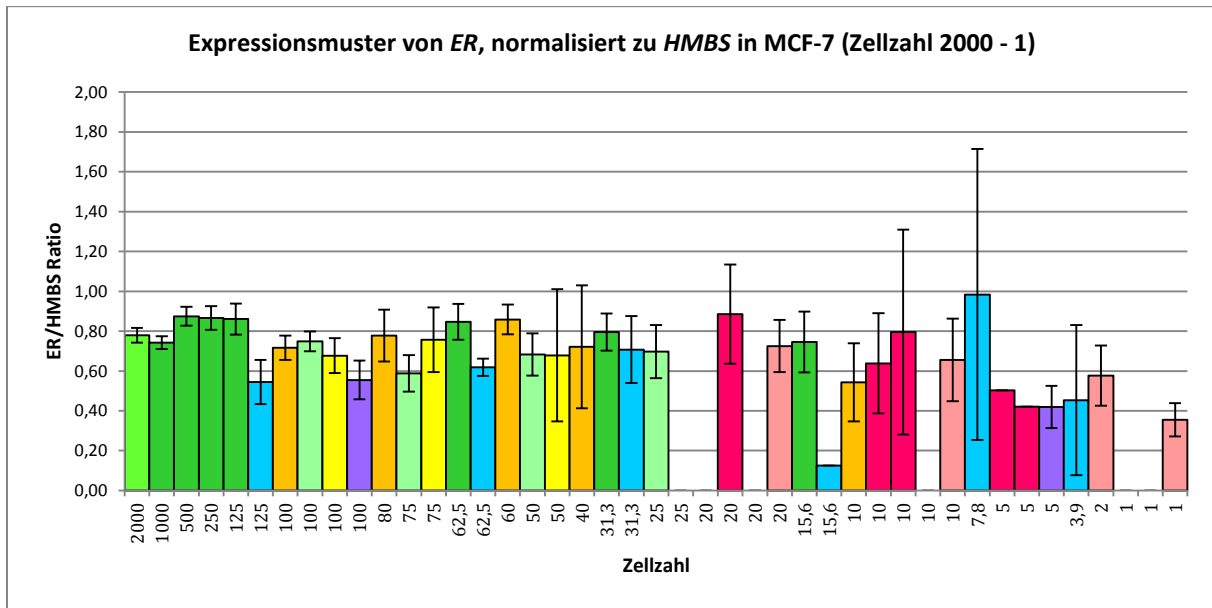


Abbildung 3-6: Expressionsmuster von *ER* aus unfixierten und unamplifizierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 2000 Zellen bis 1 Zelle. Aufgetragen ist die *ER*/*HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

3.1.2.2 Präamplifizierte Proben der MCF-7 Zellen (100 Zellen – 1 Zelle)

Durch Präamplifikation von cDNA Proben aus Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich konnte die Detektions-Sensitivität erhöht werden. Fluoreszenzsignale wurden für *HMBS* um durchschnittlich 5,83 Zyklen früher detektiert, für *ER* um durchschnittlich 5,94 Zyklen (vgl. dazu Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6, Anhang). Es zeigten sich sehr gute Präamplifikationsuniformitäten mit einem durchschnittlichen $\Delta\Delta CT$ -Wert von -0,02. Lediglich der $\Delta\Delta CT$ -Wert der qPCR 3d.1(*).1 mit 15,6 Zellen lag mit -1,61 außerhalb des akzeptablen Uniformitätsbereichs (Abbildung 3-7). Für die qPCR 6d.1(*).1 mit 25 Zellen konnte keine Präamplifikationsuniformität ermittelt werden, da für *ER* in der unamplifizierten Probe keine Signale in der real-time PCR detektiert werden konnten und somit kein ΔCT -Wert errechnet werden konnte.

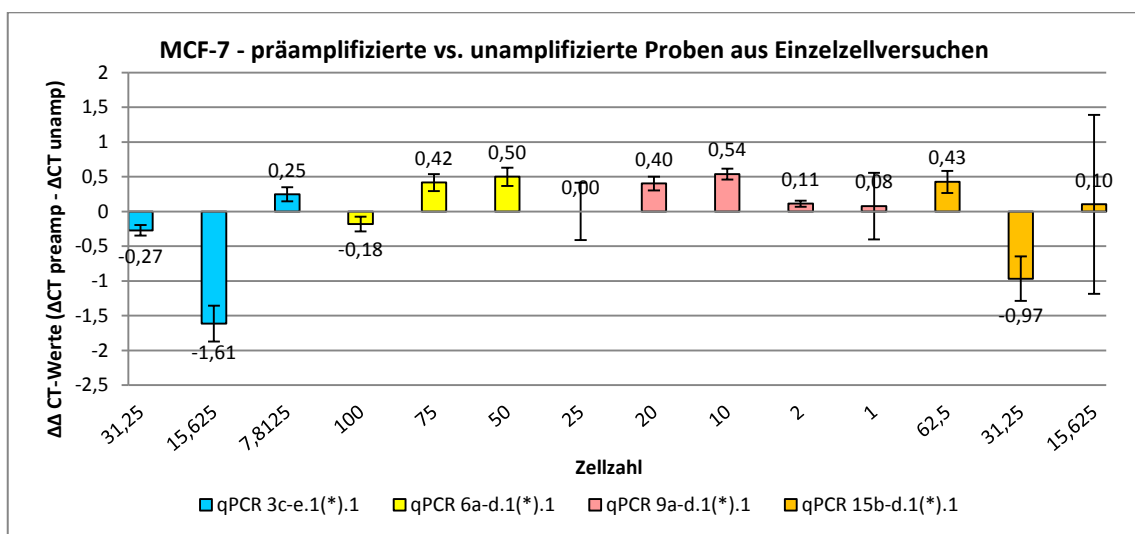


Abbildung 3-7: Präamplifikationsuniformität der qPCR 3c-e.1(*).1, qPCR 6a-d.1(*).1, qPCR 9a-d.1(*).1 und qPCR 15b-d.1(*).1 der MCF-7 Zelllinie. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl. Range: 100 bis 1 Zelle.

3. Ergebnisse

Trotz guter Präamplifikationsuniformität und höherer Detektions-Sensitivität im Vergleich zu den unamplifizierten Proben konnte im Überblick aller präamplifizierten Proben (Zellzahl 100-1) keine stabilere Genexpression von *ER* festgestellt werden (Abbildung 3-8 und Tabelle 3-5). Es zeigten sich ausgeprägte Schwankungen in der *ER/HMBS* Ratio (Mittelwert 0,50) mit Inter-Assay Varianzen von 43% bei einer Sensitivität von 84% (n=22). Erst ab 25 bis 100 Zellen (n=6) war die Inter-Assay Varianz mit 20% im erwünschten Zielbereich mit einer mittleren *ER*-Expression von 0,67 bei einer Sensitivität von 100%.

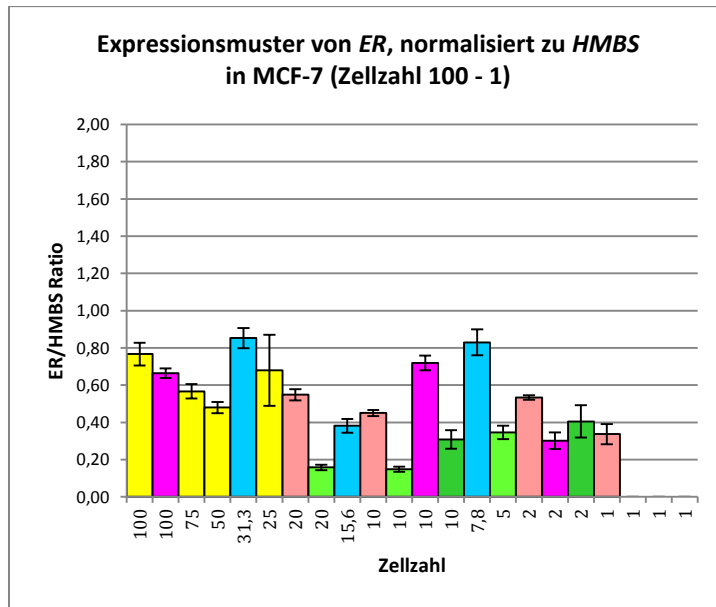


Abbildung 3-8: Expressionsmuster von *ER* aus unfixierten und präamplifizierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 100 Zellen bis 1 Zelle. Aufgetragen ist die *ER/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

Tabelle 3-5: Darstellung der *ER/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus unfixierten und präamplifizierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 100 bis 1 Zelle.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 6a.1*.1	100	0,77	6,15%
qPCR 11a.1*.1	100	0,66	2,64%
qPCR 6b.1*.1	75	0,57	3,88%
qPCR 6c.1*.1	50	0,48	3,03%
qPCR 3c.1*.1	31,3	0,85	5,43%
qPCR 6d.1*.1	25	0,68	19,05%
qPCR 9a.1*.1	20	0,55	2,99%
qPCR 10a.1*.1	20	0,16	1,45%
qPCR 3d.1*.1	15,6	0,38	3,75%
qPCR 9b.1*.1	10	0,45	1,61%
qPCR 10b.1*.1	10	0,15	1,42%
qPCR 11b.1*.1	10	0,72	3,96%
qPCR 12a.1*.1	10	0,31	5,00%
qPCR 3e.1*.1	7,8	0,83	6,96%
qPCR 10c.1*.1	5	0,35	3,67%
qPCR 9c.1*.1	2	0,53	1,26%
qPCR 11c.1*.1	2	0,30	4,41%
qPCR 12b.1*.1	2	0,41	8,62%
qPCR 9d.1*.1	1	0,34	5,44%
qPCR 10d.1*.1	1	n.d.	n.d.
qPCR 11d.1*.1	1	n.d.	n.d.
qPCR 12c.1*.1	1	n.d.	n.d.

3.2 Etablierung des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (*HER2*) Markersystems

3.2.1 Verdünnungsreihen der Zelllinie SK-BR-3

Es wurden die RNA aus $1,69 \times 10^7$ Zellen der Linie SK-BR-3 extrahiert und die Konzentration und Qualität am Nanodrop gemessen. Die Ratio betrug 1,8 bei OD 260/280 und 2,25 bei OD 260/230.

3.2.1.1 Standardverdünnungsreihe der Zelllinie SK-BR-3 von 7143 pg – 3,5 pg pro well

In den Standardverdünnungsreihen der SK-BR-3 Zelllinie wurden für *HMBS* ab 13,95 pg/well und für *HER2* ab 6,98 pg/well zum Teil nur noch vereinzelt Fluoreszenzsignale detektiert. Die Regressionskoeffizienten der *HMBS* Standardverdünnungsreihen betragen 0,9721 in der qPCR 1.1a.1 und 0,9584 in der qPCR 1.1b.1 (Abbildung 3-9). Eine bessere Linearität zeigte sich in den Kurven von *HER2* mit Regressionskoeffizienten von 0,9884 in der qPCR 1.1a.1 und 0,981 in der qPCR 1.1b.1 (Abbildung 3-10).

3. Ergebnisse

Die aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1) gemittelte real-time PCR Effizienz des Markers *HMBS* lag bei 2,13449544 mit einer Abweichung von 8,24%. Für den Marker *HER2* zeigte sich ein real-time PCR Effizienz-Mittelwert von 2,027805222 mit einer Abweichung von 1,50% (Tabelle 3-6).

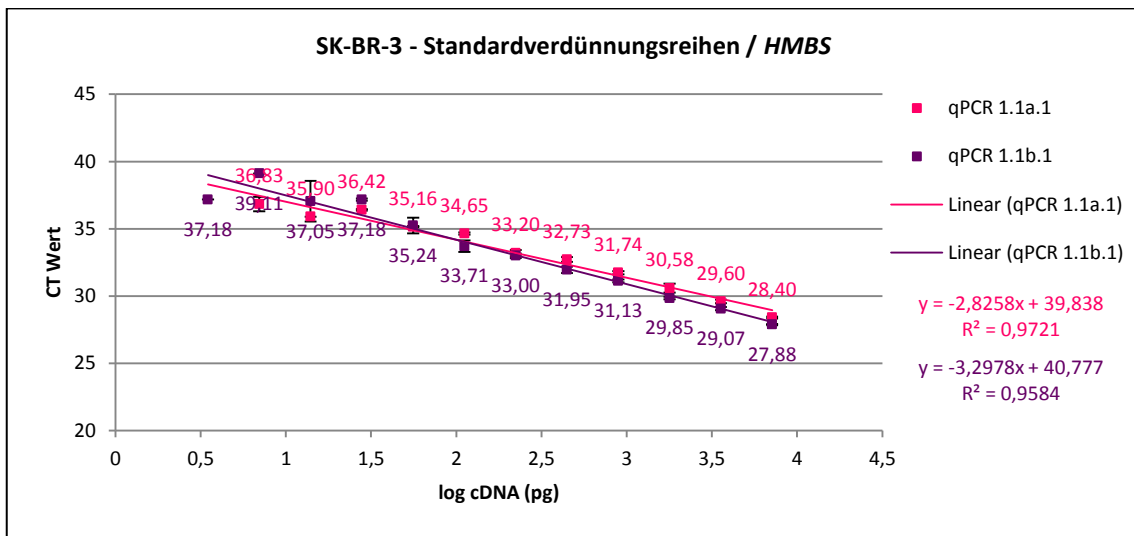


Abbildung 3-9: Expressionsmuster von *HMBS* anhand der Standardverdünnsreihen aus der SK-BR-3 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (pg). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

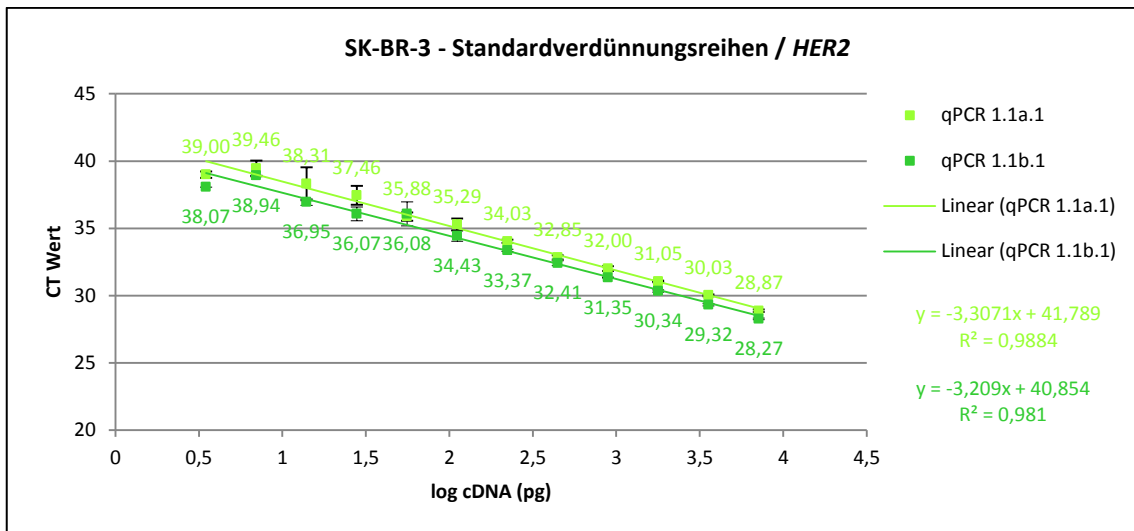


Abbildung 3-10: Expressionsmuster von *HER2* anhand der Standardverdünnsreihen aus der SK-BR-3 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (pg). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

3. Ergebnisse

Tabelle 3-6: Real-time PCR Effizienzen der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der Zelllinie SK-BR-3 für die Marker *HMBS* und *HER2*. Aufgeführt sind die aus den jeweiligen Standardverdünnungsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

SK-BR-3	HMBS		HER2	
	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1
Steigung	-2,8258	-3,2978	-3,3071	-3,209
Steigung-Varianz (MW)	-3,0618		-3,25805	
Steigung-Varianz (STABW)	0,333754401		0,069367175	
Abweichung der Steigung in %	10,90%		2,13%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	2,258822403	2,010168476	2,006225418	2,049385026
Effizienz-Varianz (MW)	2,13449544		2,027805222	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,175824878		0,030518452	
Abweichung der Effizienz in %	8,24%		1,50%	

Bei der Berechnung der $2^{-\Delta CT}$ -Werte ergaben sich für beide Marker ab 111,61 pg/well Abweichungen zu den technisch durch Verdünnung zu erwartenden Werten von über 20% (Tabelle 6-11, Anhang). Die Abweichung des Mittelwertes der $2^{-\Delta CT}$ -Werte beider Läufe lag bei *HMBS* nur bei 27,90 pg/well mit 58,99% deutlich über 30%, während sich bei *HER2* ab 55,80 pg/well Abweichungen über 30% zeigten.

Die normalisierten *HER2*-Expressionswerte waren bis 55,80 pg/well konstant, was umgerechnet einer Zellzahl von 186 Zellen entsprechen würde (Tabelle 3-7 und Abbildung 3-11). Der Ratio-Mittelwert der Verdünnungsstufen 1-7 lag bei 0,74 und die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen bei 0,52 und 0,97 (Tabelle 3-8). Diese dienten als Zielbereich für die Versuche der unamplifizierten Proben der SK-BR-3 Zelllinie im niedrigen Zellzahlbereich. Ab 111,61 pg/well zeigten sich in beiden Läufen Intra-Assay Varianzen über 20%, ab 27,90 pg/well Inter-Assay Varianzen über 30%.

Tabelle 3-7: Darstellung der aus den Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der SK-BR-3 Zelllinie errechneten *HER2/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für beide Läufe sowie als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1) und Darstellung von Intra- und Inter-Assay-Varianzen. Abweichungen der normalisierten Werte ($2^{-\Delta CT}$) von über 30% vom Mittelwert der Verdünnungsschritte 1-7 sind rot markiert. Intra-Assay-Varianzen über 20% und Inter-Assay-Varianzen über 30% sind gelb markiert.

SK-BR-3		HER2/HMBS					
		qPCR 1.1a.1		qPCR 1.1b.1		beide Läufe	
cDNA in pg / well	± Zellzahl am Draht	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$ - MW	Inter-AV
7142,86	23810	0,72	5,52%	0,76	3,72%	0,74	3,92%
3571,43	11905	0,75	7,49%	0,84	6,87%	0,79	8,32%
1785,71	5952	0,72	16,59%	0,71	6,47%	0,72	1,14%
892,86	2976	0,84	10,45%	0,86	5,01%	0,85	1,96%
446,43	1488	0,92	11,74%	0,72	14,03%	0,82	16,91%
223,21	744	0,56	12,80%	0,77	9,37%	0,67	22,52%
111,61	372	0,64	22,00%	0,61	28,35%	0,63	4,41%
55,80	186	0,60	15,41%	0,56	52,42%	0,58	5,63%
27,90	93	0,49	34,59%	2,15	25,42%	1,32	89,36%
13,95	47	0,19	-	1,07	75,47%	0,63	99,35%
6,98	23	0,16	38,84%	1,13	-	0,64	105,98%
3,49	12	-	-	0,54	-	-	-

3. Ergebnisse

Tabelle 3-8: Darstellung des aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der SK-BR-3 Zelllinie errechneten normalisierten Mittelwertes ($2^{-\Delta CT}$) inklusive Abweichung von 30% und dem sich daraus ergebenden minimalen und maximalen normalisierten Grenzwert.

MW über Verdünnungen 1-7	30% Abweichung	Min Limit	Max Limit
0,74	0,22332613	0,52	0,97

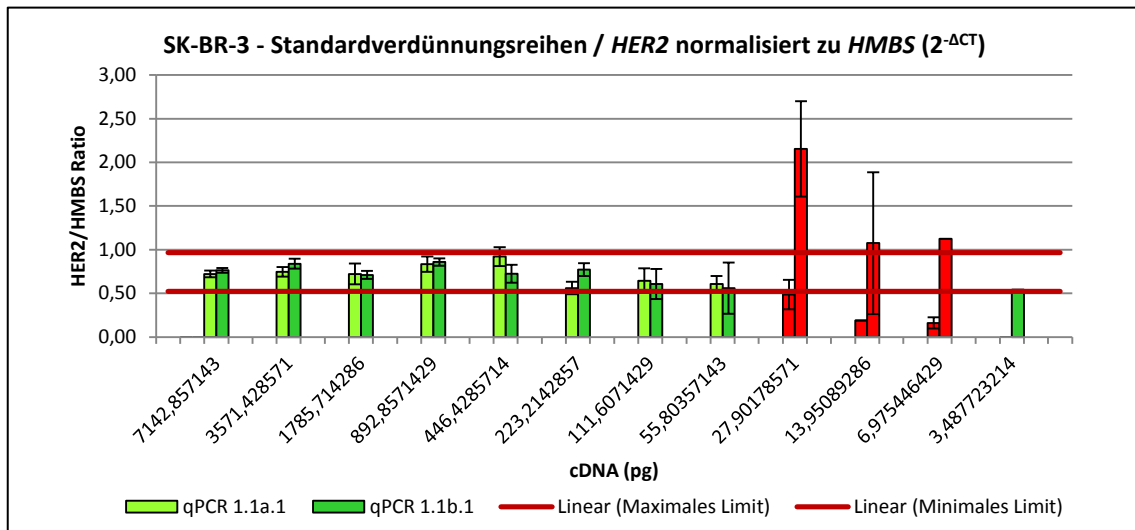


Abbildung 3-11: Expressionsmuster von *HER2* der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *HER2*/*HMBS* Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (SK-BR-3, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Für die Berechnung der Ratio ($2^{-\Delta CT}$) wurden die jeweils aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte aus den Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 verwendet. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen. Normalisierte Werte, die sich außerhalb dieser Grenzen befinden, sind rot markiert.

3.2.1.2 Präamplifizierte Verdünnungsreihen der Zelllinie SK-BR-3 von 7143 pg – 3,5 pg pro well

Die präamplifizierte Verdünnungsreihen waren bis zum Einsatz von 6,98 pg/well weitgehend linear für *HMBS* mit Regressionskoeffizienten von 0,9763 in der qPCR 1.1a*.1 und 0,9818 in der qPCR 1.1a*.2 (Abbildung 6-7, Anhang), wie auch für *HER2* mit 0,9767 in der qPCR 1.1a*.1 und 0,9811 in der qPCR 1.1a*.2 (Abbildung 6-8, Anhang). In der 12. Verdünnungsstufe konnten in keinem der beiden Läufe CT-Werte detektiert werden. Die mittlere real-time PCR Effizienz lag für *HMBS* bei 1,95 mit einer Standardabweichung von nur 0,06%. Für *HER2* errechnete sich eine realtime-PCR Effizienz von 1,82 mit einer Abweichung von 0,63%. Abweichungen der $2^{-\Delta CT}$ -Werte zu den technisch durch Verdünnung zu erwartenden Werten lagen bei beiden Markern, sowohl in der qPCR 1.1a*.1 und in der qPCR 1.1a*.2 getrennt als auch nach Bildung des Mittelwertes aus beiden Läufen, nahezu vollständig unter 20% bzw. 30% (Tabelle 6-13, Anhang). Die einzige Ausnahme bildete die Abweichung des $2^{-\Delta CT}$ -Wertes von *HER2* bei 13,95 pg/well der qPCR 1.1a*.2, die mit 30,48% erhöht war.

Die *HER2*-Expressionsmuster waren bis 223,21 pg/well mit einer durchschnittlichen *HER2*/*HMBS* Ratio von 0,73 konstant (Abbildung 3-12 und Tabelle 6-14, Anhang). Dies würde umgerechnet 744 Zellen entsprechen. Erhöhte Intra-Assay Varianzen zeigten sich ab 6,98 pg/well. Die Inter-Assay Varianzen waren unter 20%.

3. Ergebnisse

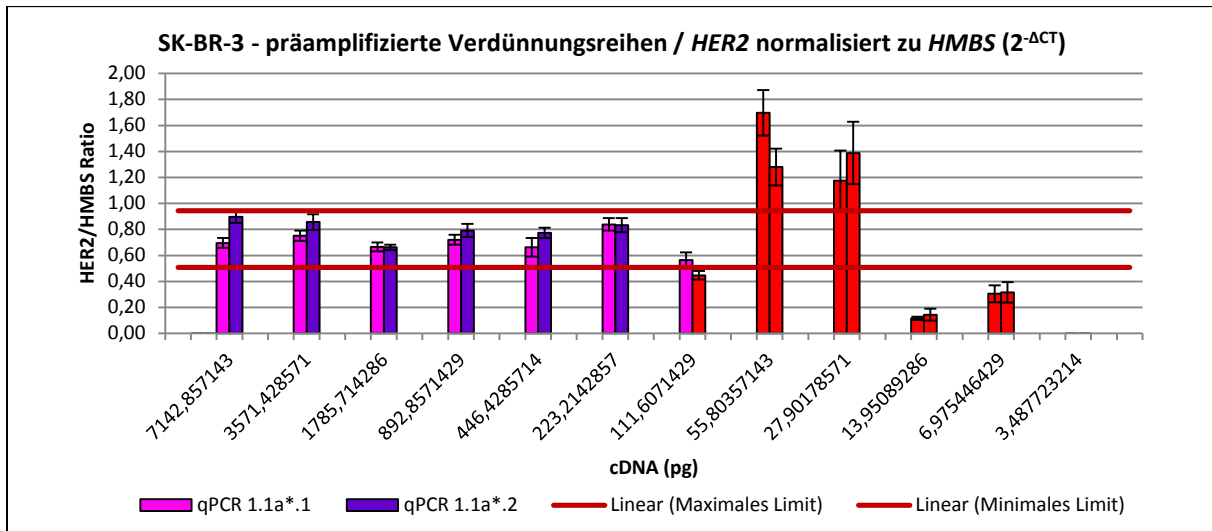


Abbildung 3-12: Expressionsmuster von *HER2* der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *HER2/HMBS* Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (SK-BR-3, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Für die Berechnung der Ratio ($2^{-\Delta CT}$) wurden die jeweils aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 verwendet. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen. Normalisierte Werte, die sich außerhalb dieser Grenzen befinden, sind rot markiert.

Im Vergleich der präamplifizierten Verdünnungsreihen mit der unamplifizierten Standardverdünnungsreihe qPCR 1.1a.1 errechnete sich ein durchschnittlicher $\Delta\Delta CT$ -Wert von 0,46 in der qPCR 1.1a*.1 und 0,40 in der qPCR 1.1a*.2. In den ersten 7 Verdünnungsstufen (7143 pg bis 111,61 pg pro well) zeigte sich eine sehr gute Präamplifikationsuniformität zwischen -0,23 bis 0,44 (Abbildung 3-13). Beim 55,8 pg/well lag der $\Delta\Delta CT$ -Wert der qPCR 1.1a*.1 bei -1,60 und somit außerhalb der Uniformitätsgrenzen von $\pm 1,5$. Die Präamplifikation der Verdünnungsstufen 6 und 7 beider Verdünnungsreihen mit 13,95 pg und 6,98 pg pro well waren mit $\Delta\Delta CT$ -Werten von über 1,5 ebenfalls nicht uniform. Für die letzte Verdünnungsstufe mit 3,49 pg/well konnte der $\Delta\Delta CT$ -Wert aufgrund mangelnder Signaldetektion in der real-time PCR nicht ermittelt werden.

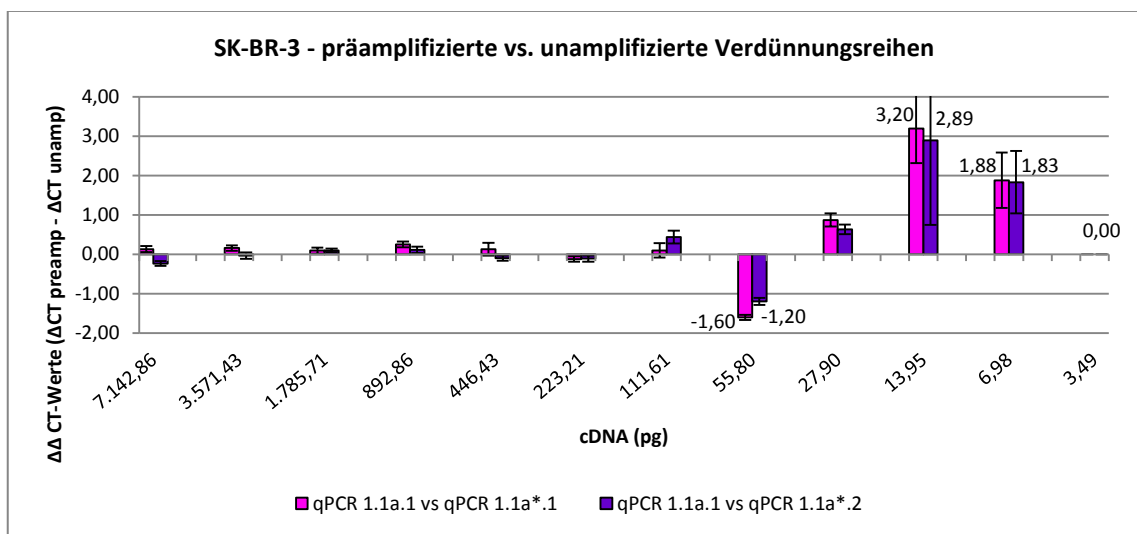


Abbildung 3-13: Präamplifikationsuniformität der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 in Bezug auf die Standardverdünnungsreihe qPCR 1.1a.1 der SK-BR-3 Zelllinie. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (SK-BR-3, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well.

3.2.2 Versuche mit unfixierten SK-BR-3 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich

Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der *HER2* Expression in unfixierten SK-BR-Zellen ist zur Übersicht in Abbildung 6-9 im Anhang dargestellt. Die für die Marker *HMBS* und *HER2* aus den Triplikaten errechneten CT-Mittelwerte der beschriebenen Versuchsreihen sind im Anhang in Abbildung 6-11 für *HMBS* und in Abbildung 6-12 für *HER2* zusammengestellt. Die *HER2*-Expression konnte in allen Proben mit mindestens 15,6 Zellen ermittelt werden. Für den Marker *HMBS* wurde ab 10 Zellen (log 0,477121) erstmals vereinzelt kein CT-Wert mehr erfasst (n.d.). Beim Marker *HER2* war der erste Ausfall des Signals bei 15,6 Zellen (log 0,670941).

3.2.2.1 Unamplifizierte Proben der SK-BR-3 Zellen (2000 – 0,75 Zellen)

Die *HER2*-Expressionsmuster von 2000 bis 0,75 Zellen sind in Tabelle 3-9 und Abbildung 3-14 dargestellt. Im Vergleich der Proben von 2000 bis 75 Zellen (n=18) betrug die mittlere *HER2*/*HMBS* Ratio 0,66 mit Intra-Assay Varianzen bis 45% (qPCR 9.1.1b) und einer Inter-Assay Varianz von 26% bei einer Sensitivität von 100%. Somit waren die Ergebnisse aus den Standardverdünnungsreihen mit der mittleren *HER2*/*HMBS* Ratio von 0,66 (0,53-0,97) in den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich bis zu 75 Zellen reproduzierbar. Bei Zellzahlen unter 75 traten vermehrt Schwankungen in der *HER2*-Expression auf. Im Bereich von 50 bis 10 Zellen (n=11) war die Sensitivität noch bei 73%. Hier betrug der Mittelwert der relativen *HER2*-Expression 0,23 mit Intra-Assay Varianzen zwischen 2 und 49% und einer Inter-Assay Varianz von 67%.

Tabelle 3-9: Darstellung der *HER2*/*HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus unfixierten und unamplifizierten SK-BR-3 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 2000 bis 0,75 Zellen.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 2.1.1	2000	0,76	4,63%	qPCR 7b.1.1	100	0,73	23,54%	qPCR 10d.1.1	25	0,09	1,70%
qPCR 5a.1.1	1000	0,66	7,18%	qPCR 8b.1.1	100	0,54	4,10%	qPCR 4d.1.1	15,6	n.d.	-
qPCR 6a.1.1	1000	0,89	9,59%	qPCR 9.1.1a	100	0,51	19,09%	qPCR 5c.1.1	10	0,30	13,52%
qPCR 7a.1.1	1000	0,70	8,92%	qPCR 10a.1.1	100	0,51	5,06%	qPCR 6c.1.1	10	0,23	12,03%
qPCR 8a.1.1	1000	0,71	3,93%	qPCR 9.1.1b	75	0,92	44,93%	qPCR 7c.1.1	10	n.d.	-
qPCR 3a.1.1	1000	0,58	3,38%	qPCR 10b.1.1	75	0,20	10,24%	qPCR 8c.1.1	10	0,39	7,98%
qPCR 3b.1.1	500	0,52	3,34%	qPCR 4b.1.1	62,5	0,30	3,89%	qPCR 12.2.1	9	0,27	-
qPCR 3c.1.1	250	0,73	8,27%	qPCR 9.1.1c	50	0,53	-	qPCR 4e.1.1	7,8	0,38	32,26%
qPCR 3d.1.1	125	0,77	18,25%	qPCR 10c.1.1	50	0,21	13,23%	qPCR 4f.1.1	3,9	0,20	12,30%
qPCR 4a.1.1	125	0,57	7,54%	qPCR 12.1.1	48	0,20	-	qPCR 12.3.1	2,25	n.d.	-
qPCR 5b.1.1	100	0,82	15,03%	qPCR 4c.1.1	31,3	0,17	4,12%	qPCR 5d.1.1	2	0,85	48,58%
qPCR 6b.1.1	100	0,70	3,47%	qPCR 9.1.1d	25	n.d.	-	qPCR 12.4.1	0,75	n.d.	-

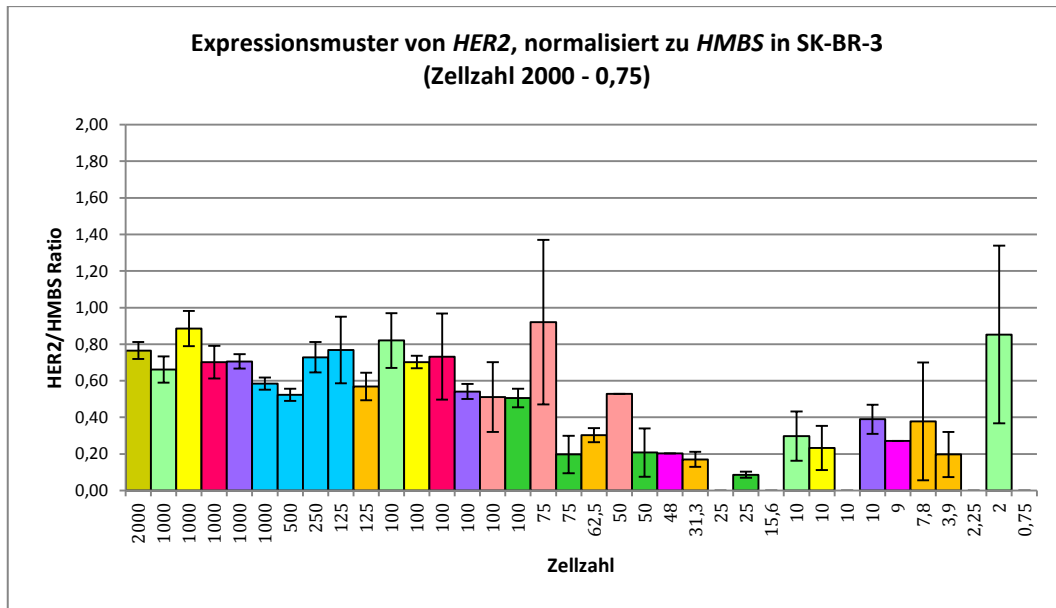


Abbildung 3-14: Expressionsmuster von *HER2* aus unfixierten und unamplifizierten SK-BR-3 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 2000 bis 0,75 Zellen. Aufgetragen ist die *HER2/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

3.2.2.2 Präamplifizierte Proben der SK-BR-3 Zellen (1000 Zellen – 1 Zelle)

Für *HMBS* wurden die CT-Werte in den präamplifizierten Proben um durchschnittlich 5,66 Zyklen früher gemessen, für *HER2* um durchschnittlich 5,22 Zyklen (vgl. dazu Abbildung 6-11 und Abbildung 6-12, Anhang).

Bei Berechnung der Präamplifikationsuniformität errechnete sich ein durchschnittlicher $\Delta\Delta CT$ -Wert von 0,44. Lediglich die Probe mit 100 Zellen der qPCR 10a.1*.1 zeigte mit einem $\Delta\Delta CT$ -Wert von 1,56 eine unzureichende Präamplifikationsuniformität (Abbildung 3-15). Die $\Delta\Delta CT$ -Werte der restlichen präamplifizierten Proben lagen alle innerhalb der akzeptablen Grenzen zwischen $\pm 1,5$.

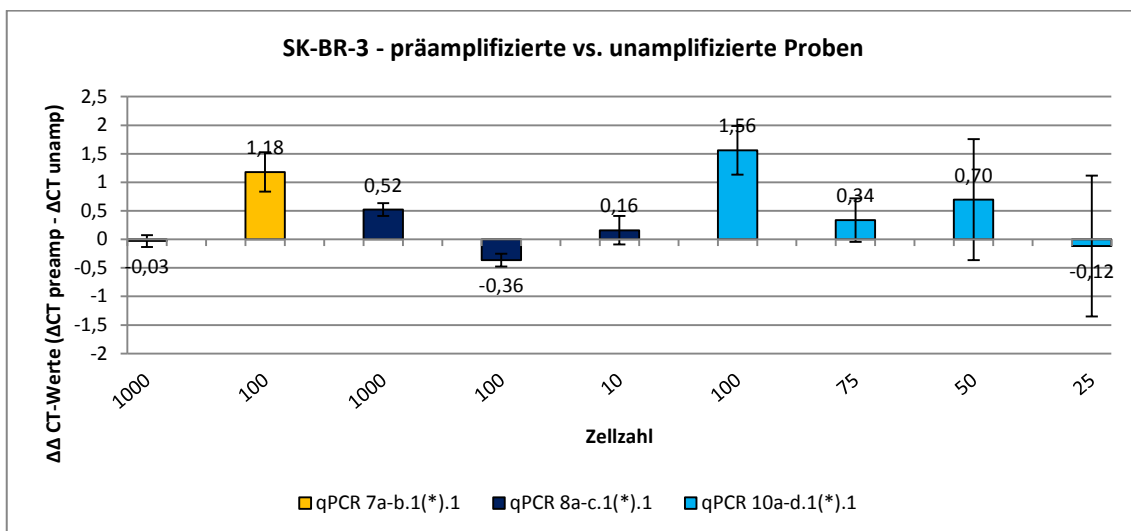


Abbildung 3-15: Präamplifikationsuniformität der qPCR 7a-b.1(*).1, qPCR 8a-c.1(*).1 und qPCR 10a-d.1(*).1 der SK-BR-3 Zelllinie. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl. Range: 1000 bis 10 Zellen.

Im Bereich von 1000 bis 75 Zellen ($n=7$) war die relative *HER2*-Expression bei 0,49 mit einer Sensitivität von 100%. Die Intra-Assay Varianzen waren im Vergleich zu den unamplifizierten Proben

3. Ergebnisse

deutlich niedriger mit maximal 5,42% (Tabelle 3-10, Abbildung 3-16). Allerdings zeigte sich zwischen den Läufen eine stärkere Heterogenität in der Genexpression mit erhöhten Inter-Assay Varianzen bei 58% (vgl. dazu Inter-Assay Varianz von 26% bei unamplifizierten Proben im Bereich von 2000 bis 75 Zellen).

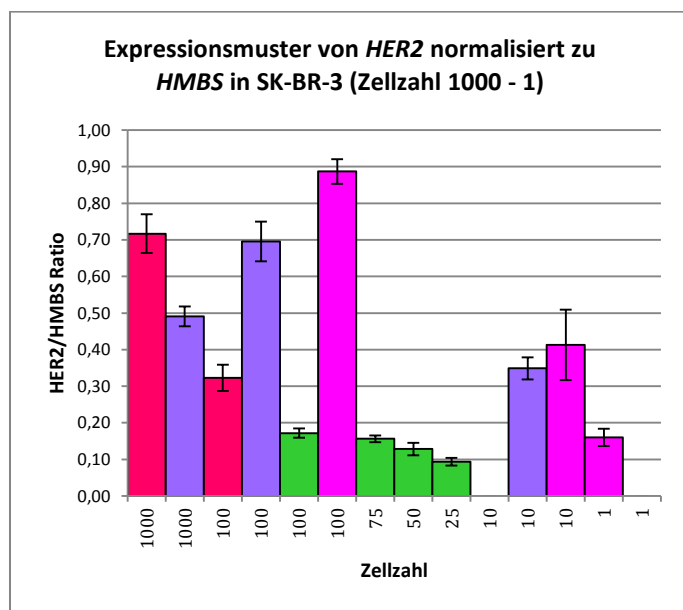


Abbildung 3-16: Expressionsmuster von *HER2* aus unfixierten und präamplifizierten SK-BR-3 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 1000 Zellen bis 1 Zelle. Aufgetragen ist die *HER2/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

Tabelle 3-10: Darstellung der *HER2/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus unfixierten und präamplifizierten SK-BR-3 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 1000 bis 1 Zelle.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 7a.1*1	1000	0,72	5,27%
qPCR 8a.1*1	1000	0,49	2,67%
qPCR 7b.1*1	100	0,32	3,60%
qPCR 8b.1*1	100	0,70	5,42%
qPCR 10a.1*1	100	0,17	1,26%
qPCR 11a.1*1	100	0,89	3,40%
qPCR 10b.1*1	75	0,16	0,93%
qPCR 10c.1*1	50	0,13	1,74%
qPCR 10d.1*1	25	0,09	1,08%
qPCR 7c.1*1	10	n.d.	-
qPCR 8c.1*1	10	0,35	3,03%
qPCR 11b.1*1	10	0,41	9,61%
qPCR 11c.1*1	1	0,16	2,37%
qPCR 11d.1*1	1	n.d.	-

3.3 Etablierung des Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptortyp C (*PTPRC*) Markersystems

3.3.1 Verdünnungsreihen der Zelllinie U937

Zur Herstellung von Verdünnungsreihen aus der hämatopoietischen Zelllinie U937 wurde die RNA aus $3,28 \times 10^7$ Zellen isoliert und die RNA-Konzentration sowie ihre Qualität am Nanodrop gemessen. Die OD 260/280 Ratio betrug 1,8 und die OD 260/230 Ratio 2,27.

3.3.1.1 Standardverdünnungsreihen der Zelllinie U937 von 7143 pg – 3,5 pg pro well

Wie bei den Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 wurde auch bei der U937 Linie in Standardverdünnungsreihen von 7143 pg bis 3,5 pg pro well *HMBS* als Housekeeping-Gen getestet. Während in den MCF-7 Zellen bei 7143 pg/well bereits im 24. Zyklus der real-time PCR Signale für *HMBS* registriert werden konnten, erfolgte dies in den U937 Zellen erst im 29. Zyklus (vgl. hierzu Abbildung 3-1 und Abbildung 6-13, Anhang). Bei den Standardverdünnungsreihen der Zelllinie U937 fiel bereits bei 446,43 pg/well die Detektion einzelner Signale für *HMBS* aus (Tabelle 6-15, Anhang). Die Verdünnungsreihen waren unzureichend linear mit Regressionskoeffizienten von 0,9341 und 0,9146 (Abbildung 6-13, Anhang). Die PCR-Effizienzen waren mit 2,43 und 2,47 deutlich überschätzt (Tabelle 6-16, Anhang). Aufgrund der unzureichenden Sensitivität der *HMBS* Genexpression in Zellen der U937 Linie fiel die Entscheidung auf die Verwendung eines anderen Housekeeping-Gens. Es erfolgte die Etablierung des *PTPRC* Markersystems unter Verwendung des Housekeeping-Gens *GUSB*.

3. Ergebnisse

Die Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 waren sehr linear mit Regressionskoeffizienten von 0,9968 und 0,9967 für *GUSB* (Abbildung 3-17) und 0,9987 und 0,9967 für *PTPRC* (Abbildung 3-18). Die real-time PCR ergab für *GUSB* einen Effizienz-Mittelwert von 2,00 mit einer Standardabweichung von nur 1,10% (Tabelle 3-11). Für *PTPRC* betrug die mittlere Effizienz 1,96 mit einer Abweichung von 5,56%.

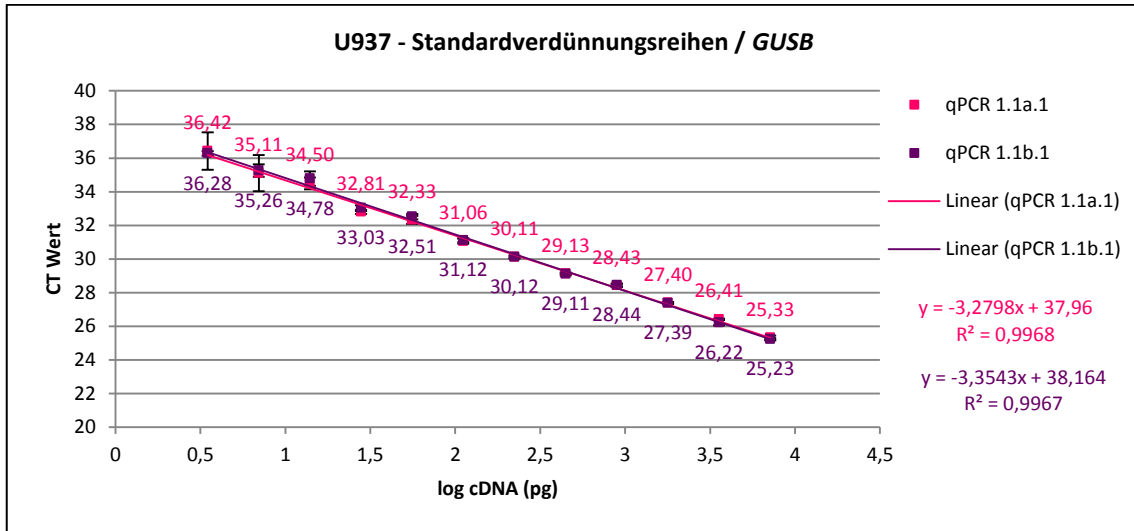


Abbildung 3-17: Expressionsmuster von *GUSB* anhand der Standardverdünnungsreihen aus der U937 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (pg). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

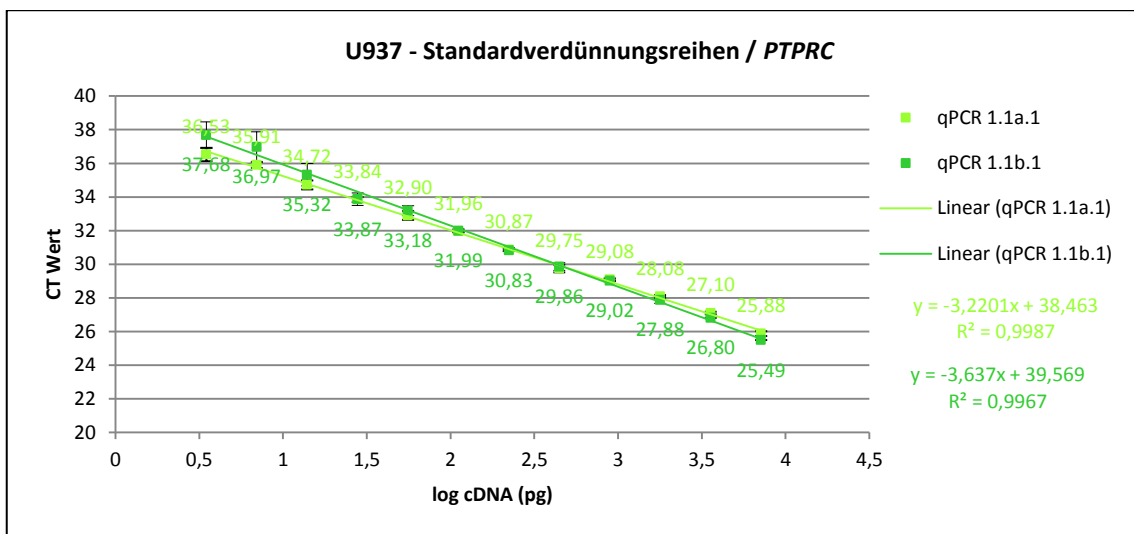


Abbildung 3-18: Expressionsmuster von *PTPRC* anhand der Standardverdünnungsreihen aus der U937 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (pg). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

3. Ergebnisse

Tabelle 3-11: Real-time PCR Effizienzen der Standardverdunnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der Zelllinie U937 für die Marker *GUSB* und *PTPRC*. Aufgeführt sind die aus den jeweiligen Standardverdunnungsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

U937	<i>GUSB</i>		<i>PTPRC</i>	
	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1
Steigung	-3,2798	-3,3543	-3,2351	-3,637
Steigung-Varianz (MW)	-3,31705		-3,43605	
Steigung-Varianz (STABW)	0,052679455		0,284186215	
Abweichung der Steigung in %	1,59%		8,27%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	2,01788606	1,986665706	2,03755554	1,883440407
Effizienz-Varianz (MW)	2,002275883		1,960497973	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,022076124		0,108975856	
Abweichung der Effizienz in %	1,10%		5,56%	

In der Analyse der $2^{-\Delta CT}$ -Werte zeigten sich sowohl für *GUSB* als auch für *PTPRC* ab 13,95 pg/well eine Abweichungen von über 20% zu den erwartenden Werten (Tabelle 6-17, Anhang). Die Abweichungen des Mittelwertes der $2^{-\Delta CT}$ beider Läufe waren für *GUSB* durchgehend unter 20%, während sich für *PTPRC* bereits ab 55,80 pg/well teilweise Abweichungen über 30% zeigten.

Die *PTPRC/GUSB* Ratio betrug durchschnittlich 0,64 mit 30-prozentigen Abweichungsgrenzen von 0,45 und 0,83 (Tabelle 3-13). Es ergaben sich bis zu 27,90 pg/well konstante Expressionswerte ohne größere Abweichungen (siehe Tabelle 3-12 und Abbildung 3-19). Umgerechnet würde dies einer Anzahl von 93 Zellen vor Beginn der Zellverarbeitungsprozesse entsprechen. Intra-Assay Varianzen von > 20% zeigten sich ab 27,90 pg/well. Inter-Assay Varianzen über 30% errechneten sich ab 6,98 pg/well.

Tabelle 3-12: Darstellung der aus den Standardverdunnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der U937 Zelllinie errechneten *PTPRC/GUSB*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für beide Läufe sowie als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1) und Darstellung von Intra- und Inter-Assay Varianzen. Abweichungen der normalisierten Werte ($2^{-\Delta CT}$) von über 30% vom Mittelwert der Verdunnungsschritte 1-7 sind rot markiert. Intra-Assay Varianzen über 20% und Inter-Assay Varianzen über 30% sind gelb markiert.

U937		<i>PTPRC/GUSB</i>					
		qPCR 1.1a.1		qPCR 1.1b.1		beide Läufe	
cDNA in pg/well	≅ Zellzahl am Draht	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$ - MW	Inter-AV
7142,86	23810	0,68	9,33%	0,82	2,82%	0,75	12,71%
3571,43	11905	0,62	4,17%	0,67	7,80%	0,64	5,06%
1785,71	5952	0,62	4,29%	0,71	10,36%	0,67	9,62%
892,86	2976	0,64	4,79%	0,67	5,70%	0,65	3,76%
446,43	1488	0,65	11,41%	0,60	11,87%	0,62	5,88%
223,21	744	0,59	4,70%	0,61	5,11%	0,60	2,45%
111,61	372	0,53	8,00%	0,54	7,68%	0,54	1,47%
55,80	186	0,67	16,68%	0,63	16,80%	0,65	4,74%
27,90	93	0,49	9,60%	0,56	20,06%	0,52	9,14%
13,95	47	0,86	21,96%	0,69	39,04%	0,77	15,62%
6,98	23	0,57	53,17%	0,31	47,93%	0,44	42,88%
3,49	12	0,93	57,91%	0,38	38,83%	0,65	59,39%

3. Ergebnisse

Tabelle 3-13: Darstellung des aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der U937 Zelllinie errechneten normalisierten Mittelwertes ($2^{-\Delta CT}$) inklusive Abweichung von 30% und dem sich daraus ergebenden minimalen und maximalen normalisierten Grenzwert.

MW über Verdünnungen 1-7	30% Abweichung	Min Limit	Max Limit
0,64	0,191906724	0,45	0,83

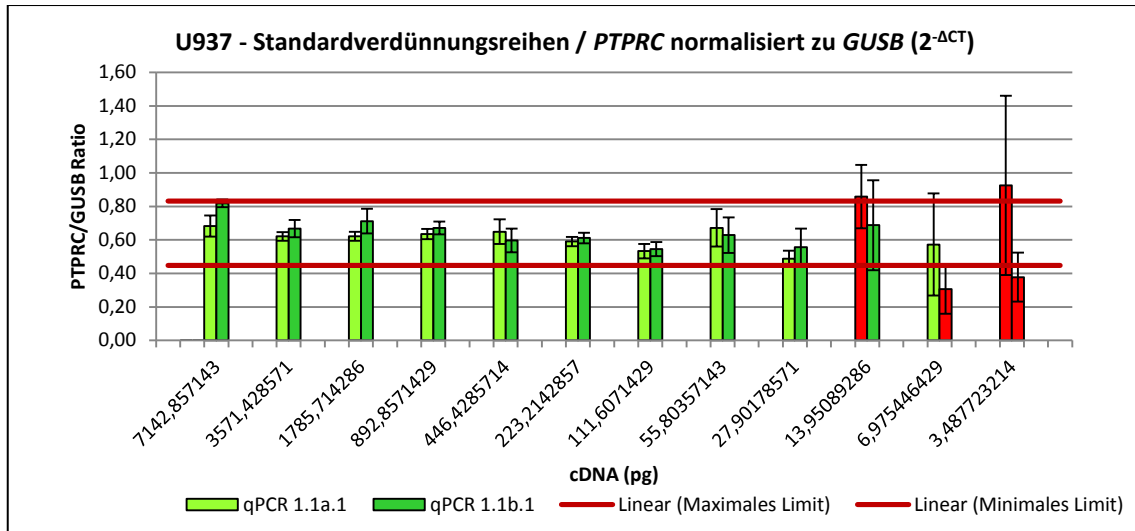


Abbildung 3-19: Expressionsmuster von *PTPRC* der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, normalisiert zum Housekeeping-Gen *GUSB* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *PTPRC/GUSB*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (U937, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Für die Berechnung der Ratio ($2^{-\Delta CT}$) wurden die jeweils aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte aus den Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 verwendet. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen. Normalisierte Werte, die sich außerhalb dieser Grenzen befinden, sind rot markiert.

3.3.1.2 Präamplifizierte Verdünnungsreihen der Zelllinie U937 von 7143 pg – 3,5 pg pro well

In den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 zeigten sich bei beiden Markern sehr gute Linearitäten mit Regressionskoeffizienten von 0,9927 und 0,9935 für *GUSB* und 0,9904 und 0,9926 für *PTPRC* (Abbildung 6-14 und Abbildung 6-15, Anhang). Die real-time PCR Effizienz-Mittelwerte lagen für *GUSB* bei 1,94 mit einer Abweichung von nur 0,39% und für *PTPRC* bei 1,92 mit einer Abweichung von 1,31% (Tabelle 6-18, Anhang).

In der Berechnung der $2^{-\Delta CT}$ -Werte waren die Abweichungen zu den technisch durch Verdünnung zu erwartenden Werten für beide Marker in beiden präamplifizierten Verdünnungsreihen in allen Proben unter 20% (Tabelle 6-19, Anhang). Auch nach Bildung des $2^{-\Delta CT}$ -Mittelwertes aus beiden Läufen lagen bei beiden Markern die Abweichungen aller Proben unter 30%.

Die Expressionswerte aller Verdünnungsstufen (einschließlich 3,49 pg/well) waren mit einer durchschnittlichen *PTPRC/GUSB* Ratio von 0,60 konstant (Abbildung 3-20 sowie Tabelle 6-20, Anhang). Intra- und Inter-Assay-Varianzen waren durchgehend unter 20% bzw. 30%.

3. Ergebnisse

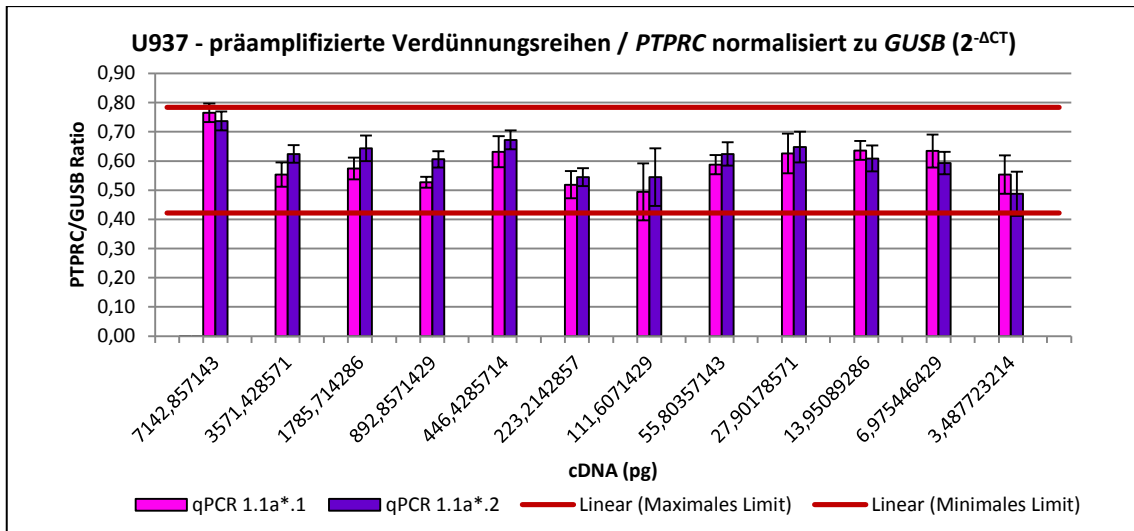


Abbildung 3-20: Expressionsmuster von *PTPRC* der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2, normalisiert zum Housekeeping-Gen *GUSB* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *PTPRC/GUSB*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (U937, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Für die Berechnung der Ratio ($2^{-\Delta CT}$) wurden die jeweils aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 verwendet. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen. Normalisierte Werte, die sich außerhalb dieser Grenzen befinden, sind rot markiert.

Im Vergleich der unamplifizierten Standardverdünnungsreihe mit den präamplifizierten Verdünnungsreihen errechnete sich eine sehr gute Präamplifikationsuniformität mit durchschnittlichen $\Delta\Delta CT$ -Werten von 0,13 in der qPCR 1.1a*.1 und 0,08 in der qPCR 1.1a*.2. Mit sinkender cDNA-Konzentration vergrößerten sich die $\Delta\Delta CT$ -Werte, welche jedoch stets $< \pm 1,5$ blieben (Abbildung 3-21).

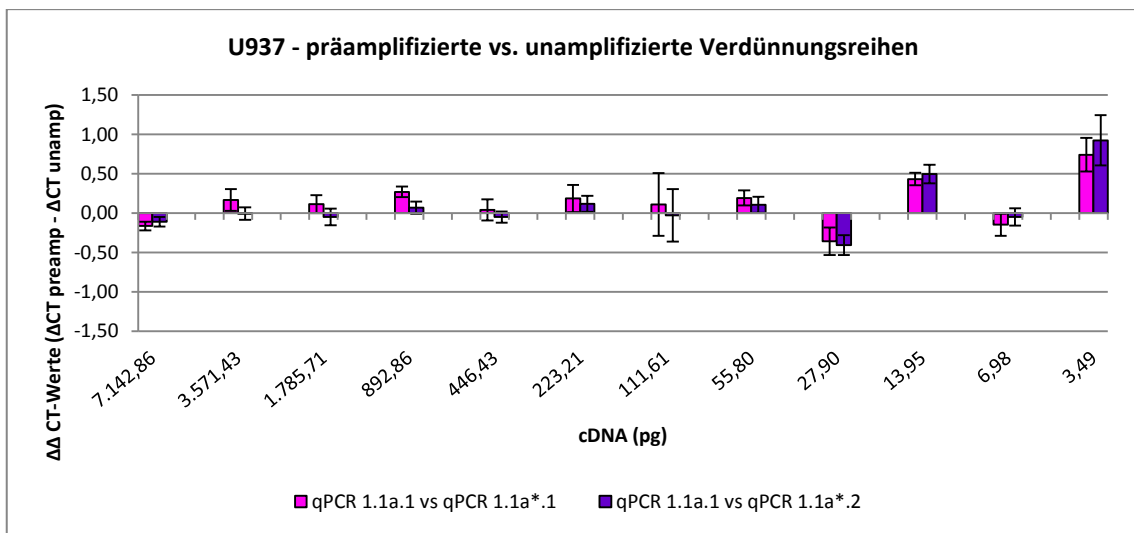


Abbildung 3-21: Präamplifikationsuniformität der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 in Bezug auf die Standardverdünnungsreihe qPCR 1.1a*.1 der U937 Zelllinie. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge (U937, unfixiert). Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well.

3.3.2 Versuche mit unfixierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich

Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der *PTPRC*-Expression in unfixierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich ist in Abbildung 6-16 im Anhang dargestellt. Die CT-Werte aller Versuche mit U937 Zellen (Vorversuche ausgenommen) sind für *GUSB* in Abbildung 6-18 und für *PTPRC* in Abbildung

6-19 dargestellt. Die *PTPRC*-Expressionsbestimmung war in allen Proben mit mindestens 15,6 Zellen möglich. Bei den unfixierten Zellen konnte im Bereich von ≤ 10 Zellen ($\log 0,477121$) aufgrund der mangelnden Detektion von Signalen nur bei wenigen Proben eine *PTPRC/GUSB* Ratio gebildet werden.

3.3.2.1 Unamplifizierte Proben der U937 Zellen (2000 Zellen bis 1 Zelle)

Tabelle 3-14 und Abbildung 3-22 zeigen die *PTPRC*-Expressionsmuster. In der Analyse der von 2000 bis zu 20 Zellen ($n=16$) war die relative *PTPRC*-Expression mit durchschnittlich 0,69 vergleichbar zur mittleren Genexpression der Standardverdünnungsreihen von 0,73 (0,45-0,83). Die Sensitivität war bei 100%, Intra-Assay Varianzen zeigten sich bis 19,69% (qPCR 3e.1.1) und die Inter-Assay Varianz betrug 15%. Im Bereich von 50 bis 10 Zellen ($n=8$) war die mittlere *PTPRC/GUSB* Ratio bei 0,79 mit einer Sensitivität von 88% und einer Inter-Assay Varianz von 34%.

Tabelle 3-14: Darstellung der *PTPRC/GUSB*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus unfixierten und unamplifizierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 2000 Zellen bis 1 Zelle.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 2.1.1	2000	0,78	2,74%	qPCR 3d.1.1	62,5	0,69	17,41%	qPCR 5a.1.1	10	n.d.	-
qPCR 3a.1.1	500	0,83	5,96%	qPCR 3d.1.2	62,5	0,71	17,09%	qPCR 5b.1.1	9	n.d.	-
qPCR 3a.1.2	500	0,79	9,53%	qPCR 4c.1.1	60	0,64	18,25%	qPCR 5c.1.1	8	0,56	-
qPCR 3b.1.1	250	0,79	6,79%	qPCR 4d.1.1	40	0,64	7,72%	qPCR 5d.1.1	7	n.d.	-
qPCR 3b.1.2	250	0,81	5,76%	qPCR 3e.1.1	31,25	0,79	19,69%	qPCR 5e.1.1	6	n.d.	-
qPCR 3c.1.1	125	0,56	13,62%	qPCR 3e.1.2	31,25	0,56	16,21%	qPCR 5f.1.1	5	n.d.	-
qPCR 3c.1.2	125	0,66	8,53%	qPCR 4e.1.1	20	0,60	6,79%	qPCR 5g.1.1	4	0,55	-
qPCR 4a.1.1	100	0,48	6,50%	qPCR 3f.1.1	15,625	1,36	44,68%	qPCR 5h.1.1	3	n.d.	-
qPCR 4b.1.1	80	0,69	8,44%	qPCR 3f.1.2	15,625	0,73	34,34%	qPCR 5i.1.1	2	n.d.	-
				qPCR 4f.1.1	10	0,83	24,38%	qPCR 5j.1.1	1	n.d.	-

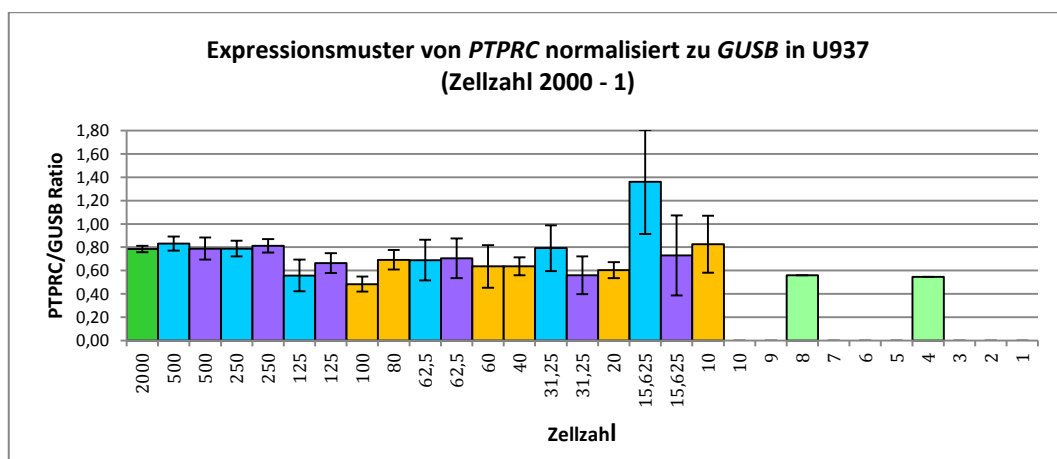


Abbildung 3-22: Expressionsmuster von *PTPRC* aus unfixierten und unamplifizierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *GUSB* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 2000 Zellen bis 1 Zelle. Aufgetragen ist die *PTPRC/GUSB*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

3.3.2.2 Präamplifizierte Proben der U937 Zellen (125 Zellen bis 1 Zelle)

In den präamplifizierten Proben wurden die Fluoreszenzsignale für *GUSB* um durchschnittlich 5,31 Zyklen und für *PTPRC* um durchschnittlich 6,16 Zyklen eher detektiert (vgl. dazu Abbildung 6-18 und Abbildung 6-19 im Anhang).

In den Proben mit 500 bis 31,25 Zellen lag der durchschnittliche $\Delta\Delta CT$ -Wert bei -0,84. In 14 von insgesamt 18 Proben (78%) konnte eine gute Präamplifikationsuniformität erzielt werden (Abbildung

3. Ergebnisse

3-23). Die qPCR 3c.1*¹ mit 125 Zellen, qPCR 3f.1*¹⁺² mit je 15,625 Zellen und der qPCR 7b.1*¹ mit 250 Zellen zeigten mit $\Delta\Delta CT$ -Werten $> -1,5$ eine unzureichende Präamplifikationsuniformität.

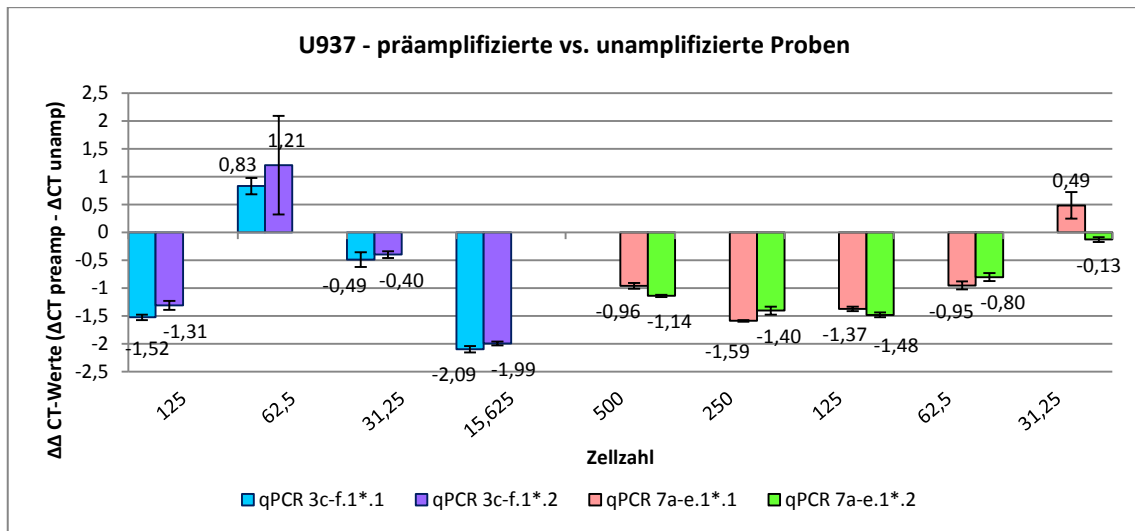


Abbildung 3-23: Präamplifikationsuniformität der qPCR 3c-f.1(*)¹, qPCR 3c-f.1(*)², qPCR 7a-e.1(*)¹ und qPCR 7a-e.1(*)² der U937 Zelllinie. Aufgetragen sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl. Range: 500 bis 31,25 Zellen.

Es zeigte sich eine durchgehend stabile und konstante *PTPRC*-Expression in den präamplifizierten Verdünnungsreihen. In den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich (125 bis 15,6 Zellen, n=8) konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden (Tabelle 3-15, Abbildung 3-24). Die durchschnittliche *PTPRC*/*GUSB* Ratio betrug 1,44 mit hohen Inter-Assay Varianzen von 79%. Auch die Intra-Assay Varianzen waren mit bis zu 56% (qPCR 3f.1*¹) im Vergleich zu den unamplifizierten Proben deutlich erhöht.

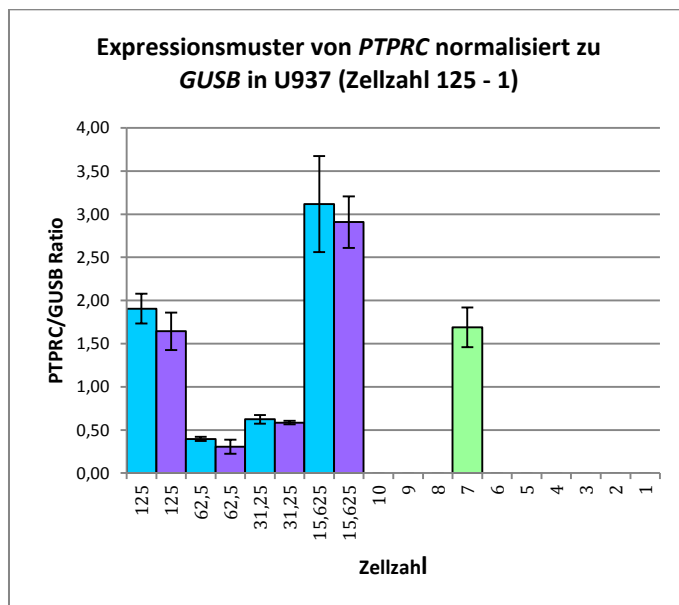


Abbildung 3-24: Expressionsmuster von *PTPRC* aus unfixierten und präamplifizierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *GUSB* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 125 Zellen bis 1 Zelle. Aufgetragen ist die *PTPRC*/*GUSB*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

Tabelle 3-15: Darstellung der *PTPRC*/*GUSB*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus unfixierten und präamplifizierten U937 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 100 bis 1 Zelle.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 3c.1* ¹	125	1,91	17,29%
qPCR 3c.1* ²	125	1,64	21,65%
qPCR 3d.1* ¹	62,5	0,40	2,33%
qPCR 3d.1* ²	62,5	0,30	8,22%
qPCR 3e.1* ¹	31,25	0,62	5,18%
qPCR 3e.1* ²	31,25	0,59	2,09%
qPCR 3f.1* ¹	15,625	3,12	55,60%
qPCR 3f.1* ²	15,625	2,91	29,95%
qPCR 5a.1* ¹	10	n.d.	-
qPCR 5b.1* ¹	9	n.d.	-
qPCR 5c.1* ¹	8	n.d.	-
qPCR 5d.1* ¹	7	1,69	23,03%
qPCR 5e.1* ¹	6	n.d.	-
qPCR 5f.1* ¹	5	n.d.	-
qPCR 5g.1* ¹	4	n.d.	-
qPCR 5h.1* ¹	3	n.d.	-
qPCR 5i.1* ¹	2	n.d.	-
qPCR 5j.1* ¹	1	n.d.	-

3.4 Versuche mit fixierten Zellen

3.4.1 Vergleich der Fixierungsmethoden in Vorversuchen

In Vorversuchen konnten bei PFA-fixierten Zellen im niedrigen Zellzahlbereich meist keine Signale in der real-time PCR detektiert werden. Daher erfolgte ein direkter Vergleich der PCR-Ergebnisse von 100 PFA-fixierten Zellen mit 100 Aceton-fixierten Zellen. Hierzu wurden an drei verschiedenen Tagen jeweils zweimal 100 MCF-7 Zellen bereitgestellt und jeweils einmal mit PFA bzw. Aceton fixiert. Es zeigte sich, dass bei allen 3 unabhängigen Läufen mit PFA-fixierten Zellen für *HMBS* und *ER* keine Signale detektiert werden konnten, während bei den Aceton-fixierten Zellen für *HMBS* und *ER* CT-Werte zwischen 33 und 37 erfasst wurden (siehe Abbildung 3-25).

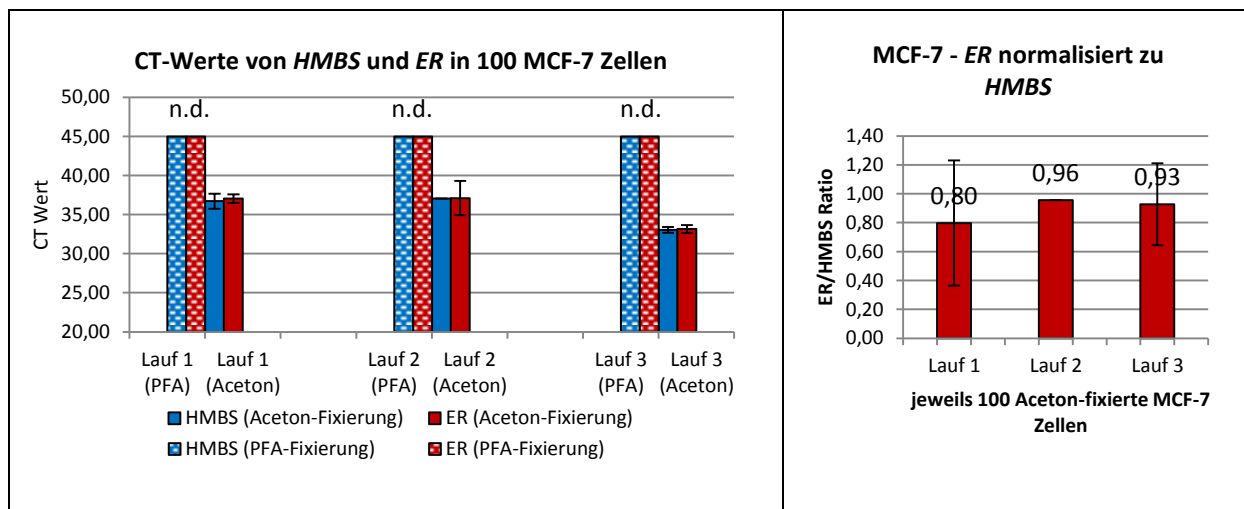


Abbildung 3-25: Vergleich der Expressionsmuster der Marker *HMBS* und *ER* aus RNA-Isolaten von 100 Aceton-fixierten Zellen versus 100 PFA-fixierten Zellen der Linie MCF-7. Anzahl der Läufe: 3, jeweils Triplikate. Aufgetragen sind die respektiven Mittelwerte der CTs mit Standardabweichung. n.d.: nicht detektierbar, da CT > 45 (Ende des Laufes).

Abbildung 3-26: Expression von *ER* aus den je 100 Aceton-fixierten MCF-7 Zellen, normalisiert zu *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). 3 Läufe, jeweils Triplikate. Aufgetragen ist die *ER/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die eingesetzte cDNA-Menge.

Nach Normalisierung des *ER* zum Housekeeping-Gen *HMBS* ergaben sich Werte zwischen 0,8 und 0,96 (Abbildung 3-26). Die Intra-Assay Varianz (zwischen den Triplikaten) betrug im ersten Lauf 54% und im dritten Lauf 31%. Im zweiten Lauf konnte keine Intra-Assay Varianz ermittelt werden, da ein Signal in der real-time PCR nur für eines der Triplikate detektiert wurde. Die Inter-Assay Varianz zwischen den drei Läufen mit Aceton-fixierten MCF-7 Zellen lag bei 9%. Aufgrund der geringeren Detektion von Signalen aus PFA-fixierten Zellen wurde in weiteren Versuchen die Aceton-Fixierung als Standard-Fixierungsmethode gewählt.

3.4.2 ER-Expression in Aceton-fixierten MCF-7 Zellen

Die Versuchsansätze zur Untersuchung von 2000 bis 3,9 Aceton-fixierten MCF-7 Zellen sind in Abbildung 6-4 im Anhang dargestellt. Die mittleren CT-Werte für *ER* und *HMBS* sind in Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 im Anhang dargestellt. Für *ER* und *HMBS* konnten in allen Proben Fluoreszenzsignale in der real-time PCR gemessen werden und somit die relative *ER*-Expression bestimmt werden (Tabelle 3-16 und Abbildung 3-27).

Im Bereich von 2000 bis 3,9 Zellen (n=28) betrug die mittlere *ER/HMBS* Ratio 0,72 mit einer Inter-Assay Varianz von 37%. Die höchste Intra-Assay Varianz zeigte sich bei 100 Zellen (qPCR 14e.1.1) mit

3. Ergebnisse

43,22%. Im Bereich von 2000 bis 40 Zellen (n=18) konnte die Inter-Assay Varianz auf 23% gesenkt werden. Die mittlere *ER/HMBS* Ratio lag hier bei 0,79.

Tabelle 3-16: Darstellung der *ER/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus Aceton-fixierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich. Range: 2000 bis 3,9 Zellen.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 13.1.1	2000	0,76	6,10%	qPCR 14e.1.1	100	0,80	43,22%	qPCR 15c.1.1	31,3	0,19	3,58%
qPCR 14a.1.1	1000	0,65	17,65%	qPCR 16a.1.1	100	0,96	-	qPCR 15c.1*.1	31,3	0,37	4,31%
qPCR 13.1.2a	1000	0,84	1,95%	qPCR 16b.1.1	80	1,29	-	qPCR 16e.1.1	20	0,62	23,25%
qPCR 14b.1.1	750	0,65	13,87%	qPCR 13.1.2e	62,5	0,92	9,59%	qPCR 13.1.2g	15,6	0,99	14,05%
qPCR 14c.1.1	500	0,59	13,00%	qPCR 15b.1.1	62,5	0,77	8,95%	qPCR 15d.1.1	15,6	0,31	19,88%
qPCR 13.1.2b	500	0,74	3,12%	qPCR 15b.1*.1	62,5	0,57	5,20%	qPCR 15d.1*.1	15,6	0,29	10,49%
qPCR 14d.1.1	250	0,54	4,91%	qPCR 16c.1.1	60	0,77	-	qPCR 16f.1.1	10	1,27	38,11%
qPCR 13.1.2c	250	0,80	7,30%	qPCR 16d.1.1	40	0,80	36,43%	qPCR 15e.1.1	7,8	0,44	-
qPCR 13.1.2d	125	1,03	7,32%	qPCR 13.1.2f	31,25	0,85	8,57%	qPCR 15f.1.1	3,9	0,55	22,49%
qPCR 15a.1.1	125	0,82	6,29%								

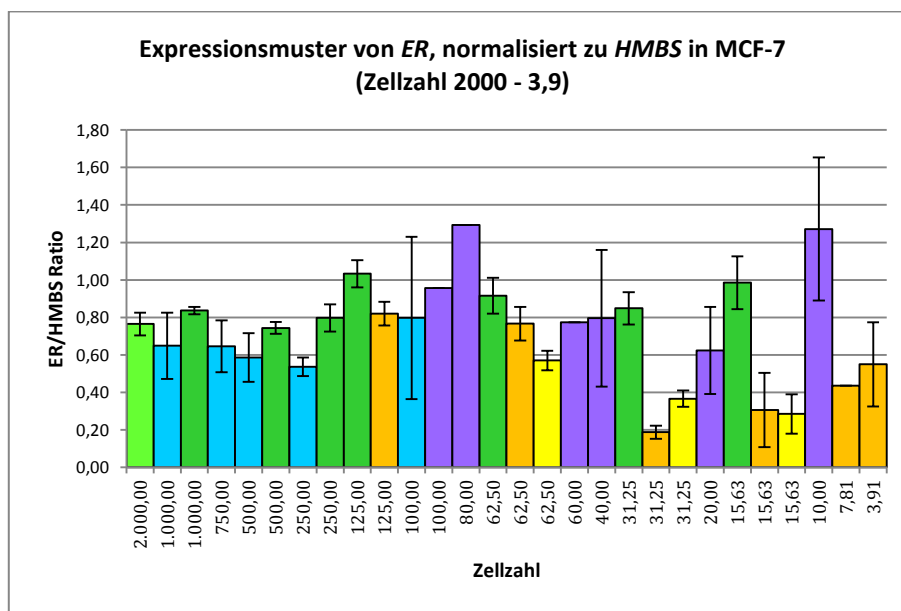


Abbildung 3-27: Expressionsmuster von *ER* aus Aceton-fixierten MCF-7 Zellen im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 2000 Zellen bis 3,9 Zellen. Aufgetragen ist die *ER/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

3.4.3 *HER2*-Expression in Aceton-fixierten SK-BR-3 Zellen

Die Arbeitsschritte zur Untersuchung der *HER2*-Expression in 2000 bis 3,9 Aceton-fixierten SK-BR-3 Zellen sind in Abbildung 6-17 im Anhang nachzuvollziehen. Die aus den Triplikaten errechneten CT-Mittelwerte für *HER2* und *HMBS* sind in Abbildung 6-11 und Abbildung 6-12 im Anhang abgebildet. Ab 100 Zellen ($\log 1,477121$) blieben für beide Marker erstmals Fluoreszenzsignale in der PCR aus. Bei Zellzahlen unter 100 konnte nur vereinzelt die *HER2*-Expression bestimmt werden (Tabelle 3-17 und Abbildung 3-28).

Im Bereich von 2000 bis 100 Zellen (n=13) war die mittlere *HER2/HMBS* Ratio bei 0,53 mit einer Intra-Assay Varianz von 43% und einer Sensitivität von 92%. Es zeigten sich Intra-Assay Varianzen bis 36,25%. (qPCR 14c.1.1.). Im Bereich von 2000 bis 250 Zellen konnte die Inter-Assay Varianz auf 26% gesenkt werden. Hier betrug die mittlere relative *HER2*-Expression 0,61 bei einer Sensitivität von 100%.

3. Ergebnisse

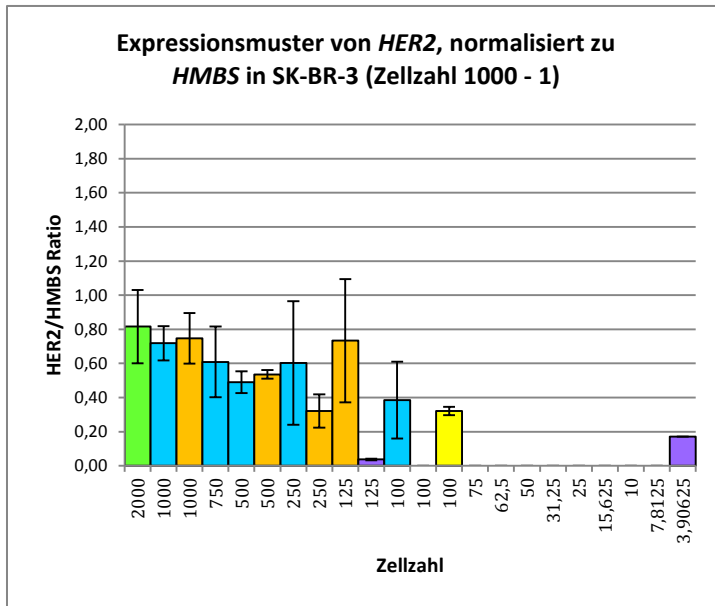


Abbildung 3-28: Expressionsmuster von HER2 aus Aceton-fixierten SK-BR-3 Zellen (unamplifiziert und präamplifiziert) im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen HMBS ($2^{-\Delta CT}$). Range: 2000 bis 3,9 Zellen. Aufgetragen ist die ER/HMBS-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

Tabelle 3-17: Darstellung der ER/HMBS-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus Aceton-fixierten SK-BR-3 Zellen (unamplifiziert und präamplifiziert) im niedrigen Zellkonzentrationsbereich. n.d. = nicht detektiert.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 13.1.1	2000	0,82	21,46%
qPCR 14a.1.1	1000	0,72	10,06%
qPCR 15a.1.1	1000	0,75	14,77%
qPCR 14b.1.1	750	0,61	20,73%
qPCR 14a.1.1	500	0,49	6,39%
qPCR 15b.1.1	500	0,54	2,57%
qPCR 14c.1.1	250	0,60	36,25%
qPCR 15c.1.1	250	0,32	9,73%
qPCR 15d.1.1	125	0,73	36,09%
qPCR 16a.1.1	125	0,04	0,46%
qPCR 14d.1.1	100	0,39	22,45%
qPCR 17.1.1a	100	n.d.	-
qPCR 18a.1*.1	100	0,32	2,46%
qPCR 17.1.1b	75	n.d.	-
qPCR 16b.1.1	62,5	n.d.	-
qPCR 17.1.1c	50	n.d.	-
qPCR 16c.1.1	31,3	n.d.	-
qPCR 17.1.1d	25	n.d.	-
qPCR 16d.1.1	15,6	n.d.	-
qPCR 18b.1*.1	10	n.d.	-
qPCR 16e.1.1	7,8	n.d.	-
qPCR 16f.1.1	3,9	0,17	-

3.4.4 PTPRC-Expression Aceton-fixierten U937 Zellen

Die Arbeitsschritte zur Untersuchung von 2000 bis 10 Aceton-fixierten Zellen der Linie U937 werden in Abbildung 6-17 im Anhang verdeutlicht. In Abbildung 6-18 und Abbildung 6-19 im Anhang sind die mittleren CT-Werte der Marker PTPRC und GUSB dargestellt. Für GUSB blieben erstmals ab 80 Zellen (log 1,380211) Fluoreszenzsignale in der real-time PCR aus und für PTPRC ab 20 Zellen (log 0,778151).

Im Bereich von 2000 bis 40 Zellen der unamplifizierten Proben (n=13) konnte mit einer Sensitivität von 92% und einer Inter-Assay Varianz von 25% eine mittlere PTPRC/GUSB Ratio von 0,6 ermittelt werden. Intra-Assay Varianzen betragen maximal 35,34% (qPCR 8a.1.1). Vergleichbar zu den Ergebnissen aus den unfixierten U937 Zellen fielen auch bei den Aceton-fixierten Zellen ausgeprägte Schwankungen in der PTPRC-Expression zwischen unamplifizierten und präamplifizierten Proben auf (Tabelle 3-18 und Abbildung 3-29).

Tabelle 3-18: Darstellung der PTPRC/GUSB-Ratio ($2^{-\Delta CT}$) mit Intra-Assay Varianzen aus Aceton-fixierten U937 Zellen (unamplifiziert und präamplifiziert) im niedrigen Zellzahlbereich. n.d. = nicht detektiert. Range: 2000 bis 10 Zellen.

PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV	PCR-Lauf	Zellzahl	Ratio	Intra-AV
qPCR 6.1.1	2000	0,61	5,43%	qPCR 7c.1.1	125	0,72	12,21%	qPCR 8c.1.1	60	0,68	25,60%
qPCR 7a.1.1	500	0,71	3,19%	qPCR 7c.1.2	125	0,55	13,33%	qPCR 8d.1.1	40	0,51	26,21%
qPCR 7a.1.2	500	0,76	10,86%	qPCR 7c.1*.1	125	1,41	8,10%	qPCR 7e.1.1	31,25	1,27	55,30%
qPCR 7a.1*.1	500	1,48	11,55%	qPCR 7c.1*.2	125	1,52	9,81%	qPCR 7e.1.2	31,25	1,30	63,02%
qPCR 7a.1*.2	500	1,68	5,83%	qPCR 8a.1.1	100	0,85	35,34%	qPCR 7e.1*.1	31,25	0,92	20,23%
qPCR 7b.1.1	250	0,45	14,10%	qPCR 8b.1.1	80	n.d.	-	qPCR 7e.1*.2	31,25	1,41	8,34%
qPCR 7b.1.2	250	0,45	9,18%	qPCR 7d.1.1	62,5	0,33	9,41%	qPCR 8e.1.1	20	n.d.	-
qPCR 7b.1*.1	250	1,34	2,93%	qPCR 7d.1.2	62,5	0,63	14,50%	qPCR 7f.1.1	15,625	1,79	58,47%
qPCR 7b.1*.2	250	1,18	9,58%	qPCR 7d.1*.1	62,5	1,22	11,06%	qPCR 7f.1.2	15,625	1,66	59,98%
				qPCR 7d.1*.2	62,5	1,10	8,45%	qPCR 8f.1.1	10	n.d.	-

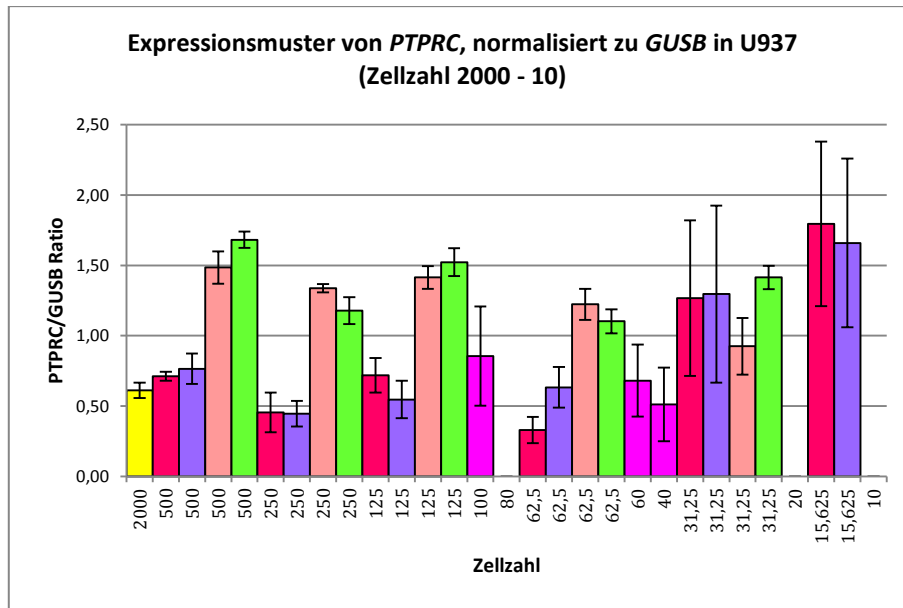


Abbildung 3-29: Expressionsmuster von *PTPRC* aus Aceton-fixierten U937 Zellen (unamplifiziert und präamplifiziert) im niedrigen Zellzahlbereich, normalisiert zum Housekeeping-Gen *GUSB* ($2^{-\Delta CT}$). Range: 2000 bis 10 Zellen. Aufgetragen ist die *PTPRC/GUSB*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl.

3.5 Kontaminations- und Drahtversuche

3.5.1 *ER*-Expression in cDNA-Mischproben aus MCF-7 und U937 Zellen

Die erwarteten und gemessenen CT-Werte für *HMBS*, *ER* und *PTPRC* sind in Abbildung 6-20 im Anhang dargestellt. In den Proben mit lediglich cDNA aus MCF-7 Zellen (ohne cDNA aus Blutzellen) wurde keine *PTPRC*-Expression erwartet und auch nicht detektiert (CT-Wert von $45 \pm$ Ende des real-time PCR Laufes). Dasselbe galt für den Marker *ER* bei 1000 U937-Zellen. Die Expression von *ER* konnte bei jedem Mischungsverhältnis nachgewiesen werden.

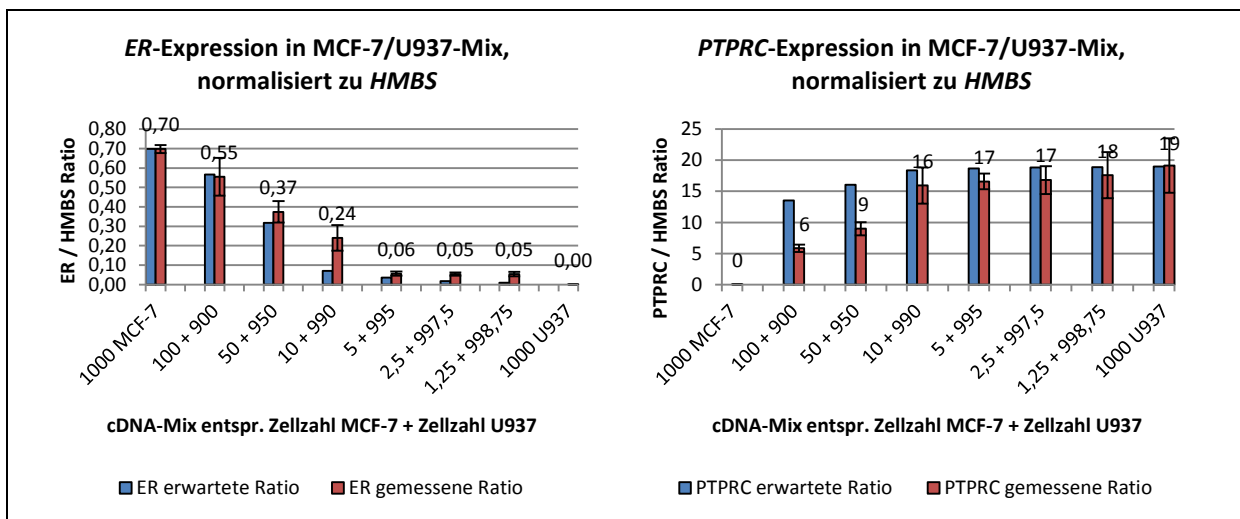


Abbildung 3-30: Expressionsmuster von *ER* und *PTPRC*, jeweils normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS*, aus den durchgeführten Versuchen mit cDNA-Gemischen aus unfixierten Zellen der Linien MCF-7 und U937. Aufgetragen ist die *ER/HMBS*- bzw. *PTPRC/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen das eingesetzte cDNA-Gemisch aus unfixierten Zellen der Linien MCF-7 und U937. Weiterhin sind zum Vergleich die erwarteten *ER/HMBS*- bzw. *PTPRC/HMBS* Ratiowerte abgebildet, welche sich aus den Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der jeweiligen Zelllinien, unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse, ergaben.

3. Ergebnisse

Die *ER/HMBS*-Ratio entsprach bis zum Mischverhältnis von 50 MCF-7 Zellen zu 950 U937 Zellen der erwarteten Ratio (Abbildung 3-30 und Tabelle 6-22, Anhang). In den Proben mit 10 und weniger MCF-7 Zellen war die *ER*-Expression sogar stärker als erwartet. Die *PTPRC/HMBS*-Expression war bis zu einem Anteil von 990 U937 Zellen in den gemischten Proben konstant. Beim Anteil von 950 und 900 Zellen zeigte sich eine leichte Unterexpression von *PTPRC*. Somit zeigte sich, dass die Anwesenheit von cDNA von U937 Zellen in zu untersuchenden Proben mit cDNA aus MCF-7 Zellen keinen Störfaktor bei der Bestimmung der *ER*-Expression darstellt.

3.5.2 *HER2*-Expression in cDNA-Mischproben aus SK-BR-3 und U937 Zellen

Die erwarteten und gemessenen CT-Werte für *HMBS*, *HER2* und *PTPRC* sind in Abbildung 6-21 im Anhang zusammengestellt. Bei 1000 SK-BR-3-Zellen wurde für den Marker *PTPRC* erwartungsgemäß kein Signal registriert, wie auch bei 1000 U937-Zellen für den Marker *HER2*. Die Genexpression von *HER2* konnte in jedem Mischungsverhältnis nachgewiesen werden.

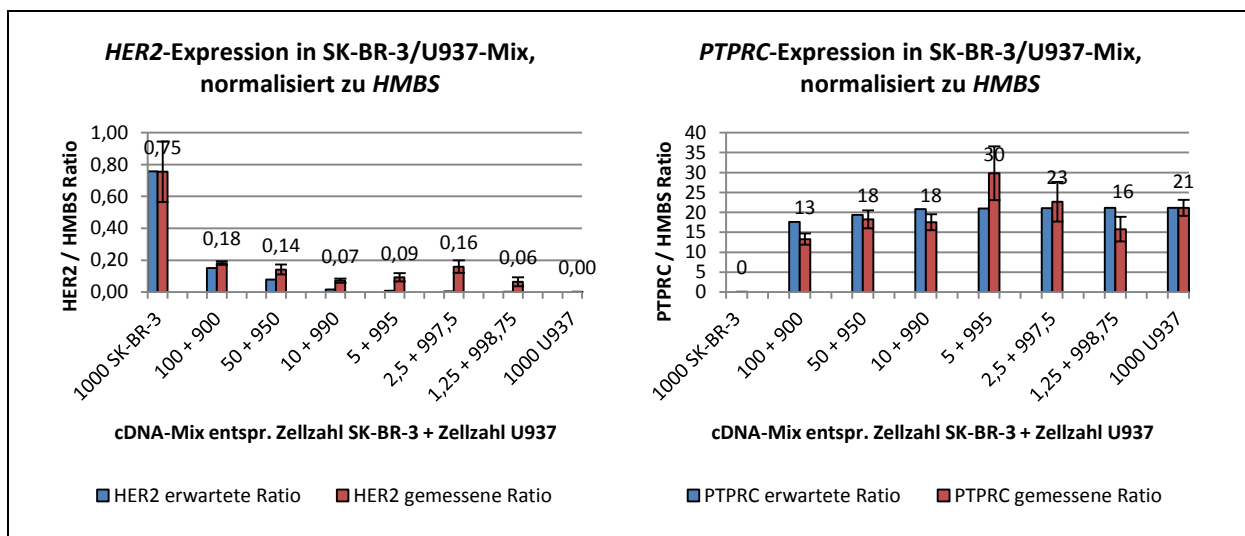


Abbildung 3-31: Expressionsmuster von *HER2* und *PTPRC*, jeweils normalisiert zum HKG *HMBS*, aus den durchgeführten Versuchen mit cDNA-Gemischen aus unfixierten Zellen der Linien SK-BR-3 und U937. Aufgetragen ist die *HER2/HMBS*- bzw. *PTPRC/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen das eingesetzte cDNA-Gemisch aus unfixierten Zellen der Linien SK-BR-3 und U937. Weiterhin sind zum Vergleich die erwarteten *HER2/HMBS*- bzw. *PTPRC/HMBS* Ratiowerte abgebildet, welche sich aus den Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der jeweiligen Zelllinien, unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse, ergaben.

Die normalisierte *HER2/HMBS*-Ratio der Proben bis zu einem cDNA-Anteil von 100 SK-BR-3 Zellen entsprach der erwarteten Ratio. In den Proben mit cDNA-Anteilen von 50 SK-BR-3 Zellen und geringer war die Genexpression von *HER2* trotz steigender cDNA-Konzentration von U937 Zellen sogar stärker als erwartet (Abbildung 3-31 und Tabelle 6-23 im Anhang). Die errechneten normalisierten Werte von *PTPRC* waren überwiegend konstant. Die Anwesenheit von cDNA aus U937 Zellen hatte also keinen hemmenden Einfluss auf die der *HER2*-Expressionsbestimmung.

3.5.3 *HER2*-Expression in Lysaten aus SK-BR-3 Zellen und Drahtstücken

Im Bereich von 100 unfixierten und unamplifizierten SK-BR-3 Zellen war die *HER2*-Expression konstant und zwar sowohl bei den Proben ohne als auch mit Draht (Abbildung 3-32 und Tabelle 6-24 im Anhang). Die Intra-Assay Varianz der qPCR 21a.1.1a (ohne Draht) war mit 24,58% leicht erhöht. Bei den anderen Proben zu 100 unfixierten und unamplifizierten Zellen betrug die Intra- und Inter-

3. Ergebnisse

Assay Varianzen unter 20%. Insgesamt konnten also die Ergebnisse aus den Versuchen ohne Draht in den mit Drahtstücken versetzten Proben ohne Einschränkung reproduziert werden.

Aus den Aceton-fixierten Zellen konnten in der real-time PCR für *HMBS* und *HER2* keine Signale detektiert werden. In den unfixierten präamplifizierten Proben (qPCR 20a-b.1*.1) zeigten sich Ergebniswerte mit einer *HER2/HMBS*-Ratio von $< 0,1$ mit hohen Intra- und Inter-Assay Varianzen. In den Verdünnungstufen entsprechend 25 Zellen, sowie 6,25 und 1,56 Zellen (qPCR 21a-b.1.1b-d) zeigten sich, wie in den Verdünnungsreihen und den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich, ausgeprägte Schwankungen in der relativen *HER2*-Expression. Die Intra- und Inter-Assay Varianzen waren mit wenigen Ausnahmen auf über 20% erhöht. Für die Probe mit 1,56 Zellen mit Draht konnte keine Normalisierung erfolgen, da für das Housekeeping-Gen *HMBS* kein Signal erfasst werden konnte.

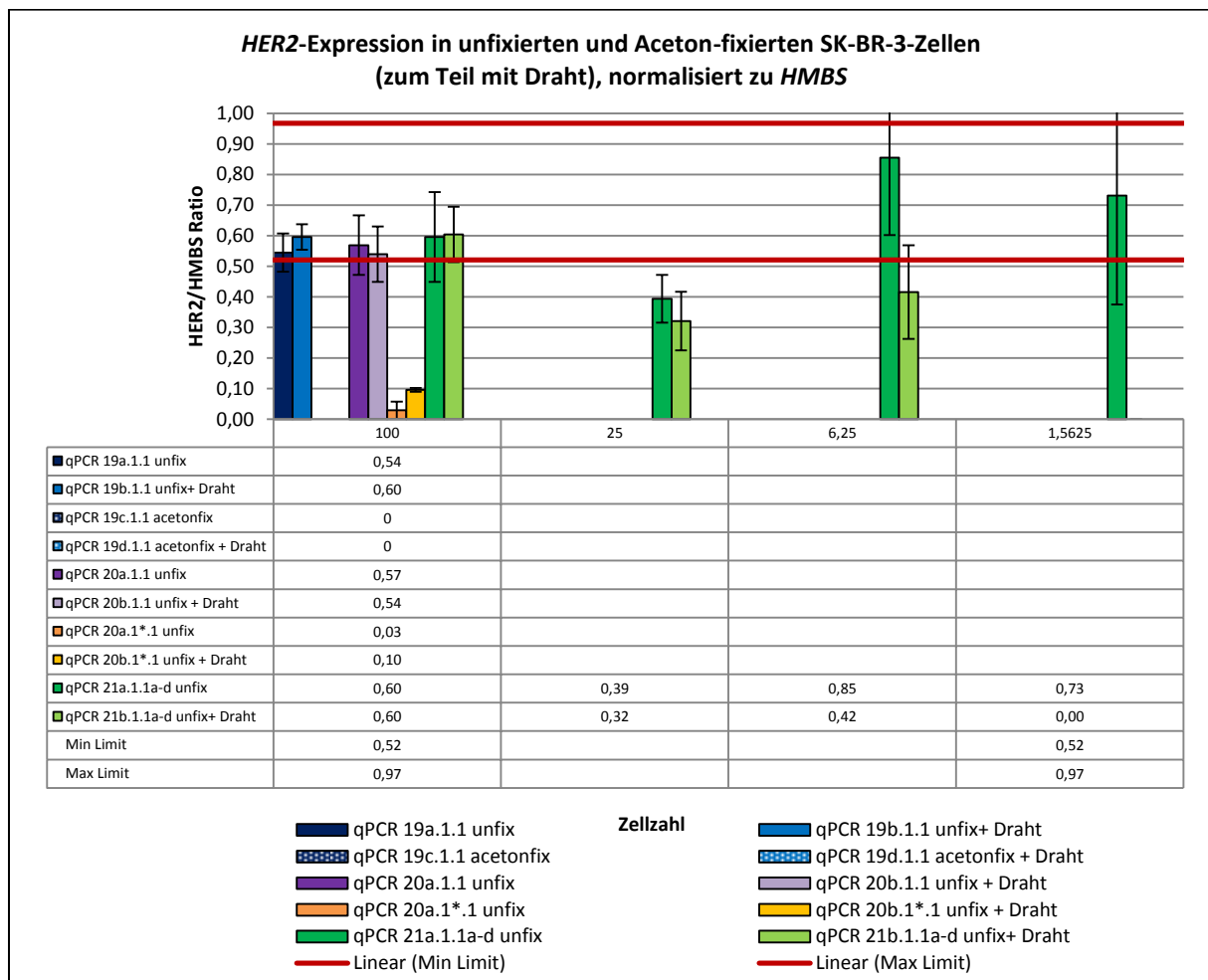


Abbildung 3-32: Expressionsmuster von *HER2* der Läufe qPCR 19-21, normalisiert zum Housekeeping-Gen *HMBS* ($2^{-\Delta CT}$). Aufgetragen ist die *HER2/HMBS*-Ratio (Säulen mit Standardabweichung) gegen die Zellzahl (SK-BR-3, unfixiert und Aceton-fixiert, zum Teil mit Draht). Range: 100 bis 1,56 Zellen. Die 30-prozentigen Abweichungsgrenzen, errechnet aus den Verdünnungsschritten 1-7 der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1, sind im Diagramm in Form von roten Linien aufgetragen.

4 Diskussion

In die Anreicherung und Detektion von CTCs und daraus abgeleitete Erkenntnisse werden hohe klinische Erwartungen gestellt. In den letzten Jahren wurden dazu einige vielversprechende Technologien entwickelt (Alix-Panabières und Pantel 2013). Die Firma Gilupi etwa entwickelte einen funktionalisierten Führungsdraht (FSMW), mit welchem CTCs in vivo angereichert und anschließend immunzytochemisch weiter charakterisiert werden können. Aufgrund der geringen Anzahl an CTCs im Blut von Brustkrebspatientinnen, dürfte indes die Validität der Prognose sehr stark von der Methode abhängen, mit welcher die CTCs angereichert, detektiert und analytisch prozessiert werden (Banys et al. 2013). Die real-time PCR ist ein gängiges Werkzeug zur Quantifizierung der Genexpression und die sensitivste Methode zur mRNA-Quantifizierung aus geringen Mengen von Zellen (Pfaffl 2004). Daher fiel die Entscheidung, diese Methode in der vorliegenden experimentellen Arbeit anzuwenden und Markersysteme auf Genexpressionsebene zu etablieren.

4.1 Diskussion der Methode

Bereitstellung von Zellen

Bereits die Bereitstellung einzelner Zellen zur Bestimmung ihrer Genexpression ist eine Herausforderung. Die zentrale Frage ist hierbei, ob zu Beginn der Versuche tatsächlich eine Zelle bzw. die gewünschte Anzahl an Zellen in der Ausgangsprobe vorhanden ist oder nicht (Reiter et al. 2011). Diese Frage kann nur beantwortet werden, indem man die Ausgangsproben mikroskopisch kontrolliert. In veröffentlichten Einzelzell-Studien werden unterschiedliche Methoden verwendet um Zellen zu „picken“. Je nach experimenteller Fragestellung und Verfügbarkeit entsprechender Geräte im Labor kommen z.B. die Durchflusszytometrie, die Laser-capture und die Laser-Mikrodissektion in Frage. Eine von der Arbeitsgruppe um Bengtsson und Stahlberg (2010) beschriebene Methode ist das „Picken“ von Zellen mittels Glaskapillaren. Dieses Verfahren ist jedoch technisch aufwendig, denn es wird ein Phasenkontrastmikroskop mit hydraulischem Mikromanipulator benötigt, an welchem die Glaspipette befestigt ist (Bengtsson et al. 2005; Bengtsson et al. 2008; Ståhlberg und Bengtsson 2010). Für die Gewinnung einzelner Zellen fiel daher im Rahmen dieser Arbeit die Entscheidung, unter mikroskopischer Sicht einzelne Zellen von einer Petrischale zu pipettieren und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit flachem Grund zu übertragen. Der Erfolg wurde anschließend mikroskopisch kontrolliert.

RNA-Extraktion und Qualitätskontrolle

Würden lediglich Versuche mit einzelnen Zellen durchgeführt, könnte man sich den Arbeitsschritt der RNA-Extraktion und -Aufbereitung sparen, da die Menge an Proteinen, Salzen und Debris so gering ist, dass sie keinen inhibitorischen Effekt auf die reverse Transkription hätten (Bengtsson et al. 2008). Hierbei bestünde jedoch die Gefahr, dass die einzelnen Zellen nicht ausreichend lysiert und die mRNA der reversen Transkriptase nicht vollständig zugänglich gemacht würden (Ståhlberg und Bengtsson 2010). Um ein möglichst standardisiertes Protokoll zur Aufbereitung der Drähte mit einer mutmaßlich variablen Anzahl von anhaftenden CTCs zu entwickeln, wurde auch in unseren Experimenten im niedrigen Zellzahlbereich ein RNA-Extraktionsschritt durchgeführt. Mögliche Verluste an mRNA durch Waschschrte während der RNA-Aufbereitung und Übertragungsverluste durch die zusätzlichen Arbeitsschritte wurden dabei bewusst in Kauf genommen. Um dem Abbau von

niedrigen RNA-Konzentrationen durch RNAsen entgegenzuwirken sollte carrier-RNA zum Zelllysat gegeben werden (Pfaffl und Hageleit 2001). Moret et al. erreichten dadurch in ihren Experimenten eine höhere Konzentration und Reinheit von extrahierter RNA (Moret et al. 2013). Daher entschieden wir uns, die Proben im niedrigen Zellzahlbereich vor dem RNA-Extraktionsschritt ebenfalls mit carrier-RNA zu versetzen. Aufgrund positiver Erfahrungen in Vorversuchen verwendeten wir für die Verdünnungsreihen das RNeasy Mini Kit von Qiagen als RNA-Extraktionskit. Für die RNA-Extraktion aus weniger als 2000 Zellen und aus Aceton-fixierten Zellen bewährte sich in Vorversuchen das Absolutely RNA Nanoprep Kit von Agilent Technologies.

Die Sicherstellung der Reinheit und Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA, welche zur Erstellung der Verdünnungsreihen verwendet wurde, erfolgte am Nano Drop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Die extrahierte RNA aus den Einzelzellversuchen wurde durch den Nanodrop nicht untersucht, da bei Nukleinsäurekonzentrationen von $< 2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ die Absorptionseffekte außerhalb des Messbereichs des Nanodrops liegen und das Ergebnis zudem bei Zusatz von carrier-RNA möglicherweise verfälscht würde (Moret et al. 2013; Thermo Fisher Scientific 2009). Reiter et al. scheiterten aufgrund der geringen RNA-Mengen in einzelnen Zellen auch mit dem 2100 Bioanalyzer System daran, Qualität und Quantität der RNA zu bestimmen. Die optische Qualitätskontrolle der RNA-Integrität durch Beurteilung der Intaktheit der Zelle unter dem Mikroskop ist bei der Untersuchung von geringen Zellzahlen somit das Mittel der Wahl (Reiter et al. 2011).

Reverse Transkription und real-time PCR

Unter Verwendung des sogenannten one-step RT-qPCR Assays besteht die Möglichkeit, die reverse Transkription der mRNA mit anschließender qPCR der cDNA-Produkte in einem gemeinsamen Reaktionsröhrchen durchzuführen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass weniger Pipettierschritte erforderlich werden und dadurch ein geringeres Risiko von Kontamination der Proben und Übertragungsfehlern besteht (Ståhlberg und Bengtsson 2010). Allerdings wurde von vielen Autoren beschrieben, dass sich die optimalen Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription und die qPCR unterscheiden und dass die reverse Transkriptase inhibitorische Effekte auf die PCR-Reaktion haben kann, wodurch Sensitivität, Effizienz und Reproduzierbarkeit der einzelnen Reaktionsschritte reduziert werden (Bengtsson et al. 2008; Chandler et al. 1998; Liss 2002; Sellner et al. 1992; Ståhlberg et al. 2004; Suslov und Steindler 2005; Tichopad et al. 2009). Nach unserer Erkenntnis gab es zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente auch kein Arbeitskit, welches zusätzlich zur one-step RT-qPCR den Präamplifikationsschritt einschloss. Aufgrund dieser Nachteile entschieden wir uns dazu, die reverse Transkription und die qPCR in getrennten Arbeitsschritten durchzuführen, mit der Option der Präamplifikation der transkribierten cDNA. Nach einigen Vorversuchen mit unterschiedlichen Arbeitskits fiel die Wahl für die reverse Transkription auf das AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit von Agilent Technologies und für die real-time PCR auf das Brilliant II qPCR Master Mix Kit von Agilent Technologies mit dem 20X Assay on Demand Primer and Probe Mix von Applied Biosystems / Life Technologies. Zur Verfügung standen uns das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, genannt TaqMan, und die SDS Sequence Detection Software von Applied Biosystems / Life Technologies.

Relative Quantifizierung und Effizienzbestimmung der real-time PCR

Zur relativen mRNA Quantifizierung (Normalisierung der Expressionsergebnisse) von *ER*, *HER2* und *PTPRC* wurde in dieser Arbeit die sogenannte $2^{-\Delta CT}$ -Methode verwendet, bei welcher die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, mutmaßlich nicht reguliertes Housekeeping-Gen bezogen wird (Pfaffl 2004). Innerhalb einer experimentellen Probe betreffen unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT und der real-time PCR sowohl das zu untersuchende Gen als auch das Housekeeping-Gen. Die Varianz in den Genexpressionsergebnissen kann durch Normalisierung reduziert werden (Pfaffl 2001; Pfaffl 2004; Vandesompele et al. 2002), indem die Berechnung nach der $2^{-\Delta CT}$ -Methode erfolgt (Livak und Schmittgen 2001). Die Etablierung der Markerassays erfolgte unter Verwendung der Housekeeping-Gene *HMBS* (für *ER* und *HER2*) und *GUSB* (für *PTPRC*), da sich diese in Vorversuchen als geeignet erwiesen.

Zur Bestimmung der real-time PCR Effizienz wurden im Rahmen dieser Arbeit Standardverdünnungen in 1:2 Schritten erstellt und die gemessenen CT-Werte in einer logarithmischen Funktion gegen die eingesetzte Menge an cDNA (mRNA) dargestellt. Nach Berechnung der Steigung wurde mit der Formel $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ (Meuer S., Wittwer C., Nakagawara KI. 2001; Rasmussen 2001) die real-time PCR Effizienz ermittelt. Setzt man eine exakte Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus, so würde man für die Effizienz zwar einen Wert von 2 errechnen, jedoch dürfte sich in der Realität die PCR Effizienz zwischen 1,7 und 1,9 bewegen (Pfaffl 2004).

Als Ursachen für unterschiedliche real-time PCR Effizienzen kommen mehrere Faktoren in Frage, die jede Phase der PCR (Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer, Elongation) betreffen können. DNA-Einzelstränge sind im Vergleich zu Doppelsträngen gegenüber hydrolytischen Angriffen, Oxidation und Depurinierung viel angreifbarer (Cadet et al. 2002; Hsu et al. 2004; Lindahl und Nyberg 1972, 1974; Pienaar et al. 2006). Ebenso könnten Polymerasen eine thermale Zerstörung erleiden (Booth et al. 2010), was bedeutet, dass während des Denaturierungsschrittes Verluste der Matrizen und Polymerasen auftreten können. Die Effizienz während der Anlagerungsphase ist abhängig von der kompetitiven Bindung der DNA-Einzelstränge und der Primer. Im Normalfall sollten die Primer an DNA-Einzelstränge binden und einen binären Komplex bilden. Es kommt jedoch vor, dass sich Primer zu Primer-Dimeren verbinden, womit sich die Anzahl an verfügbaren Primern zur Ermöglichung der Elongation vermindert. Durch die Verwendung von TaqMan Sonden konnte indes bei den Versuchen dieser Arbeit eine hohe Spezifität der Markerassays erreicht werden. Ein Fluoreszenzsignal kann nur entstehen, wenn die Sonde zwischen den Primern an die DNA im gesuchten Genabschnitt bindet und von der 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten wird. Da eine Bindung von TaqMan Sonden an Primer-Dimere nicht möglich ist, werden durch eine potentielle Dimerisierung von Primern keine falsch positiven Signale erfasst. Unabhängig davon können sich jedoch auch 5'-3' Einzelstränge mit 3'-5' Einzelsträngen zu DNA-Doppelsträngen formieren, wodurch die Verdoppelung der entsprechenden DNA-Stränge im betreffenden Zyklus verhindert wird. In frühen PCR Zyklen ist das Verhältnis von Matrizen zu Primern gering, es steigt jedoch mit jedem Zyklus, da Primer verbraucht werden und sich die Matrizen vermehren. Voraussetzung für die Elongation ist zunächst, dass Polymerasen an einen binären Komplex von DNA-Einzelstrang und Primer binden und einen ternären Komplex bilden. Je früher im Zyklus ternäre Komplexe entstehen, desto wahrscheinlicher ist es, dass die Matrizen von den Polymerasen vollständig abgelesen werden können. Der limitierende Faktor für die erfolgreiche Entstehung einer Kopie der Matrize in voller Länge und somit die Effizienz der Elongation ist also die Elongationszeit (Booth et al. 2010). Es wurde in mehreren Experimenten

beobachtet, dass die PCR Effizienz und somit der Zugewinn an cDNA von Zyklus zu Zyklus variiert und dass sie im Allgemeinen mit Zunahme der Zyklenzahl abnimmt (Kainz 2000; Schnell und Mendoza 1997a, 1997b; Stolovitzky und Cecchi 1996).

Es ist zu beachten, dass man mit der $2^{-\Delta CT}$ -Berechnungsmethode, welche die Steigung der Verdünnungskurven berücksichtigt, meist real-time PCR Effizienz-Werte zwischen 2,0 und 2,2 erhält und die eigentliche real-time PCR Effizienz somit überschätzt. Die Effizienzen von Zielgen und Housekeeping-Gen sollten einander annähernd entsprechen, um falsch positive bzw. negative Ergebnisse wie Über- oder Unterexpression der ursprünglichen mRNA Menge zu vermeiden (Pfaffl 2001).

4.2 Relative Quantifizierung der Genexpression von *ER*, *HER2* und *PTPRC*

4.2.1 Analyse der Versuche mit unamplifizierten cDNA-Proben

a) Verdünnungsreihen

Die durchschnittlichen real-time PCR Effizienzen der Standardverdünnungsreihen (7143 pg – 3,49 pg/well) mit unamplifizierter cDNA aus MCF-7 und U937 Zellen errechneten sich zwischen 1,96 und 2,08 (98 – 104%). Die real-time PCR war hochsensitiv mit wiederholtem Nachweis der Genexpression bis zur niedrigsten Verdünnungsstufe von 3,49 pg/well. Die Kurven zeigten eine hohe Linearität mit Regressionskoeffizienten von $> 0,99$. In Richtung abnehmender cDNA-Konzentration nahmen bei beiden Markern die Unterschiede in den CT-Werten im direkten Vergleich der Verdünnungsreihen miteinander stetig zu. Neben den bereits in Kapitel 4.1 beschriebenen, den PCR-Lauf beeinflussenden Faktoren, lässt sich dieses Phänomen zusätzlich durch Pipettierfehler erklären, welche während der Erstellung der Verdünnungsreihen unterlaufen (Nolan et al. 2006). Je mehr Verdünnungsschritte durchgeführt werden, desto mehr Übertragungsverluste erfährt man, da die zu verdünnende cDNA unter anderem an die Wand der Reaktionsröhrchen und in den Pipettenspitzen adhären kann. In der relativen Quantifizierung waren die *ER*-Expression in MCF-7 Zellen und die *PTPRC*-Expression in U937 Zellen bis 27,9 pg/well wiederholt konstant mit Inter-Assay Varianzen unter 30% bei einer Sensitivität und Spezifität gegenüber Negativkontrollen (NTC, mRNA) von 100%. Bis 55,8 pg/well betrug die Intra-Assay Varianzen unter 20%.

Eine konstante und reproduzierbare relative *HER2*-Expression in SK-BR-3 Zellen mit Inter-Assay Varianzen unter 30% konnte dagegen nur bis 55,8 pg/well gezeigt werden. Intra-Assay Varianzen waren ab 111,61 pg/well meist über 20% und die Nachweisgrenze der Genexpression lag in einem höheren cDNA-Konzentrationsbereich als bei *ER* in MCF-7 Zellen und *PTPRC* in U937 Zellen. In SK-BR-3 Zellen wurden für *HMBS* und *HER2* bereits ab 55,8 pg/well vereinzelt keine Signale mehr in der real-time PCR erfasst. Die ermittelten CT-Werte wichen mit sinkender cDNA-Konzentration zunehmend von der Regressionsgeraden ab (Regressionskoeffizienten 0,96 und $< 0,99$). Nach Rasmussen ergeben sich bei der Wiederholung einer Verdünnungsreihe mit denselben cDNA-Proben erfahrungsgemäß Varianzen von 2-3% in der Steigung und von 10% in den CT-Werten (Abschnitt auf der y-Achse). Dadurch, dass aber bei den durchgeführten Standardverdünnungsreihen die PCR Ergebnisse von unterschiedlichen cDNA Proben (gleicher RNA-Pool) miteinander verglichen wurden, dürften die Varianzen in der Steigung und den CT-Werten etwas höher liegen. Weiterhin wird die Reproduzierbarkeit der Verdünnungsreihen von der Anzahl an Genkopien in der Ausgangsprobe beeinflusst. Je niedriger die Anzahl der Kopien, desto schwieriger ist auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Rasmussen 2001). In dieser Arbeit wurden sehr geringe cDNA-Mengen von bis zu 3,49 pg

in den Standardverdünnungen untersucht. In diesem Fall ist mit stärker voneinander abweichenden Ergebnissen zu rechnen. Somit ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert sowie die Robustheit der Markersysteme geringer.

Die durchschnittlichen real-time PCR Effizienzen der SK-BR-3 Verdünnungsreihen lagen bei 2,13 (106,5%) für *HMBS* und 2,03 (101,5%) für *HER2*. Mit der Effizienz von 2,26 in der qPCR 1.1a.1 und 2,01 in der qPCR 1.1b.1 ergab sich ein Unterschied von 8,24% zwischen beiden Läufen. Bereits geringste Unterschiede in der Amplifikationseffizienz zwischen den Proben können nach Ablauf der PCR-Zyklen zu ausgeprägten Unterschieden in den Ergebnissen führen und zu fehlerhafter Interpretation der Ergebnisse verleiten (Rasmussen 2001). Nimmt man eine PCR-Effizienz von 2 (100%) an, so sollte die Steigung der Regressionsgeraden -3,32 betragen. Unterschiedliche Ergebnisse bei der Berechnung der PCR Effizienzen ergeben sich demnach durch unterschiedliche Steigungen der Geraden. Verbildlicht wird der Effizienz-Unterschied beider *HMBS*-Verdünnungsläufe durch deren Regressionsgeraden, welche miteinander kreuzten, während die Geraden der *HER2* Verdünnungen parallel zueinander verliefen. Die überschätzte Effizienz für *HMBS* im ersten Lauf könnte durch Fehler bei der Erstellung des Master-Mix während der Vorbereitung des PCR-Laufs entstanden sein. Hierbei könnte, im Vergleich zu den anderen Läufen der SK-BR-3 Verdünnungen, eine höhere Konzentration an Primern und Sonden in die zu untersuchenden Proben gelangt sein, wodurch während der real-time PCR womöglich eine höhere Kopienzahl des Housekeeping-Gens *HMBS* resultierte. Die beiden Standardverdünnungsläufe wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, weshalb tagesformabhängige Varianzen des Operators berücksichtigt werden müssen, u.a. Varianzen in den cDNA-Konzentrationen beim Input auf die Reaktionsplatte. Möglich ist jedoch auch, dass die unterschiedlichen Effizienz-Ergebnisse in der Auswahl der DNA-Polymerase begründet liegen. Wolffs et al. untersuchten den Einfluss unterschiedlicher DNA-Polymerasen auf die real-time PCR und stellten fest, dass sich bei der Untersuchung von mehreren Verdünnungsreihen aus denselben Proben, gerade bei der Verwendung von Taq-Polymerasen, deutliche Variationen in den Ergebnissen zeigten (Wolffs et al. 2004).

Ebenso war das *HER2* Markersystem aufgrund erhöhter Intra- und Inter-Assay Varianzen weniger robust als bei den anderen beiden Markern. Eine Erklärung hierfür könnte in der unterschiedlichen Größe der PCR-Produkte von zu untersuchendem Zielgen und Housekeeping-Gen liegen. Die Amplikonlängen von *HMBS* mit 64 und *ER* mit 62 Basenpaaren sowie von *GUSB* und *PTPRC* mit jeweils 81 Basenpaaren sind annähernd bzw. exakt gleich. Die sich deutlich unterscheidenden Amplikonlängen von *HER2* mit 120 Basenpaaren und *HMBS* mit 64 Basenpaaren könnten ein Grund für unterschiedliche Elongationseffizienzen sein und somit zu Varianzen in der Normalisierung der Ergebnisse führen. Diese Vermutung wird gestützt von Erfahrungen der Arbeitsgruppe Markou und Kollegen, welche in der Untersuchung von *HER2* Primern mit unterschiedlicher Amplikonlänge und *HMBS* als Referenzgen feststellten, dass Fluoreszenzsignale in der real-time PCR umso früher registriert wurden, je kleiner das PCR Produkt war (Markou et al. 2011). Weiterhin wäre es möglich, dass sich beim *HER2*-Markerassay im Vergleich zu den *ER*- und *PTPRC*-Markerassays mehr Primer-Dimere bilden und somit mit zunehmender Zyklusanzahl immer geringere Konzentrationen von Primern zur Verfügung stehen um die Elongation zu ermöglichen.

b) Versuche im niedrigen Zellzahlbereich

In Experimenten im niedrigen Zellzahlbereich sollte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Verdünnungsreihen überprüft werden. Hierzu wurden Versuche mit 2000 Zellen in absteigenden

Zellzahlen bis hin zu einer einzigen Zelle konzipiert, um so die Sensitivitätsgrenze der Markerassays zu ermitteln.

Mit einer Sensitivität von über 95% konnte für *ER* in MCF-7 Zellen im Bereich von 2000 bis 25 Zellen und für *PTPRC* in U937 Zellen im Bereich von 2000 bis 20 Zellen eine zu den entsprechenden Standardverdünnungsreihen stabile und konstante Genexpression gezeigt werden, mit Inter-Assay Varianzen von 13% für *ER* und 15% für *PTPRC*. Für den Marker *HER2* in SK-BR-3 Zellen gelang dies im Bereich von 2000 bis 75 Zellen mit einer Sensitivität von 100% und einer Inter-Assay Varianz von 26%. In Proben mit noch niedrigeren Zellzahlen wichen die Ratiowerte bei allen Markern, insbesondere jedoch für *HER2*, zunehmend von den aus den Verdünnungsreihen ermittelten Ratiowerten ab. In Ausgangsproben mit einzeln gepickten Zellen unter 10 konnten für alle 3 Marker nur vereinzelt Fluoreszenzsignale in der real-time PCR detektiert werden. Es ist bekannt, dass Zellen selbst innerhalb einer homogenen Zellkultur einzigartige charakteristische Eigenschaften aufweisen (Bengtsson et al. 2008). Bei der Genexpressionsbestimmung von Einzelzellen auf mRNA Ebene zeigen sich aufgrund der stochastischen Natur der Genexpression zwischen den einzelnen Zellen große Varianzen, und zwar sowohl wenn sie externen Stimuli ausgesetzt werden als auch ohne solche (Blake et al. 2003; Cai et al. 2006; Elowitz et al. 2002; Maheshri und O'Shea 2007; Raj et al. 2006; Ross et al. 1994). Bei den Einflussgrößen, welche zu Varianzen zwischen den Zellen führen können, unterscheidet man zwischen globalen, extrinsischen Faktoren und stochastischen, intrinsischen Ereignissen (Elowitz et al. 2002; Swain et al. 2002). Als globale, extrinsische Faktoren kommen unterschiedliche Zellgrößen in Frage (Raj et al. 2006), welche wiederum zu Fluktuationen der Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II führen können (Becskei et al. 2005; Elowitz et al. 2002). Das Befinden der Zellen in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus wird ebenfalls als möglicher extrinsischer Einflussfaktor diskutiert (Volfson et al. 2006). Nach Raj et al. sind von entscheidender Bedeutung jedoch die intrinsischen, molekularen Ereignisse, welche zufällig auftreten und von extern nicht gesteuert werden können. Diesbezüglich wird in der Literatur von transkriptionellen Impulsen („transcriptional bursts“) berichtet, bei welchen es sich um kurze Zeitabschnitte handelt, in welchen Gene transkriptionell aktiv sind (Raj et al. 2006). Während der restlichen Zeit befinden sich die Gene in einem inaktiven Zustand, in welchem keine Synthese von mRNA Molekülen stattfindet (Chubb et al. 2006; Raj et al. 2006). Raj et al. zeigten in ihrer Studie, dass die transkriptionellen Impulse von intrinsischen, zufälligen genregulatorischen Mechanismen kontrolliert werden, wie etwa über die Konzentration an Aktivatorproteinen und die Anzahl an DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, und dass diese von globalen, extrinsischen Faktoren unabhängig sind. Sie zeigten, dass in Zellen keine kontinuierliche Synthese von mRNA-Molekülen stattfindet und dass somit auch in mutmaßlich homogenen Zellpopulationen eine lognormale Verteilung der Transkripte und deutliche Variationen in der mRNA-Menge pro Zelle auftreten (Raj et al. 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Erfahrungen anderer Forschergruppen, welche feststellten, dass im Rahmen von Experimenten im niedrigen Zellzahlbereich durch die große Variabilität zwischen einzelnen Zellen eine standardisierte Datenanalyse im Sinne einer klassischen Normalisierung des zu untersuchenden Gens auf ein Housekeeping-Gen mit bisherigen Techniken unmöglich ist (Reiter et al. 2011; Ståhlberg und Bengtsson 2010). Nach Ståhlberg und Bengtsson (2010) werden etwa 30 Zellen benötigt um Varianzen von Einzelzellen auszugleichen. Unter Inkaufnahme einer erhöhten Inter-Assay Variabilität in der Genexpressionsbestimmung war die *HER2*-Expressionsbestimmung in SK-BR-3 auch in Zellzahlen unter 75 durchaus möglich.

Im Bereich von 50 bis 10 Zellen gelangen der qualitative Nachweis von *HER2* in SK-BR-3 Zellen mit einer Sensitivität von 73% und der qualitative Nachweis von *ER* in MCF-7 Zellen mit einer Sensitivität von 78%. Auch der Kontaminationsmarker *PTPRC* ließ sich im Bereich von 50 bis 10 Zellen mit einer Sensitivität von 88% qualitativ nachweisen.

4.2.2 Analyse der Versuche mit präamplifizierten cDNA-Proben

Die Hypothese, dass durch Präamplifikation der cDNA-Proben eine präzisere Genexpressionsbestimmung aus geringen Mengen von cDNA möglich ist, konnte in den Versuchen mit präamplifizierten Verdünnungsreihen der Zelllinien U937 und MCF-7 bestätigt werden. Die relative *ER*-Expression war bis zu 13,95 pg/well und die *PTPRC*-Expression bis zu 3,49 pg/well konstant quantifizierbar (vgl. dazu in den unamplifizierten Verdünnungsreihen beide Marker nur bis 27,9 pg/well). Zusätzlich konnte durch Präamplifikation der cDNA Proben insbesondere die Robustheit der Markerassays optimiert werden. Intra- und Inter-Assay Varianzen waren bis zur kleinsten Verdünnungsstufe von 3,49 pg/well unter 20% bzw. 30% (vgl. dazu in den unamplifizierten Verdünnungsreihen bei beiden Markern Intra-Assay Varianzen nur bis 55,8 pg/well unter 20% und Inter-Assay Varianzen nur bis 13,95 pg/well unter 30%).

Bei der Analyse der *HER2*-Genexpression aus den Verdünnungsreihen der SK-BR-3 Zellen konnte die Hypothese, dass durch Präamplifikation der Proben präzisere Ergebnisse erzielt werden können, hingegen nur bedingt bestätigt werden. Durch Präamplifikation der cDNA Proben konnten zwar die Sensitivität der real-time PCR und die Robustheit des Markerassays erhöht werden, jedoch zeigten sich vermehrt Schwankungen in der Genexpression. Eine konstante relative *HER2*-Expression konnte nur bis 223,21 pg/well gezeigt werden (vgl. dazu in den unamplifizierten Verdünnungsreihen bis 55,8 pg/well). Die Intra-Assay Varianzen waren bis 27,9 pg/well unter 20% (vgl. dazu in den unamplifizierten Verdünnungsreihen bis 223,21 pg/well) und die Inter-Assay Varianzen bis 6,98 pg/well unter 30% (vgl. dazu in den unamplifizierten Verdünnungsreihen bis 55,8 pg/well).

Bei 100-prozentiger Präamplifikationseffizienz würde eine Vervielfältigung der cDNA um das 51,2-fache erfolgen, was einer Abnahme der CT-Werte um 5,7 Zyklen im Vergleich zu den entsprechenden unamplifizierten Proben entsprechen würde. Die tatsächliche Abnahme der Zykluszahl lag bei den präamplifizierten Verdünnungsreihen dieser Arbeit bei 5,12 (3,28 bis 6,05), was einer Präamplifikationseffizienz von 90% entspricht. Diese Ergebnisse sind deutlich erfolgreicher als diejenigen von Mengual et al., welche unter Verwendung desselben Präamplifikationskits und Präamplifikationsprotokolls eine durchschnittliche Präamplifikationseffizienz von 79% erzielten (Mengual et al. 2008). Die ermittelte Abnahme der CT-Werte der präamplifizierten im Vergleich zu den unamplifizierten SK-BR-3 Proben wich in den letzten 5 Verdünnungsstufen zunehmend von der erwarteten Abnahme der CT-Werte von 5,7 Zyklen ab. Da die Präamplifikation aus den cDNA Proben der ersten Standardverdünnungsreihe (qPCR 1.1a.1) erfolgte, muss dies als Folgefehler gewertet werden.

Jedoch wurden auch in den Zelllinien MCF-7 und U937, je nach untersuchtem Gen und verwendeten Primern und Sonden, unterschiedliche Präamplifikationseffizienzen ermittelt. In den MCF-7 Zellen zeigte sich für *ER* eine Abnahme der CT-Werte um durchschnittlich 5,53 Zyklen (Präamplifikationseffizienz 97%), in den U937 Zellen für *PTPRC* dagegen nur eine Abnahme um 4,95 Zyklen (Präamplifikationseffizienz 87%). Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch in der Studie von Mengual et al. Eine Erklärung hierfür hatten die Autoren nicht. Sie vermuteten, dass die

Präamplifikationseffizienz von der Menge an Transkripten, der Lokalisation von Primer und Sonden oder der Amplikonlänge und –sequenz beeinflusst werden könnte (Mengual et al. 2008). Würde die Amplikonlänge die Präamplifikationseffizienz jedoch entscheidend beeinflussen, so hätte sich bei den Proben der SK-BR-3 Zellen für *HMBS* mit 64 Basenpaaren eine höhere Effizienz zeigen müssen, als für *HER2* mit 120 Basenpaaren. Mit Präamplifikationseffizienzen von 85% für *HMBS* und 90% für *HER2* war dies in den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch nicht der Fall. Noutsias et al. (2008) konnten diese Hypothese ebenfalls nicht bestätigen.

Es scheint vielmehr, dass durch die in den präamplifizierten Proben bereits zu Beginn der real-time PCR erhöhte Anzahl an Matrizen und deren exponentieller Vervielfältigung deutlich mehr Primer und Nukleotide verbraucht werden als bei den Standardverdünnungsproben und dies die real-time PCR Effizienz limitiert. Gestützt wird diese These durch Erkenntnisse aus anderen Studien, in welchen beobachtet wurde, dass besonders bei hoch exprimierten Genen die Genquantifizierung mit steigender Anzahl der durchgeführten Präamplifikationszyklen zunehmend verfälscht wird und die Präamplifikationseffizienz abnimmt (Korenková et al. 2015; Okino et al. 2016).

Eine weitere Ursache für genspezifische Unterschiede in den Präamplifikationseffizienzen könnte das Multiplexing Verfahren sein, welches beim TaqMan PreAmp Master Mix Kit angewandt wird. Im Gegensatz zum Singleplexing der real-time PCR, bei welchem lediglich der cDNA-Abschnitt eines einzigen bestimmten Gens vervielfältigt wird, können beim Multiplexing Abschnitte vieler unterschiedlicher Gene amplifiziert werden. Vor allem die entstehenden Produkte von reichlich vorhandenen Zielsequenzen häufen sich hierbei an, verbrauchen große Mengen an Reagenzien und kompromittieren somit die Vervielfältigung von geringer exprimierten Genabschnitten. Die entstehenden Produkte können sich gegenseitig behindern und so zu einer erniedrigten Amplifikationseffizienz und somit fehlerhaften Ergebnissen führen (Korenková et al. 2015; Ståhlberg und Kubista 2014). Möglicherweise führen im Multiplexing-Verfahren auch unterschiedliche Primer-Affinitäten zu variablen Präamplifikationseffizienzen (eigene Meinung).

Überdies ist zu berücksichtigen, dass durch die veränderten Pufferverhältnisse, welche durch das Einbringen des Master Mix des TaqMan PreAmp Master Mix Kits erzeugt werden, die PCR beeinflusst werden kann. Die genaue Zusammensetzung des Master Mix hält Applied Biosystems unter Verschluss, sodass an dieser Stelle nur spekuliert werden kann. Bekannt ist, dass Magnesium der zentrale Cofaktor für die DNA-Polymerase ist und somit im Master Mix unbedingt enthalten sein sollte (Reiter und Pfaffl, RT-PCR Optimization Strategies in Kennedy und Oswald 2011). Magnesium als zweivalentes Kation kann jedoch auch als Chelator fungieren, Komplexe bilden und somit mit steigender Konzentration die PCR Effizienz vermindern (Wiedbrauk et al. 1995).

Laut Herstellerangaben werden bei der Verwendung des TaqMan PreAmp Master Mix Kits in 90% der Fälle $\Delta\Delta CT$ Werte zwischen $\pm 1,5$ erreicht. Trotz variabler Abnahme der CT-Werte nach Präamplifikation und daraus errechneten unterschiedlichen Präamplifikationseffizienzen der jeweiligen Gene blieb in den Versuchen mit den Zelllinien MCF-7 und U937 in allen Verdünnungsstufen die relative Genexpression der präamplifizierten Proben proportional zur ursprünglichen Genexpression der unamplifizierten Proben. Bei der SK-BR-3 Linie ergab sich bei den präamplifizierten Proben, wie schon bei den unamplifizierten Proben gezeigt, eine Uniformität bis zu 55,80 pg/well.

Im Vergleich der präamplifizierten mit den unamplifizierten Proben aus den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich konnten die Ergebnisse aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen weitgehend bestätigt werden. Bei den Versuchen mit MCF-7 Zellen konnte eine gleichmäßige Präamplifikation ($\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte zwischen $\pm 1,5$) bei 86% der insgesamt 14 Proben erreicht werden. Bei den SK-BR-3 Zellen ergab sich eine Uniformität in 89% der insgesamt 9 Proben und bei den U937 Zellen in 79% der insgesamt 18 untersuchten Proben. Wie bei den Verdünnungsreihen konnten auch in den Versuchen im niedrigen Zellzahlbereich die Detektionssensitivität verbessert und die Intra-Assay Varianzen deutlich gesenkt werden. Jedoch zeigte sich in den einzelnen Proben, trotz gleichmäßiger Präamplifikation nach der Uniformitätsformel, eine ausgeprägte Heterogenität in der relativen Genexpression. Die Qualität der Berechnungsformel ist daher in Frage zu stellen.

Insgesamt konnte in den Versuchen mit präamplifizierten cDNA-Proben gezeigt werden, dass mit dieser Methode eine um mehr als 5 CT-Werte höhere Sensitivität und eine bessere Robustheit bei der Genexpressionsbestimmung erreicht werden konnte als mit unamplifizierten cDNA-Proben. Gerade bei der Untersuchung von geringen Zellzahlen, wie beispielsweise wenigen am Draht haftenden CTCs, mag dies von entscheidendem Vorteil sein. Durch die Vervielfältigung der cDNA-Menge vor Analyse durch die real-time PCR wird die Untersuchung einer höheren Anzahl an Zielgenen ermöglicht als mit der alleinigen real-time PCR-Methode. So könnten aus einer Probe neben der Genexpression von *ER*, *HER2* und *PTPRC* auch noch andere Marker wie etwa der Progesteronrezeptorstatus u.a. untersucht werden. Für jeden Marker sollte in Vorversuchen jedoch eine gleichmäßige Präamplifikation der cDNA-Proben sichergestellt werden, denn nicht alle kommerziell erhältlichen Genassays scheinen dies zu gewährleisten. Denning et al. stellten fest, dass neben der erfolgreichen Etablierung des Präamplifikationsprozesses unterschiedlichster Marker die erwarteten Uniformitätswerte nach Präamplifikation unter Verwendung des *GAPDH* TaqMan ABI Genassays nicht erreicht werden konnten (Denning et al. 2007). Ebenso ermittelten Noutsias et al. bei der Untersuchung der Genassays HPRT-ABI mit 100 bp und CD56 mit 61 bp (beides TaqMan ABI Genassays) eine erheblich geringere Abnahme der CT-Werte im Vergleich zu anderen Markern (Noutsias et al. 2008). Einen konkreten Grund für die disproportionalen Ergebnisse der Präamplifikation für gewisse Gene konnten die Autoren nicht nennen. Mögliche Ursachen für die Entstehung von fehlerhaften Resultaten wurden bereits oben diskutiert. Um die Erschöpfung von Reagenzien und ein zu dominantes Wachsen der Anzahl an stark exprimierten Zielabschnitten während des Präamplifikationsprozesses zu verhindern, sollte eine nur begrenzte Anzahl an Zyklen durchgeführt werden (Ståhlberg und Kubista 2014). Die benötigte Anzahl an Präamplifikationszyklen hängt von den in den jeweiligen Arbeitsschritten eingesetzten Reaktionsvolumina und Dilutionsfaktoren ab. Berücksichtigt werden muss die Menge an mRNA des Zielgens und des Housekeeping-Gens in der Zelle bzw. der Anteil der Zieltranskripte an der gesamt-RNA, welche durch die RT transkribiert wird, der Anteil an cDNA, welcher präamplifiziert wird und die Fraktion von präamplifizierter cDNA, welche im Anschluss in der real-time PCR untersucht wird (Ståhlberg und Kubista 2014). Wenn geringe Mengen von (präamplifizierter) cDNA auf die real-time PCR Platte pipettiert werden, sollte das Reaktionsvolumen so gering wie möglich gehalten werden (Ståhlberg und Kubista 2014). Aufgrund der bereits im vorhergehenden Kapitel beschriebenen lognormalen Verteilung von Transkripten in Einzelzellen kann es sein, dass selbst in Zellen mit hochexprimierten Genen zu wenig mRNA vorhanden ist, um diese zu isolieren und eine Quantifizierung durchführen zu können. Bei der Untersuchung einzelner Zellen sollte also ein Arbeitsprotokoll erstellt werden, welches Verluste des zu untersuchenden Materials weitgehend minimiert. Ståhlberg und Kubista

empfehlen hierzu auf jegliche Waschschriffe, wie sie beispielsweise bei der RNA-Isolation durchgeführt werden, zu verzichten. Sie empfehlen die direkte reverse Transkription nach Lyse der Zellen ohne vorhergehenden RNA-Aufbereitungsschritt. Hierbei sollte beachtet werden, dass eine hoch effiziente reverse Transkriptase eingesetzt wird, welche durch die direkten Lysereagenzien nicht behindert wird (Stählberg und Kubista 2014). Ebenso sollte gewährleistet sein, dass der daraus entstehende Mix aus cDNA keinen hemmenden Effekt auf den Vorgang der PCR ausübt (Stählberg und Kubista 2014). Ob durch das von Stählberg und Kubista empfohlene Arbeitsprotokoll bessere Ergebnisse in der Genquantifizierung von einzelnen Zellen erzielt werden, sollte in weiteren Arbeiten überprüft werden.

4.2.3 Analyse der Versuche mit fixierten Zellen

Die (immun-)pathologische Analyse von Biopsien erfordert eine Fixierung der Gewebe und Zellverbände (Hostein et al. 2011). Bis heute stellt gepufferte Paraformaldehydlösung die am meisten verwendete Fixationslösung dar, da diese auf verschiedenste Gewebe angewandt werden kann und nach Fixierung mit derselben die meisten erforderlichen Zusatzuntersuchungen durchgeführt werden können (Hostein et al. 2011; Srinivasan et al. 2002). Damit die an dem von der Firma Gilupi entwickeltem Draht haftenden CTCs unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden können, müssen sie am Draht fixiert werden. Hierzu wurde ein Fixierungsprotokoll mit neutral gepuffertem 4-prozentigem Paraformaldehyd entworfen und im Rahmen dieser Arbeit in Experimenten mit jeweils 100 MCF-7 Zellen getestet. Hier stellte sich heraus, dass in der real-time PCR keine Signale für die Marker *HMBS* und *ER* detektiert werden konnten und ihre Genexpressionsbestimmung somit nicht möglich war. Es wird vermutet, dass die RNA durch die Zellfixierung zugrunde geht oder sich die RNA mit Proteinen quervernetzt (sog. cross-links) sowie die chemische Struktur der RNA durch die Fixationslösung so stark verändert wird, dass sich die Menge der extrahierbaren RNA stark vermindert (Masuda et al. 1999). Formaldehyd reagiert mit RNA und bildet Hydroxymethyl-Gruppen sowie über elektrophile Angriffe auch Methylenbrücken (cross-links) zwischen Aminogruppen (Srinivasan et al. 2002). Masuda et al. zeigten, dass bei diesem Vorgang eine Reaktivität der Basen nach der Reihenfolge $A/C \gg G > U$ besteht und somit die tertiäre Aminogruppe am ehesten das primäre Ziel für Angriffe des Formaldehyd ist (Masuda et al. 1999). Da Adenin am empfindlichsten gegenüber elektrophilen Angriffen ist, ist eine starke Modifizierung der Poly-A Schwänze von fixierter mRNA wahrscheinlich (McGhee und Hippel 1977). Dadurch wird die Bindung von oligo (dT) an den Poly-A Schwanz und somit die cDNA Synthese während des reversen Transkriptionsvorgangs behindert (Srinivasan et al. 2002). Ebenso wird laut Srinivasan et al. die RNA durch den Fixierungsvorgang unter Umständen so stark geschädigt, dass im extrahierten Material kein Poly-A Schwanz mehr vorhanden ist und somit keine PCR Amplifikation mehr stattfinden kann.

Durch die Fixierung mit Formaldehydlösung und Paraffineinbettung geht auch die Immunoreaktivität der Oberflächenmarker der meisten Lymphozyten verloren (Sato et al. 1992). Gerade die Oberflächenmarker der Lymphozyten sind jedoch für die Differenzierung der am Draht haftenden Zellen von entscheidender Bedeutung. Sato et al. entwickelten eine neue Fixierungsmethode mit Aceton, gefolgt von Waschschriffen mit Methylbenzoat und Xylen und anschließender Einbettung des Gewebematerials in Paraffin (AMeX-Methode). Hierdurch konnten sie im Vergleich zu den konventionellen Fixierungsmethoden die Immunoreaktivität von labilen Oberflächenmarkern wie den Membranantigenen von Lymphozyten erhalten und eine bessere Korrelation zwischen Zellmorphologie und molekularbiologischen Eigenschaften erreichen. Weiterhin war es ihnen möglich, mit der AMeX-Fixierungsmethode Ergebnisse in der RNA-Analyse zu erzielen, die

vergleichbar waren mit Proben aus frisch gefrorenem Gewebe (Sato et al. 1990; Sato et al. 1991; Sato et al. 1992). Andere Arbeitsgruppen untersuchten die Amplifikation von DNA und RNA durch PCR nach Fixierung mit Substanzen organischen Ursprungs wie Ethanol, Methanol und Aceton und erhielten deutlich bessere Resultate, beispielsweise in der RNA-Integrität, als nach Fixierung mit Formalin (Giannella et al. 1997; Gillespie et al. 2002; Noguchi et al. 1997; Páska et al. 2004). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und beschriebenen Vorteile der Aceton-Fixierung bei der Genexpressionsanalyse auf RNA Ebene wurde für die vorliegende Arbeit ein Aceton-Fixierungsprotokoll entworfen und diese Fixierungsmethode in Versuchen mit den einzelnen Zelllinien getestet. Es ist bekannt, dass durch den dehydrierenden Effekt der Acetonfixierung die Morphologie der Zellen nicht beibehalten wird (Sato et al. 1992). So stellt sich die Frage, inwieweit sich die Dehydrierung der Zellen auf die Quantifizierung der Genexpression auswirkt.

In den Versuchen dieser Arbeit war die relative *ER*-Expression in MCF-7 Zellen und die *PTPRC*-Expression in U937 Zellen im Bereich von 2000 bis 40 Aceton-fixierten Zellen konstant mit Inter-Assay Varianzen unter 30%. Eine konstante *HER2*-Expression in SK-BR-3 Zellen mit Inter-Assay Varianzen unter 30% konnte nur im Bereich von 2000 bis 250 Aceton-fixierten Zellen gezeigt werden. Die Sensitivitätsgrenze der real-time PCR war hier bei 100 Aceton-fixierten Zellen. Die Amplikonlänge (*HMBS* 64 bp, *ER* 62 bp, *HER2* 120 bp, *GUSB* 81 bp, *PTPRC* 81 bp) scheint auch in der Genexpressionsbestimmung aus Aceton-fixierten Zellen eine Rolle zu spielen, denn die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen diesbezüglich mit Erkenntnissen Anderer überein.

Páska et al. untersuchten mittels real-time PCR die Genexpression von *GAPDH* und β -Globulin mit je drei unterschiedlichen Amplikonlängen aus mit Aceton fixiertem Endometriumgewebe. Sie stellten eine umso höhere Sensitivität der PCR fest, je kürzer die Amplikonlänge des zu untersuchenden Gens war. Dagegen konnten sie in der Untersuchung von Amplikons mit einer Länge von 536 Basenpaaren keinerlei Signale mehr detektieren (Páska et al. 2004). Specht et al. berichteten von vergleichbaren Ergebnissen mit ausbleibenden PCR-Produkten bereits ab einer Amplikonlänge von 374 Basenpaaren (Specht et al. 2001). Es wird eine eventuelle Fragmentierung der Amplikons während des Fixierungsprozesses vermutet, wodurch eine geringere Menge an vollständigen RNA-Abschnitten als Ausgangsmaterial zur Verfügung steht und somit eine vollständige Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte erschwert oder sogar unmöglich gemacht wird (Páska et al. 2004). Eine Möglichkeit, diesen limitierenden Faktor zu umgehen, wäre, auf eine Fixierung der am Draht haftenden Zellen und auf deren immunzytochemischer Färbung mit anschließender immunfluoreszenzmikroskopischer Beurteilung zu verzichten. Ein Nachteil wäre hierbei jedoch, dass die exakte Anzahl der am Draht haftenden Zellen dann nicht bestimmt werden könnte. Sinnvoll wäre sicherlich eine weitere Optimierung des Aceton-Fixierungsprotokolls, indem unterschiedliche zu beeinflussende Variablen wie die Konzentration der Fixierlösung, pH, Temperatur, Fixierungszeit und somit Gewebepenetration des Fixierungsmittels in die Zellen auf ihre Auswirkungen bei der Genexpressionsbestimmung detailliert untersucht würden.

4.3 Analyse der Kontaminations- und Drahtversuche

Wang et al. konnten in Blutproben von Brustkrebspatientinnen die Genexpression u.a. von *HER2* und *ER* in CTCs unter Verwendung des CircleGen CTC RT-qDx assays mittels real-time PCR nachweisen. Sie bestimmten die relative mRNA Expression zum Housekeeping-Gen *GAPDH* und legten zur Differenzierung zwischen positivem und negativem Ergebnis für jedes untersuchte Gen einen

individuellen cut-off Wert fest (Wang et al. 2014). Hierbei wurde die *GAPDH*-Expression von kernhaltigen hämatopoetischen Zellen jedoch nicht berücksichtigt und auch kein Blutzell-Marker bestimmt. Dies wäre jedoch zur Differenzierung von Blutzellen und Brustkrebszellen unbedingt erforderlich, um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden. Die Festlegung eines cut-off Wertes zur Definition einer positiven oder negativen relativen Genexpression ohne Berücksichtigung der Genexpression von Blutzellen ist in jedem Fall kritisch zu betrachten. Da nach intravenöser Applikation des Drahtes möglicherweise auch kernhaltige Blutzellen am Draht haften, müssen diese von den CTCs auf molekularbiologischer Ebene unterschieden werden können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die Anwesenheit von Blutzellen bei der Genexpressionsbestimmung von *ER* und *HER2* aus den Brustkrebszelllinien als Störfaktor erweist. Dazu wurde die *PTPRC*-Expression von der hämatopoetischen Zelllinie U937 bestimmt und *PTPRC* als Marker für die mögliche Kontamination durch Blutzellen am Draht etabliert. In Kontaminationsversuchen wurden jeweils die cDNA von SK-BR-3 und MCF-7 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen mit cDNA von U937 Zellen vermengt und die Genexpression bestimmt. Vergleichbar zu den Ergebnissen aus den Versuchen mit unfixierten Zellen war die *ER*-Expression bis zum Mischverhältnis von entsprechend 50 MCF-7 Zellen zu 950 U937 Zellen konstant. Ebenso war die *HER2*-Expression erwartungsgemäß bis zum Mischverhältnis von 100 SK-BR-3 Zellen zu 990 U937 Zellen konstant. Je geringer der Anteil an cDNA aus den Brustkrebszelllinien in den cDNA-Mischproben war, desto stärker war sogar die gegen das Housekeeping-Gen *HMBS* normalisierte Expression des zu untersuchenden Brustkrebsgens (zum Teil um mehr als 30% stärker im Vergleich zu den erwarteten Expressionswerten mit cDNA aus 100% Brustkrebszelllinie). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass mit absteigender cDNA-Konzentration des zu untersuchenden Brustkrebsgens die pro Zyklus zu Verfügung stehende Anzahl an Primern für das zu untersuchende Brustkrebsgen höher ist als für das Housekeeping-Gen *HMBS*. Die Anzahl der Primer für *HMBS* nimmt pro PCR-Zyklus stärker ab als die der Brustkrebsgene, da die *HMBS*-Primer auch für die Amplifikation der cDNA der U937 Zellen verbraucht werden, während die Primer für *ER* und *HER2* lediglich für die Amplifikation der zu untersuchenden Brustkrebsgene verbraucht werden. Die relative Genexpression von *ER* und *HER2* wird in Anwesenheit von cDNA aus U937 also eher überschätzt, jedoch konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Detektionssensitivität für *ER* und *HER2* durch das Vorhandensein von cDNA aus Blutzellen nicht abnimmt.

Die Arbeitsgruppe um Saucedo-Zeni et al. testete die Biokompatibilität des von der Firma Gilupi entwickelten funktionalisierten Drahtes (FSMW), basierend auf den Anforderungen für ein Klasse IIa Medizingerät gemäß ISO-Richtlinien (Saucedo-Zeni et al. 2012). Sie zeigten in in-vitro Experimenten, dass der Draht keine zytotoxischen Effekte aufwies. Desweiteren wurden in Tierversuchen mit Mäusen keine akuten systemischen Toxizitätsreaktionen festgestellt und in Hämokompatibilitätstests ergaben sich auch keine Hinweise auf hämolytische Effekte durch den Draht (Saucedo-Zeni et al. 2012). Von der Firma Gilupi wurden uns freundlicherweise Forschungs- und Entwicklungs-Drähte zur Verfügung gestellt, mit welchen mögliche Einflüsse auf die Bestimmung der Genexpression mittels real-time PCR untersucht werden konnten. Hierzu wurden in drei unabhängigen Experimenten Zelllysate aus jeweils 100 SK-BR-3 Zellen, einmal mit und einmal ohne Zusatz von unbehandeltem, zerstückeltem Draht aufbereitet und im direkten Vergleich die Genexpression von *HER2* bestimmt. Im Bereich von 100 unfixierten und unamplifizierten SK-BR-3 Zellen konnte festgestellt werden, dass der Zusatz des Drahtes zu keiner signifikanten Veränderung der Genexpression von *HER2* führte.

4.4 Klinischer Bezug und Ausblick

Die bisher in der Literatur beschriebenen Anreicherungs- und Detektionsmethoden für CTCs machen sich die physikalischen oder biologischen Eigenschaften der Zellen oder die Kombination aus beidem zu Nutze. Nicht nur die geringe Anzahl an vorhandenen CTCs im Blut, sondern auch epitheliale-mesenchymale Transitions-spezifische Differenzierungsvorgänge (EMT) in CTCs stellen die Forschungsgruppen vor große Hürden. Thurm et al. vermuten, dass CTCs im Verlauf der Erkrankung ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und somit durch herkömmliche epitheliale Anreicherungsverfahren nicht mehr identifiziert werden können (Thurm et al. 2003). Es wurde angenommen, dass CTCs größer und weniger deformierbar seien als Blutzellen, woraufhin Technologien wie ISET, 3D-Filter, Biochip u.a. entwickelt wurden, welche CTCs, basierend auf Filtermethoden, nach ihrer Größe anreicherten (Hofman et al. 2014; Parkinson et al. 2012; Tan et al. 2010; Zheng et al. 2011). CTCs könnten sich aber während der EMT in ihrer Form verändern und somit wie Leukozyten der Anreicherung entgehen (Alix-Panabières und Pantel 2014). Unter Verwendung des CellSearch Systems und anderer Methoden konnten bereits CTCs unterschiedlichster Größen angereichert werden (Alix-Panabières und Pantel 2014), wodurch deutlich wird, dass die alleinige Anreicherung nach physikalischen Eigenschaften wie der Größe der CTCs nicht ausreichend spezifisch sein kann. Es existieren zahlreiche weitere Technologien auf immunzytologischer Basis, welche eine Anreicherung von CTCs, unabhängig von ihrer Zellgröße, ermöglichen sollen. Mit Methoden wie dem MagSweeper, CTC-Chip („Ephesia“), HB-Chip, Vortex micromixer u.a. werden gegen Zelloberflächenproteine gerichtete Antikörper eingesetzt, um CTCs an Säulen, Mikropfosten oder in magnetischen Feldern anzureichern (Lin et al. 2013; Maheswaran et al. 2008; Nagrath et al. 2007; Powell et al. 2012; Saliba et al. 2010; Stott et al. 2010; Talasz et al. 2009). Ebenso funktioniert das von der Firma Veridex entwickelte CellSearch System über eine immunomagnetische Anreicherung von CTCs. Bisher ist die Anreicherung von CTCs mittels des CellSearch Kits die einzige von der FDA zugelassene Methode. Vielversprechend ist jedoch auch der funktionalisierte Draht (FSMW) der Firma Gilupi. Saucedo-Zeni et al. konnten in ihrer Studie bei 22 von 24 Brustkrebs- bzw NSCLC-Patienten EpCAM positive CTCs mit einem Median von 5,5 (0.50) CTCs bei Brustkrebspatientinnen (n=12) und 16 (2-515) CTCs bei NSCLC-Patienten (n=12) anreichern. Isoliert wurden CTCs in allen Tumorstadien, auch in Frühstadien, in welchen noch keine Fernmetastasen diagnostiziert worden waren. In der gesunden Kontrollgruppe wurden dagegen keine CTCs detektiert. Ein großer Vorteil der Drahtmethode im Vergleich zu den in der Literatur bisher beschriebenen Anreicherungs- und Detektionsmethoden ist das größere Blutvolumen, aus welchem CTCs potentiell gefangen werden. Geringes Untersuchungsmaterial stellt einen limitierenden Faktor bei der Detektion von CTCs dar, vor allem in frühen Tumorstadien, in welchen die Anzahl an CTCs im Blut gering ist (Alix-Panabières und Pantel 2014). Indem der Draht der Firma Gilupi für 30 Minuten in vivo appliziert wird, können während dieser Zeit CTCs aus einem Blutvolumen von 1,5 - 3 Litern angereichert werden, während mit dem CellSearch CTC Kit die immunomagnetische Anreicherung von CTCs aus einem Blutvolumen von nur 7,5 ml erfolgt. Wie bei der CellSearch Methode können auch die am Draht haftenden Zellen mittels immunzytochemischer Färbung für EpCAM oder die Zytokeratine 4, 5, 8, 9 und 18 zusätzlich weiter charakterisiert werden. In ihrer Studie verwendeten Saucedo-Zeni et al. gegen EpCAM gerichtete FITC-konjugierte (fluorescein isothiocyanate) monoklonale Mausantikörper (Acris Antibodies) und gegen CD45 gerichtete Phykoerythrin-konjugierte Kaninchenantikörper (Life Technologies). Nach Counterfärbung mittels DAPI wurden die gefärbten CTCs unter dem Immunfluoreszenzmikroskop beurteilt und

gezählt. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Markersystemen auf mRNA-Ebene mittels real-time PCR, um zukünftig die am Draht haftenden CTCs molekulargenetisch charakterisieren zu können. Hierzu konnte im Bereich von 50 bis 10 unfixierten Zellen die quantitative Genexpression von *ER*, *HER2* und *PTPRC* mit einer Sensitivität von über 70% bestimmt werden. Durch Präamplifikation der cDNA-Proben konnten die Detektionssensitivität weiter erhöht und Intra-Assay Varianzen gesenkt werden, wenn auch vermehrt Schwankungen in der relativen Genexpression auftraten. Damit stellen die etablierten Markerassays ein hochsensitives Verfahren zur quantitativen Analyse der Genexpression von *ER*, *HER2* und *PTPRC* dar, das nunmehr für Forschungen mit am Draht haftenden CTCs zur Verfügung steht. Um das Problem einer auftretenden EMT zu umgehen, müssen zusätzliche mesenchymale Marker identifiziert werden, welche während der EMT auf CTCs überexprimiert werden. Bisher sind als solche beispielsweise bereits N-Cadherin (Membranprotein der Cadherine) und Vimentin (zytoskelettales Protein) bekannt (Armstrong et al. 2011; Ivaska 2011; Nakajima et al. 2004). Bei Verwendung der Drahtmethode zur Charakterisierung von CTCs bestünde die Möglichkeit, das auf der Goldschicht befestigte Hydrogel auch mit anderen Antikörpern, als EpCAM zu bestücken, um somit auch Zellen mit nicht epithelialen Charakteristiken einzufangen. Möchte man die am Draht haftenden CTCs vor der molekulargenetischen Charakterisierung mittels real-time PCR zusätzlich unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilen, so wäre eine Optimierung des Aceton-Fixierungsprotokolls sicherlich sinnvoll, da die Nachweisgrenze für *HER2* bei 100 Acetonfixierten Zellen lag. Ob durch die Draht-Methode, im Vergleich zum CellSearch System, bessere Ergebnisse in der Detektion von CTCs erzielt werden können, bleibt in direkten Vergleichsstudien zu klären.

4.5 Zusammenfassung

Fragestellung: Brustkrebs ist mit hoher Sterblichkeit assoziiert und Mechanismen der Metastasierung sind nur partiell verstanden. Mittels eines sog. funktionalisierten Drahtes (FSMW) können indes im Blut zirkulierende Tumorzellen (CTC) isoliert und charakterisiert werden, wobei jedoch aufgrund der geringen CTC-Konzentration sensitive Analysemethoden entwickelt werden müssen. Wir überprüften die Thesen, ob 1a) die Bestimmung der prognose- und therapielevanten Genexpression von *ER*, *HER2* sowie *PTPRC* (zur Kontaminationskontrolle) in Verdünnungsreihen bis in niedrige Konzentrationsbereiche von wenigen pg cDNA pro well mit ausreichender Sensitivität, Spezifität, Robustheit und Reproduzierbarkeit möglich ist; 1b) eine relative mRNA-Quantifizierung auch im niedrigen Zellzahlbereich (< 50 CTCs) möglich ist; 2) sich die Nachweisgrenze durch Präamplifikation der cDNA weiter senken lässt; 3) die Genexpressionsbestimmung von der Art der Zellfixation abhängen mag und 4) die Anwesenheit von Drahtstücken oder der Zusatz von cDNA von hämatopoetischen Zellen bei der Aufarbeitung und Analyse der Proben keine Störungen evozieren.

Material und Methodik: Die Östrogenrezeptorexpression (*ER*) in der Brustkrebszelllinie MCF-7, *HER2*-Rezeptorexpression in der Brustkrebszelllinie SK-BR-3 und *PTPRC*-Expression in der hämatopoetischen Zelllinie U937 auf mRNA-Ebene wurden mittels real-time PCR bestimmt. *ER*- und *HER2*-Expression wurden nach der $2^{-\Delta CT}$ -Methode normalisiert (Housekeeping-Gen: *HMBS*) während sich für *PTPRC* *GUSB* als geeignetes Housekeeping-Gen erwies.

Ergebnisse: In den Verdünnungsreihen zeigte sich eine konstante, robuste und reproduzierbare Genexpression von *ER* und *PTPRC* bis 27,9 pg/well und von *HER2* bis 55,8 pg/well, mit einer Sensitivität und Spezifität von 100%. Aus abgezählten Mengen an Zellen im niedrigen Zellzahlbereich gelang die relative Quantifizierung im Bereich von 50 bis 10 Zellen mit einer Sensitivität von über 70%, wenn auch mit Schwankungen in der Genexpression einhergehend (mit sinkender Zellzahl). Um zu den Verdünnungsreihen vergleichbar konstante und robuste Genexpressionssignale zu erhalten waren für *ER* 25 Zellen erforderlich, für *PTPRC* 20 Zellen und für *HER2* 75 Zellen. Dennoch konnten Signale in der PCR vereinzelt auch bei Zellzahlen unter 10 nachgewiesen werden. Durch Präamplifikation der cDNA konnte die Detektionssensitivität der real-time PCR erhöht werden. Allerdings ergaben sich im niedrigen Zellzahlbereich extreme Schwankungen in der relativen Genexpression und zwar trotz Nachweises einer weitgehend gleichmäßigen Präamplifikation der cDNA mittels einer etablierten Uniformitätsformel.

Als Fixierungsmittel zeigte sich Aceton gegenüber Paraformaldehyd überlegen. Nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd konnten nämlich keinerlei Signale in der real-time PCR detektiert werden, während nach Aceton-Fixierung aus Proben mit 40 Zellen eine zuverlässige Quantifizierung der Expression von *ER* und *PTPRC* möglich war. Für eine konstante *HER2*-Expression waren 250 Aceton-fixierte Zellen erforderlich (Nachweisgrenze: 100 Zellen). Die Sensitivität der real-time PCR und die sich anschließende relative Quantifizierung der mRNA blieb trotz Verunreinigung mit cDNA aus der hämatopoetischen Zelllinie U937 oder Hinzugabe von Drahtstücken unbeeinflusst.

Schlussfolgerungen: Insgesamt erwies sich die real-time PCR als hochsensitive und -spezifische Methode zum quantitativen Nachweis der Expression im niedrigen Zellzahlbereich. Mit der so etablierten Methodik können nun weitere Charakterisierungen mit am Draht haftenden CTCs durchgeführt sowie um die Expressionsanalyse weiterer Marker erweitert werden.

4.6 Summary (Englische Zusammenfassung)

Question: Breast cancer is associated with high mortality and the biology underlying various patterns of metastasis still remains unclear. Using a functionalized structured medical wire (FSMW) in the blood of breast cancer patients, it is possible to catch and characterize circulating tumor cells (CTCs). As the concentration of CTCs in peripheral blood is very low, it is necessary to develop sensitive detection and analysis techniques. Accordingly, the following hypotheses were tested: 1a) prognostic and therapy relevant gene expression analysis of *ER*, *HER2*, and *PTPRC* (as a control for contamination) is possible with sufficient sensitivity, specificity, robustness and reproducibility with dilutions down to low concentrations of a few pg cDNA per well; 1b) relative mRNA-quantification is also possible with small cell amounts (< 50 CTCs); 2) pre-amplification of cDNA improves the limit of detection in real-time PCR; 3) detection of gene expression may depend on the method of fixation, and 4) there are no biased results of real-time PCR when adding hematopoietic cDNA or spiking samples with pieces of FSMW.

Material and Methods: Gene expression of estrogen receptor (*ER*) in the breast cancer cell line MCF-7, *HER2* in the breast cancer cell line SK-BR-3, and *PTPRC* in the hematopoietic cell line U937 were measured using real-time PCR. Data normalization was performed using the $2^{-\Delta CT}$ method. *HMBS* was used as housekeeping gene for *ER* and *HER2* whereas *GUSB* was the suitable housekeeping gene for *PTPRC*.

Results: In dilution rows, a constant, robust, and reproducible gene expression of *ER* and *PTPRC* was shown at concentrations of 27,9 pg/well and for *HER2* down to 55,8 pg/well, with a sensitivity and specificity of 100%. In experiments with 10-50 cells, relative gene expression was detectable with a sensitivity of 70%, accepting fluctuations in gene expression (with decreasing cell number). For constant and robust gene expression signals, 25 cells were necessary for *ER*, 20 cells for *PTPRC*, and 75 cells for *HER2*. It was also possible to detect sporadic signals in PCR with cell numbers less than 10 and pre-amplification of cDNA, which increased detection sensitivity of real-time PCR. However, extreme fluctuations in relative gene expression were observed with such small amounts of cells despite uniform pre-amplification as calculated with an established uniformity formula.

Cell fixation was only reliable with acetone whereas no signals were detected in PFA-fixed cells. In acetone-fixed cells, reliable gene expression was detected for *ER* and *PTPRC* with at least 40 cells and for *HER2* with 250 cells (limit of detection: 100 cells). The sensitivity of real-time PCR and relative quantification of genes of interest was not influenced by contamination with cDNA from the hematopoietic cell line U937 or by spiking pieces of FSMW during RNA extraction.

Conclusion: In summary, our data reveal real-time PCR to be a powerful tool for the detection and quantification of gene expression in small cell amounts with a high sensitivity and specificity. Accordingly, our established marker assay can now be used for further studies with CTCs attached to a FSMW and to investigate expression of other genes deemed clinically important.

5 Literaturverzeichnis

- Agilent Technologies. (2015). **Brilliant II QPCR Master Mix: Instruction Manual. Revision D.0.** Santa Clara, CA, USA.
- AGO Breast Committee. (2017). **Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer.: Recommendations 2017.** Retrieved from www.ago-online.de
- Akiyama, T.; Sudo, C.; Ogawara, H.; Toyoshima, K.; Yamamoto, T. **The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity.** *Science (New York, N.Y.)*, 232(4758). (1986) 1644–1646.
- Aktas, B.; Tewes, M.; Fehm, T.; Hauch, S.; Kimmig, R.; Kasimir-Bauer, S. **Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients.** *Breast cancer research : BCR*, 11. (2009) R46.
- Alix-Panabières, C.; Pantel, K. **Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer.** *Clinical chemistry*, 59. (2013) 110–118.
- Alix-Panabières, C.; Pantel, K. **Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision.** *Lab on a chip*, 14. (2014) 57–62.
- Alix-Panabières, C.; Schwarzenbach, H.; Pantel, K. **Circulating tumor cells and circulating tumor DNA.** *Annual review of medicine*, 63. (2012) 199–215.
- Antoniou, A.; Pharoah, P. D. P.; Narod, S.; Risch, H. A.; Eyfjord, J. E.; Hopper, J. L.; Loman, N.; Olsson, H.; Johannsson, O.; Borg, A.; Pasini, B.; Radice, P.; Manoukian, S.; Eccles, D. M.; Tang, N.; Olah, E.; Anton-Culver, H.; Warner, E.; Lubinski, J.; Gronwald, J.; Gorski, B.; Tulinius, H.; Thorlacius, S.; Eerola, H.; Nevanlinna, H.; Syrjäkoski, K.; Kallioniemi, O.-P.; Thompson, D.; Evans, C.; Peto, J.; Lalloo, F.; Evans, D. G.; Easton, D. F. **Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies.** *American journal of human genetics*, 72. (2003) 1117–1130.
- Applied Biosystems. (2003). **Relative Quantification ABI PRISM 7000 Sequence Detection System: Getting Started Guide. v1.1.** Foster City, CA, USA.
- Arendt, L. M.; Kuperwasser, C. **Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 20. (2015) 9–25.
- Armstrong, A. J.; Marengo, M. S.; Oltean, S.; Kemeny, G.; Bitting, R. L.; Turnbull, J. D.; Herold, C. I.; Marcom, P. K.; George, D. J.; Garcia-Blanco, M. A. **Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers.** *Molecular cancer research : MCR*, 9. (2011) 997–1007.
- Aubele, M.; Schmitt, M.; Napieralski, R.; Paepke, S.; Ettl, J.; Absmaier, M.; Magdolen, V.; Martens, J.; Foekens, J. A.; Wilhelm, O. G.; Kiechle, M. **The Predictive Value of PITX2 DNA Methylation for High-Risk Breast Cancer Therapy: Current Guidelines, Medical Needs, and Challenges.** *Disease markers*, 2017. (2017) 4934608.
- Banys, M.; Müller, V.; Melcher, C.; Aktas, B.; Kasimir-Bauer, S.; Hagenbeck, C.; Hartkopf, A.; Fehm, T. **Circulating tumor cells in breast cancer.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 423. (2013) 39–45.
- Becskei, A.; Kaufmann, B. B.; van Oudenaarden, A. **Contributions of low molecule number and chromosomal positioning to stochastic gene expression.** *Nature genetics*, 37. (2005) 937–944.
- Bedard, P. L.; Freedman, O. C.; Howell, A.; Clemons, M. **Overcoming endocrine resistance in breast cancer: are signal transduction inhibitors the answer?** *Breast cancer research and treatment*, 108. (2008) 307–317.
- Bednarz, N.; Eltze, E.; Semjonow, A.; Rink, M.; Andreas, A.; Mulder, L.; Hannemann, J.; Fisch, M.; Pantel, K.; Weier, H.-U. G.; Bielawski, K. P.; Brandt, B. **BRCA1 loss preexisting in small subpopulations of prostate cancer is associated with advanced disease and metastatic spread to lymph nodes and peripheral blood.**

- Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 16. (2010) 3340–3348.
- Bengtsson, M.; Hemberg, M.; Rorsman, P.; Ståhlberg, A. **Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise.** BMC molecular biology, 9. (2008) 63.
- Bengtsson, M.; Ståhlberg, A.; Rorsman, P.; Kubista, M. **Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels.** Genome research, 15. (2005) 1388–1392.
- Bernards, R.; Weinberg, R. A. **A progression puzzle.** Nature, 418. (2002) 823.
- Bidard, F.-C.; Vincent-Salomon, A.; Sigal-Zafrani, B.; Diéras, V.; Mathiot, C.; Mignot, L.; Thiery, J.-P.; Sastre-Garau, X.; Pierga, J.-Y. **Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells.** Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 19. (2008) 496–500.
- Bidard, F.-C.; Peeters, D. J.; Fehm, T.; Nolé, F.; Gisbert-Criado, R.; Mavroudis, D.; Grisanti, S.; Generali, D.; Garcia-Saenz, J. A.; Stebbing, J.; Caldas, C.; Gazzaniga, P.; Manso, L.; Zamarchi, R.; Lascoiti, A. F. de; Mattos-Arruda, L. de; Ignatiadis, M.; Lebofsky, R.; van Laere, S. J.; Meier-Stiegen, F.; Sandri, M.-T.; Vidal-Martinez, J.; Politaki, E.; Consoli, F.; Bottini, A.; Diaz-Rubio, E.; Krell, J.; Dawson, S.-J.; Raimondi, C.; Rutten, A.; Janni, W.; Munzone, E.; Carañana, V.; Agelaki, S.; Almici, C.; Dirix, L.; Solomayer, E.-F.; Zorzino, L.; Johannes, H.; Reis-Filho, J. S.; Pantel, K.; Pierga, J.-Y.; Michiels, S. **Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data.** The Lancet. Oncology, 15. (2014) 406–414.
- Bilwes, A. M.; den Hertog, J.; Hunter, T.; Noel, J. P. **Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization.** Nature, 382. (1996) 555–559.
- Blake, W. J.; KAERN, M.; Cantor, C. R.; Collins, J. J. **Noise in eukaryotic gene expression.** Nature, 422. (2003) 633–637.
- Booth, C. S.; Pienaar, E.; Termaat, J. R.; Whitney, S. E.; Louw, T. M.; Viljoen, H. J. **Efficiency of the Polymerase Chain Reaction.** Chemical engineering science, 65. (2010) 4996–5006.
- Brakenhoff, R. H.; Stroomer, J. G.; Brink, C. ten; Bree, R. de; Weima, S. M.; Snow, G. B.; van Dongen, G. A. **Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 5(4). (1999) 725–732.
- Braun, S.; Pantel, K.; Müller, P.; Janni, W.; Hepp, F.; Kantenich, C. R.; Gastroph, S.; Wischnik, A.; Dimpfl, T.; Kindermann, G.; Riethmüller, G.; Schlimok, G. **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.** The New England journal of medicine, 342. (2000) 525–533.
- Budd, G. T.; Cristofanilli, M.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Borden, E.; Miller, M. C.; Matera, J.; Repollet, M.; Doyle, G. V.; Terstappen, L. W. M. M.; Hayes, D. F. **Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 12. (2006) 6403–6409.
- Cadet, J.; Bellon, S.; Berger, M.; Bourdat, A.-G.; Douki, T.; Duarte, V.; Frelon, S.; Gasparutto, D.; Muller, E.; Ravanat, J.-L.; Sauvaigo, S. **Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.** Biological chemistry, 383. (2002) 933–943.
- Cai, L.; Friedman, N.; Xie, X. S. **Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level.** Nature, 440. (2006) 358–362.
- Chandler, D. P.; Wagnon, C. A.; Bolton, H. **Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR.** Applied and environmental microbiology, 64(2). (1998) 669–677.

- Chang, H. J.; Han, S.-W.; Oh, D.-Y.; Im, S.-A.; Jeon, Y. K.; Park, I. A.; Han, W.; Noh, D.-Y.; Bang, Y.-J.; Kim, T.-Y. **Discordant human epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor status in primary and metastatic breast cancer and response to trastuzumab.** Japanese journal of clinical oncology, 41. (2011) 593–599.
- Cho, H.-S.; Mason, K.; Ramyar, K. X.; Stanley, A. M.; Gabelli, S. B.; Denney, D. W.; Leahy, D. J. **Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab.** Nature, 421. (2003) 756–760.
- Chubb, J. R.; Trcek, T.; Shenoy, S. M.; Singer, R. H. **Transcriptional pulsing of a developmental gene.** Current biology : CB, 16. (2006) 1018–1025.
- Ciotti, P.; Garuti, A.; Ballestrero, A.; Cirmena, G.; Chiaramondia, M.; Baccini, P.; Bellone, E.; Mandich, P. **Reliability and reproducibility of a RNA preamplification method for low-density array analysis from formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples.** Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B, 18. (2009) 112–118.
- Cristofanilli, M.; Budd, G. T.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M. C.; Reuben, J. M.; Doyle, G. V.; Allard, W. J.; Terstappen, L. W. M. M.; Hayes, D. F. **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.** The New England journal of medicine, 351. (2004) 781–791.
- Denning, K. M.; Smyth, P. C.; Cahill, S. F.; Finn, S. P.; Conlon, E.; Li, J.; Flavin, R. J.; Aherne, S. T.; Guenther, S. M.; Ferlinz, A.; O'Leary, J. J.; Sheils, O. M. **A molecular expression signature distinguishing follicular lesions in thyroid carcinoma using preamplification RT-PCR in archival samples.** Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 20. (2007) 1095–1102.
- Elowitz, M. B.; Levine, A. J.; Siggia, E. D.; Swain, P. S. **Stochastic gene expression in a single cell.** Science (New York, N.Y.), 297. (2002) 1183–1186.
- Engell, H. C. **Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation.** Ugeskrift for laeger, 117(25). (1955) 822–823.
- Fehm, T.; Müller, V.; Alix-Panabières, C.; Pantel, K. **Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance.** Breast cancer research : BCR, 10 Suppl 1. (2008) S1.
- Felberg, J.; Johnson, P. **Characterization of recombinant CD45 cytoplasmic domain proteins. Evidence for intramolecular and intermolecular interactions.** The Journal of biological chemistry, 273(28). (1998) 17839–17845.
- Fidler, I. J.; Kripke, M. L. **Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor.** Science (New York, N.Y.), 197(4306). (1977) 893–895.
- Förster, T. **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** Annalen der Physik, 437. (1948) 55–75.
- Gascoyne, P. R. C.; Noshari, J.; Anderson, T. J.; Becker, F. F. **Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis.** Electrophoresis, 30. (2009) 1388–1398.
- Giannella, C.; Zito, F. A.; Colonna, F.; Paradiso, A.; Marzullo, F.; Alaibac, M.; Schittulli, F. **Comparison of formalin, ethanol, and Histochoice fixation on the PCR amplification from paraffin-embedded breast cancer tissue.** European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies, 35(8). (1997) 633–635.
- Gillespie, J. W.; Best, C. J. M.; Bichsel, V. E.; Cole, K. A.; Greenhut, S. F.; Hewitt, S. M.; Ahram, M.; Gathright, Y. B.; Merino, M. J.; Strausberg, R. L.; Epstein, J. I.; Hamilton, S. R.; Gannot, G.; Baibakova, G. V.; Calvert, V. S.; Flaig, M. J.; Chuaqui, R. F.; Herring, J. C.; Pfeifer, J.; Petricoin, E. F.; Linehan, W. M.; Duray, P. H.; Bova, G. S.; Emmert-Buck, M. R. **Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies.** The American journal of pathology, 160. (2002) 449–457.
- Giordano, A.; Giuliano, M.; Laurentiis, M. de; Arpino, G.; Jackson, S.; Handy, B. C.; Ueno, N. T.; Andreopoulou, E.; Alvarez, R. H.; Valero, V.; Placido, S. de; Hortobagyi, G. N.; Reuben, J. M.; Cristofanilli, M. **Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-**

- positive disease treated with targeted therapy.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23. (2012) 1144–1150.
- Giuliano, M.; Giordano, A.; Jackson, S.; Hess, K. R.; Giorgi, U. de; Mego, M.; Handy, B. C.; Ueno, N. T.; Alvarez, R. H.; Laurentiis, M. de; Placido, S. de; Valero, V.; Hortobagyi, G. N.; Reuben, J. M.; Cristofanilli, M. **Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment.** *Breast cancer research : BCR*, 13. (2011) R67.
- Greiner Bio-One GmbH. (s.a.). **OncoQuick® Instruction Manual.** Frickenhausen, Deutschland. Retrieved from https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Product_Flyers/Product_Flyers_BioScience/9999_99_UserGuide_OncoQuick_E.pdf
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, 144. (2011) 646–674.
- Hayes, D. F.; Cristofanilli, M.; Budd, G. T.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Miller, M. C.; Matera, J.; Allard, W. J.; Doyle, G. V.; Terstappen, L. W. W. M. **Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12. (2006) 4218–4224.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11(9). (1993) 1026–1030.
- Hofman, V.; Ilie, M.; Long, E.; Guibert, N.; Selva, E.; Washetine, K.; Mograbi, B.; Mouroux, J.; Vénissac, N.; Reverso-Meinietti, J.; Milano, G.; Mazières, J.; Marquette, C.-H.; Paterlini-Bréchet, P.; Hofman, P. **Detection of circulating tumor cells from lung cancer patients in the era of targeted therapy: promises, drawbacks and pitfalls.** *Current molecular medicine*, 14(4). (2014) 440–456.
- Hostein, I.; Stock, N.; Soubeyran, I.; Marty, M.; Mascarel, I. de; Bui, M.; Geneste, G.; Petersen, M.-C.; Coindre, J.-M.; Macgrogan, G. **Nucleic acid quality preservation by an alcohol-based fixative: Comparison with frozen tumors in a routine pathology setting.** *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 20. (2011) 52–62.
- Hsu, G. W.; Ober, M.; Carell, T.; Beese, L. S. **Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase.** *Nature*, 431. (2004) 217–221.
- Hudis, C. A. **Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice.** *The New England journal of medicine*, 357. (2007) 39–51.
- HUGO Gene Nomenclature Committee. (2017). PTPRC protein tyrosine phosphatase, receptor type C [Homo sapiens (human)]: Gene ID: 5788. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5788>
- Issadore, D.; Chung, J.; Shao, H.; Liong, M.; Ghazani, A. A.; Castro, C. M.; Weissleder, R.; Lee, H. **Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector.** *Science translational medicine*, 4. (2012) 141ra92.
- Ivaska, J. **Vimentin: Central hub in EMT induction?** *Small GTPases*, 2. (2011) 51–53.
- Jackisch, C.; Scappaticci, F. A.; Heinzmann, D.; Bisordi, F.; Schreitmüller, T.; Minckwitz, G. v.; Cortés, J. **Neoadjuvant breast cancer treatment as a sensitive setting for trastuzumab biosimilar development and extrapolation.** *Future oncology (London, England)*, 11. (2015) 61–71.
- Josse, S. A.; Hannemann, J.; Spötter, J.; Bauche, A.; Andreas, A.; Müller, V.; Pantel, K. **Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: Impact on the detection of circulating tumor cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18. (2012) 993–1003.
- Kainz, P. **The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations.** *Biochimica et biophysica acta*, 1494(1-2). (2000) 23–27.
- Kennedy, S.; Oswald, N. (2011). **PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide:** Caister Academic Press. Retrieved from <https://books.google.de/books?id=oXoUKTSbnFgC>

- Kim, M.-Y.; Oskarsson, T.; Acharyya, S.; Nguyen, D. X.; Zhang, X. H.-F.; Norton, L.; Massagué, J. **Tumor self-seeding by circulating cancer cells.** *Cell*, 139. (2009) 1315–1326.
- Klatsky, P. C.; Wessel, G. M.; Carson, S. A. **Detection and quantification of mRNA in single human polar bodies: a minimally invasive test of gene expression during oogenesis.** *Molecular human reproduction*, 16. (2010) 938–943.
- Klinge, C. M. **Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.** *Nucleic acids research*, 29(14). (2001) 2905–2919.
- Korenková, V.; Scott, J.; Novosadová, V.; Jindřichová, M.; Langerová, L.; Švec, D.; Šídová, M.; Sjöback, R. **Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment.** *BMC molecular biology*, 16. (2015) 5.
- Lakowicz, J. R.; Maliwal, B. P. **Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins.** *The Journal of biological chemistry*, 258(8). (1983) 4794–4801.
- Lee, J. M.; Dedhar, S.; Kalluri, R.; Thompson, E. W. **The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *The Journal of cell biology*, 172. (2006) 973–981.
- Lee, Y. T. **Breast carcinoma: Pattern of metastasis at autopsy.** *Journal of surgical oncology*, 23(3). (1983) 175–180.
- Li, J.; Smyth, P.; Cahill, S.; Denning, K.; Flavin, R.; Aherne, S.; Pirotta, M.; Guenther, S. M.; O'Leary, J. J.; Sheils, O. **Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials.** *BMC biotechnology*, 8. (2008) 10.
- Lin, M. X.; Hyun, K.-A.; Moon, H.-S.; Sim, T. S.; Lee, J.-G.; Park, J. C.; Lee, S. S.; Jung, H.-I. **Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation.** *Biosensors & bioelectronics*, 40. (2013) 63–67.
- Lindahl, T.; Nyberg, B. **Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid.** *Biochemistry*, 11(19). (1972) 3610–3618.
- Lindahl, T.; Nyberg, B. **Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid.** *Biochemistry*, 13(16). (1974) 3405–3410.
- Liss, B. **Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells.** *Nucleic acids research*, 30(17). (2002) e89.
- Liu, M. C.; Shields, P. G.; Warren, R. D.; Cohen, P.; Wilkinson, M.; Ottaviano, Y. L.; Rao, S. B.; Eng-Wong, J.; Seillier-Moisewitsch, F.; Noone, A.-M.; Isaacs, C. **Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27. (2009) 5153–5159.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods (San Diego, Calif.)*, 25. (2001) 402–408.
- Maheshri, N.; O'Shea, E. K. **Living with noisy genes: how cells function reliably with inherent variability in gene expression.** *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 36. (2007) 413–434.
- Maheswaran, S.; Sequist, L. V.; Nagrath, S.; Ulkus, L.; Brannigan, B.; Collura, C. V.; Inserra, E.; Diederichs, S.; Iafrate, A. J.; Bell, D. W.; Digumarthy, S.; Muzikansky, A.; Irimia, D.; Settleman, J.; Tompkins, R. G.; Lynch, T. J.; Toner, M.; Haber, D. A. **Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells.** *The New England journal of medicine*, 359. (2008) 366–377.
- Makki, J. **Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance.** *Clinical medicine insights. Pathology*, 8. (2015) 23–31.
- Markou, A.; Strati, A.; Malamos, N.; Georgoulas, V.; Lianidou, E. S. **Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay.** *Clinical chemistry*, 57. (2011) 421–430.

- Martens, J. W. M.; Nimmrich, I.; Koenig, T.; Look, M. P.; Harbeck, N.; Model, F.; Kluth, A.; Bolt-de Vries, J.; Sieuwerts, A. M.; Portengen, H.; Meijer-Van Gelder, M. E.; Piepenbrock, C.; Olek, A.; Höfler, H.; Kiechle, M.; Klijn, J. G. M.; Schmitt, M.; Maier, S.; Foekens, J. A. **Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer.** *Cancer research*, 65. (2005) 4101–4117.
- Masuda, N.; Ohnishi, T.; Kawamoto, S.; Monden, M.; Okubo, K. **Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples.** *Nucleic acids research*, 27(22). (1999) 4436–4443.
- Mavaddat, N.; Antoniou, A. C.; Easton, D. F.; Garcia-Closas, M. **Genetic susceptibility to breast cancer.** *Molecular oncology*, 4. (2010) 174–191.
- McGhee, J. D.; Hippel, P. H. von. **Formaldehyde as a probe of DNA structure. r. Mechanism of the initial reaction of Formaldehyde with DNA.** *Biochemistry*, 16(15). (1977) 3276–3293.
- Menarini Silicon Biosystems Inc. (2017). **CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Epithelial Kit (IVD).** San Diego, CA, USA. Retrieved from <https://documents.cellsearchctc.com/>
- Meng, S.; Tripathy, D.; Shete, S.; Ashfaq, R.; Haley, B.; Perkins, S.; Beitsch, P.; Khan, A.; Euhus, D.; Osborne, C.; Frenkel, E.; Hoover, S.; Leitch, M.; Clifford, E.; Vitetta, E.; Morrison, L.; Herlyn, D.; Terstappen, L. W. M. M.; Fleming, T.; Fehm, T.; Tucker, T.; Lane, N.; Wang, J.; Uhr, J. **HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101. (2004) 9393–9398.
- Mengual, L.; Burset, M.; Marín-Aguilera, M.; Ribal, M. J.; Alcaraz, A. **Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays.** *BMC research notes*, 1. (2008) 21.
- Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. (Ed.). (2001). **Rapid Cycle Real-Time PCR.** Berlin, Heidelberg: Springer.
- Mokbel, K.; Hassanally, D. **From HER2 to herceptin.** *Current medical research and opinion*, 17. (2001) 51–59.
- Moon, H.-S.; Kwon, K.; Kim, S.-I.; Han, H.; Sohn, J.; Lee, S.; Jung, H.-I. **Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP).** *Lab on a chip*, 11. (2011) 1118–1125.
- Moret, I.; Sánchez-Izquierdo, D.; Iborra, M.; Tortosa, L.; Navarro-Puche, A.; Nos, P.; Cervera, J.; Beltrán, B. **Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction.** *PLoS one*, 8. (2013) e82753.
- Müller, V.; Riethdorf, S.; Rack, B.; Janni, W.; Fasching, P. A.; Solomayer, E.; Aktas, B.; Kasimir-Bauer, S.; Pantel, K.; Fehm, T. **Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study.** *Breast cancer research : BCR*, 14. (2012) R118.
- Müller, V.; Stahmann, N.; Riethdorf, S.; Rau, T.; Zabel, T.; Goetz, A.; Jänicke, F.; Pantel, K. **Circulating tumor cells in breast cancer: Correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11. (2005) 3678–3685.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods in enzymology*, 155. (1987) 335–350.
- Nagrath, S.; Sequist, L. V.; Maheswaran, S.; Bell, D. W.; Irimia, D.; Utkus, L.; Smith, M. R.; Kwak, E. L.; Digumarthy, S.; Muzikansky, A.; Ryan, P.; Balis, U. J.; Tompkins, R. G.; Haber, D. A.; Toner, M. **Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.** *Nature*, 450. (2007) 1235–1239.
- Nagy, P.; Jenei, A.; Kirsch, A. K.; Szöllosi, J.; Damjanovich, S.; Jovin, T. M. **Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy.** *Journal of cell science*, 112 (Pt 11). (1999) 1733–1741.
- Nakajima, S.; Doi, R.; Toyoda, E.; Tsuji, S.; Wada, M.; Koizumi, M.; Tulachan, S. S.; Ito, D.; Kami, K.; Mori, T.; Kawaguchi, Y.; Fujimoto, K.; Hosotani, R.; Imamura, M. **N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal**

- transition in pancreatic carcinoma.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10. (2004) 4125–4133.
- Nakamura, S.; Yagata, H.; Ohno, S.; Yamaguchi, H.; Iwata, H.; Tsunoda, N.; Ito, Y.; Tokudome, N.; Toi, M.; Kuroi, K.; Suzuki, E. **Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer.** *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 17. (2010) 199–204.
- Noguchi, M.; Furuya, S.; Takeuchi, T.; Hirohashi, S. **Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses.** *Pathology international*, 47(10). (1997) 685–691.
- Nolan, T.; Hands, R. E.; Bustin, S. A. **Quantification of mRNA using real-time RT-PCR.** *Nature protocols*, 1. (2006) 1559–1582.
- Nolé, F.; Munzone, E.; Zorzino, L.; Minchella, I.; Salvatici, M.; Botteri, E.; Medici, M.; Verri, E.; Adamoli, L.; Rotmensz, N.; Goldhirsch, A.; Sandri, M. T. **Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 19. (2008) 891–897.
- Noutsias, M.; Rohde, M.; Block, A.; Klippert, K.; Lettau, O.; Blunert, K.; Hummel, M.; Kühl, U.; Lehmkuhl, H.; Hetzer, R.; Rauch, U.; Poller, W.; Pauschinger, M.; Schultheiss, H. P.; Volk, H. D.; Kotsch, K. **Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies.** *BMC molecular biology*, 9. (2008) 3.
- Okino, S. T.; Kong, M.; Sarras, H.; Wang, Y. **Evaluation of bias associated with high-multiplex, target-specific pre-amplification.** *Biomolecular detection and quantification*, 6. (2016) 13–21.
- Pantel, K.; Brakenhoff, R. H. **Dissecting the metastatic cascade.** *Nature reviews. Cancer*, 4. (2004) 448–456.
- Parkinson, D. R.; Dracopoli, N.; Petty, B. G.; Compton, C.; Cristofanilli, M.; Deisseroth, A.; Hayes, D. F.; Kapke, G.; Kumar, P.; Lee, J. S.; Liu, M. C.; McCormack, R.; Mikulski, S.; Nagahara, L.; Pantel, K.; Pearson-White, S.; Punnoose, E. A.; Roadcap, L. T.; Schade, A. E.; Scher, H. I.; Sigman, C. C.; Kelloff, G. J. **Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use.** *Journal of translational medicine*, 10. (2012) 138.
- Páska, C.; Bögi, K.; Szilák, L.; Tokés, A.; Szabó, E.; Sziller, I.; Rigó, J.; Sobel, G.; Szabó, I.; Kaposi-Novák, P.; Kiss, A.; Schaff, Z. **Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue.** *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 13(4). (2004) 234–240.
- Pfaffl, M. W. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic acids research*, 29(9). (2001) e45.
- Pfaffl, M. W. (2004). **Quantification strategies in real-time PCR.** In S. A. Bustin (Ed.), *IUL biotechnology series: Vol. 5. A - Z of quantitative PCR* (pp. 87–112). La Jolla, Calif.: Internat. Univ. Line.
- Pfaffl, M. W.; Hageleit, M. **Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR.** *Biotechnology Letters*, 23. (2001) 275–282.
- Pienaar, E.; Theron, M.; Nelson, M.; Viljoen, H. J. **A quantitative model of error accumulation during PCR amplification.** *Computational biology and chemistry*, 30. (2006) 102–111.
- Pierga, J.-Y.; Bidard, F.-C.; Mathiot, C.; Brain, E.; Delaloge, S.; Giachetti, S.; Cremoux, P. de; Salmon, R.; Vincent-Salomon, A.; Marty, M. **Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14. (2008) 7004–7010.
- Pierga, J.-Y.; Hajage, D.; Bachelot, T.; Delaloge, S.; Brain, E.; Campone, M.; Diéras, V.; Rolland, E.; Mignot, L.; Mathiot, C.; Bidard, F.-C. **High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic**

- breast cancer patients.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23. (2012) 618–624.
- Polyak, K.; Weinberg, R. A. **Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits.** *Nature reviews. Cancer*, 9. (2009) 265–273.
- Powell, A. A.; Talasz, A. H.; Zhang, H.; Coram, M. A.; Reddy, A.; Deng, G.; Telli, M. L.; Advani, R. H.; Carlson, R. W.; Mollick, J. A.; Sheth, S.; Kurian, A. W.; Ford, J. M.; Stockdale, F. E.; Quake, S. R.; Pease, R. F.; Mindrinos, M. N.; Bhanot, G.; Dairkee, S. H.; Davis, R. W.; Jeffrey, S. S. **Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines.** *PloS one*, 7. (2012) e33788.
- QIAGEN GmbH. (2017). **AdnaTest BreastCancerDetect: RT-PCR-Nachweis von Brustkrebs-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen. Gebrauchsanweisung.** Hilden, Deutschland. Retrieved from http://www.adnagen.com/cfscripts/main_products_englisch.cfm?auswahl=01.20
- Raj, A.; Peskin, C. S.; Tranchina, D.; Vargas, D. Y.; Tyagi, S. **Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells.** *PLoS biology*, 4. (2006) e309.
- Rasmussen, R. (2001). **Quantification on the LightCycler.** In Meuer S., Wittwer C., Nakagawara Kl. (Ed.), *Rapid Cycle Real-Time PCR*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Reinholz, M. M.; Kitzmann, K. A.; Tenner, K.; Hillman, D.; Dueck, A. C.; Hobday, T. J.; Northfelt, D. W.; Moreno-Aspitia, A.; Roy, V.; LaPlant, B.; Allred, J. B.; Stella, P. J.; Lingle, W. L.; Perez, E. A. **Cytokeratin-19 and mammaglobin gene expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients enrolled in North Central Cancer Treatment Group trials, N0234/336/436/437.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17. (2011) 7183–7193.
- Reiter, M.; Kirchner, B.; Müller, H.; Holzhauser, C.; Mann, W.; Pfaffl, M. W. **Quantification noise in single cell experiments.** *Nucleic acids research*, 39. (2011) e124.
- Riethdorf, S.; Fritsche, H.; Müller, V.; Rau, T.; Schindlbeck, C.; Rack, B.; Janni, W.; Coith, C.; Beck, K.; Jänicke, F.; Jackson, S.; Gornet, T.; Cristofanilli, M.; Pantel, K. **Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13. (2007) 920–928.
- Riethdorf, S.; Müller, V.; Zhang, L.; Rau, T.; Loibl, S.; Komor, M.; Roller, M.; Huober, J.; Fehm, T.; Schrader, I.; Hilfrich, J.; Holms, F.; Tesch, H.; Eidtmann, H.; Untch, M.; Minckwitz, G. v.; Pantel, K. **Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: Prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16. (2010) 2634–2645.
- Robert Koch-Institut [Hrsg.] und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.] (Ed.). (2017). **Krebs in Deutschland 2013/2014: Brustdrüse. pp. 72-75** (11. Ausgabe). Berlin. Retrieved from https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_d_utschland_2017.pdf?__blob=publicationFile
- Ross, I. L.; Browne, C. M.; Hume, D. A. **Transcription of individual genes in eukaryotic cells occurs randomly and infrequently.** *Immunology and cell biology*, 72. (1994) 177–185.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732). (1985) 1350–1354.
- Saliba, A.-E.; Saias, L.; Psychari, E.; Minc, N.; Simon, D.; Bidard, F.-C.; Mathiot, C.; Pierga, J.-Y.; Fraissier, V.; Salamero, J.; Saada, V.; Farace, F.; Vielh, P.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L. **Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107. (2010) 14524–14529.
- Sato, Y.; Mukai, K.; Furuya, S.; Kameya, T.; Hirohashi, S. **The AMeX method: A multipurpose tissue-processing and paraffin-embedding method. Extraction of protein and application to immunoblotting.** *The American journal of pathology*, 140(4). (1992) 775–779.

- Sato, Y.; Mukai, K.; Furuya, S.; Shimosato, Y. **The AMeX method: A multipurpose tissue-processing and paraffin-embedding method. III. Extraction and purification of RNA and application to slot-blot hybridization analysis.** *The Journal of pathology*, 163. (1991) 81–85.
- Sato, Y.; Mukai, K.; Matsuno, Y.; Furuya, S.; Kagami, Y.; Miwa, M.; Shimosato, Y. **The AMeX method: A multipurpose tissue-processing and paraffin-embedding method. II. Extraction of spooled DNA and its application to Southern blot hybridization analysis.** *The American journal of pathology*, 136(2). (1990) 267–271.
- Saucedo-Zeni, N.; Mewes, S.; Niestroj, R.; Gasiorowski, L.; Murawa, D.; Nowaczyk, P.; Tomasi, T.; Weber, E.; Dworacki, G.; Morgenthaler, N. G.; Jansen, H.; Propping, C.; Sterzynska, K.; Dyszkiewicz, W.; Zabel, M.; Kiechle, M.; Reuning, U.; Schmitt, M.; Lücke, K. **A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire.** *International journal of oncology*, 41. (2012) 1241–1250.
- Saxena, R.; Dwivedi, A. **ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective.** *Medicinal research reviews*, 32. (2012) 166–215.
- Schnell, S.; Mendoza, C. **Enzymological considerations for a theoretical description of the quantitative competitive polymerase chain reaction (QC-PCR).** *Journal of theoretical biology*, 184(4). (1997a) 433–440.
- Schnell, S.; Mendoza, C. **Theoretical description of the polymerase chain reaction.** *Journal of theoretical biology*, 188. (1997b) 313–318.
- Sellner, L. N.; Coelen, R. J.; Mackenzie, J. S. **Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity.** *Nucleic acids research*, 20(7). (1992) 1487–1490.
- Shelly, W.; Draper, M. W.; Krishnan, V.; Wong, M.; Jaffe, R. B. **Selective estrogen receptor modulators: an update on recent clinical findings.** *Obstetrical & gynecological survey*, 63. (2008) 163–181.
- Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science (New York, N.Y.)*, 235(4785). (1987) 177–182.
- Sotoca, A. M. C.; van den Berg, H.; Vervoort, J.; van der Saag, P.; Ström, A.; Gustafsson, J.-A.; Rietjens, I.; Murk, A. J. **Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells.** *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 105. (2008) 303–311.
- Specht, K.; Richter, T.; Müller, U.; Walch, A.; Werner, M.; Höfler, H. **Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue.** *The American journal of pathology*, 158. (2001) 419–429.
- Srinivasan, M.; Sedmak, D.; Jewell, S. **Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids.** *The American journal of pathology*, 161. (2002) 1961–1971.
- Ståhlberg, A.; Bengtsson, M. **Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR.** *Methods (San Diego, Calif.)*, 50. (2010) 282–288.
- Ståhlberg, A.; Håkansson, J.; Xian, X.; Semb, H.; Kubista, M. **Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification.** *Clinical chemistry*, 50. (2004) 509–515.
- Ståhlberg, A.; Kubista, M. **The workflow of single-cell expression profiling using quantitative real-time PCR.** *Expert review of molecular diagnostics*, 14. (2014) 323–331.
- Stolovitzky, G.; Cecchi, G. **Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23). (1996) 12947–12952.
- Stott, S. L.; Hsu, C.-H.; Tsukrov, D. I.; Yu, M.; Miyamoto, D. T.; Waltman, B. A.; Rothenberg, S. M.; Shah, A. M.; Smas, M. E.; Korir, G. K.; Floyd, F. P.; Gilman, A. J.; Lord, J. B.; Winokur, D.; Springer, S.; Irimia, D.; Nagrath, S.; Sequist, L. V.; Lee, R. J.; Isselbacher, K. J.; Maheswaran, S.; Haber, D. A.; Toner, M. **Isolation of circulating**

- tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107. (2010) 18392–18397.
- Suslov, O.; Steindler, D. A. **PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency.** Nucleic acids research, 33. (2005) e181.
- Swain, P. S.; Elowitz, M. B.; Siggia, E. D. **Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99. (2002) 12795–12800.
- Talasaz, A. H.; Powell, A. A.; Huber, D. E.; Berbee, J. G.; Roh, K.-H.; Yu, W.; Xiao, W.; Davis, M. M.; Pease, R. F.; Mindrinos, M. N.; Jeffrey, S. S.; Davis, R. W. **Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106. (2009) 3970–3975.
- Tan, S. J.; Lakshmi, R. L.; Chen, P.; Lim, W.-T.; Yobas, L.; Lim, C. T. **Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients.** Biosensors & bioelectronics, 26. (2010) 1701–1705.
- Tewes, M.; Aktas, B.; Welt, A.; Mueller, S.; Hauch, S.; Kimmig, R.; Kasimir-Bauer, S. **Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies.** Breast cancer research and treatment, 115. (2009) 581–590.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). **NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: V1.0 User Manual.** Wilmington, DE, USA. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000>
- Thomas, M. L. **The leukocyte common antigen family.** Annual review of immunology, 7. (1989) 339–369.
- Thurm, H.; Ebel, S.; Kentenich, C.; Hensen, A.; Riethdorf, S.; Coith, C.; Wallwiener, D.; Braun, S.; Oberhoff, C.; Jänicke, F.; Pantel, K. **Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 9(7). (2003) 2598–2604.
- Tichopad, A.; Dzidic, A.; Pfaffl, M. W. **Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency.** Biotechnology Letters, 24. (2002) 2053–2056.
- Tichopad, A.; Kitchen, R.; Riedmaier, I.; Becker, C.; Ståhlberg, A.; Kubista, M. **Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments.** Clinical chemistry, 55. (2009) 1816–1823.
- Uhr, J. W.; Pantel, K. **Controversies in clinical cancer dormancy.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108. (2011) 12396–12400.
- Vandesompele, J.; Preter, K. de; Pattyn, F.; Poppe, B.; van Roy, N.; Paepe, A. de; Speleman, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** Genome biology, 3(7). (2002) RESEARCH0034.1-0034.11.
- van't Veer, L. J.; Dai, H.; van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; Hart, A. A. M.; Mao, M.; Peterse, H. L.; van der Kooy, K.; Marton, M. J.; Witteveen, A. T.; Schreiber, G. J.; Kerckhoven, R. M.; Roberts, C.; Linsley, P. S.; Bernards, R.; Friend, S. H. **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** Nature, 415. (2002) 530–536.
- Volfson, D.; Marciniak, J.; Blake, W. J.; Ostroff, N.; Tsimring, L. S.; Hasty, J. **Origins of extrinsic variability in eukaryotic gene expression.** Nature, 439. (2006) 861–864.
- Wallwiener, M.; Hartkopf, A. D.; Baccelli, I.; Riethdorf, S.; Schott, S.; Pantel, K.; Marmé, F.; Sohn, C.; Trumpp, A.; Rack, B.; Aktas, B.; Solomayer, E.-F.; Müller, V.; Janni, W.; Schneeweiss, A.; Fehm, T. N. **The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer.** Breast cancer research and treatment, 137. (2013) 503–510.

- Wang, H.-y.; Ahn, S.; Kim, S.; Park, S.; Park, S.; Han, H.; Sohn, J. H.; Kim, S.; Lee, H. **Detection of circulating tumor cells in patients with breast cancer using the quantitative RT-PCR assay for monitoring of therapy efficacy.** *Experimental and molecular pathology*, 97. (2014) 445–452.
- Wang, L. H.; Pfister, T. D.; Parchment, R. E.; Kummar, S.; Rubinstein, L.; Evrard, Y. A.; Gutierrez, M. E.; Murgo, A. J.; Tomaszewski, J. E.; Doroshow, J. H.; Kinders, R. J. **Monitoring drug-induced gammaH2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16. (2010) 1073–1084.
- Weigelt, B.; Peterse, J. L.; van 't Veer, L. J. **Breast cancer metastasis: Markers and models.** *Nature reviews. Cancer*, 5. (2005) 591–602.
- Wiedbrauk, D. L.; Werner, J. C.; Drevon, A. M. **Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids.** *Journal of clinical microbiology*, 33(10). (1995) 2643–2646.
- Wolffs, P.; Grage, H.; Hagberg, O.; Rådström, P. **Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR.** *Journal of clinical microbiology*, 42(1). (2004) 408–411.
- Wülfing, P.; Borchard, J.; Buerger, H.; Heidl, S.; Zänker, K. S.; Kiesel, L.; Brandt, B. **HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12. (2006) 1715–1720.
- Xenidis, N.; Ignatiadis, M.; Apostolaki, S.; Perraki, M.; Kalbakis, K.; Agelaki, S.; Stathopoulos, E. N.; Chlouverakis, G.; Lianidou, E.; Kakolyris, S.; Georgoulas, V.; Mavroudis, D. **Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27. (2009) 2177–2184.
- Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. **Untangling the ErbB signalling network.** *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2. (2001) 127–137.
- Yu, M.; Stott, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D. A. **Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization.** *The Journal of cell biology*, 192. (2011) 373–382.
- Yu, M.; Ting, D. T.; Stott, S. L.; Wittner, B. S.; Oszolak, F.; Paul, S.; Ciciliano, J. C.; Smas, M. E.; Winokur, D.; Gilman, A. J.; Ulman, M. J.; Xega, K.; Contino, G.; Alagesan, B.; Brannigan, B. W.; Milos, P. M.; Ryan, D. P.; Sequist, L. V.; Bardeesy, N.; Ramaswamy, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D. A. **RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis.** *Nature*, 487. (2012) 510–513.
- Zheng, S.; Lin, H. K.; Lu, B.; Williams, A.; Datar, R.; Cote, R. J.; Tai, Y.-C. **3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood.** *Biomedical microdevices*, 13. (2011) 203–213.

6 Anhang

Tabelle 6-1: Technologien zur Anreicherung von CTCs nach physikalischen Eigenschaften.

Assay und Hersteller	Beschreibung der Technologie
Ficoll, OncoQuick Greiner Bio-One (Deutschland)	Anreicherung von Tumorzellen, basierend auf einem Dichtegradienten, der speziell an die Dichte der aufzutrennenden Zellen angepasst wurde. Zentrifugierung von bis zu 30 ml Blut und dadurch Trennung von Tumorzellen und Blutzellen. Durchführung in 45 Minuten möglich und Lieferung von in etwa 10^4 mononukleären Zellen bei einem Anreicherungsfaktor von insgesamt bis zu 6 Log-Stufen (Greiner Bio-One GmbH s.a.).
ISET Rarecells Diagnostics SAS (Frankreich)	Anreicherung von Tumorzellen durch Nutzung der Größenunterschiede zwischen CTCs ($> 20 \mu\text{m}$) und normalen Blutzellen ($8-10 \mu\text{m}$). Gabe von 10 ml Vollblut in ein EDTA-Gefäß mit darin befindlichem Polycarbonatfilter mit $8 \mu\text{m}$ großen Poren. Anschließend Separation der Zellen nach Größe mittels Vakuumfiltration (Hofman et al. 2014; Parkinson et al. 2012).
3D Filter Zheng et al. 2011	Anreicherung von Tumorzellen durch Nutzung der Größenunterschiede zwischen CTCs ($> 20 \mu\text{m}$) und normalen Blutzellen ($8-10 \mu\text{m}$). Gabe von Blut auf 3D Filter (zwei übereinander geschichtete Parylen-Membranen mit versetzt angebrachten vorgefertigten Poren). Abtransport der Leukozyten durch die Poren. Hängenbleiben der CTCs in den Poren und Schutz und Stressreduktion der CTC-Zellkörper durch Stütze der versetzt angebrachten, unteren Membran (Zheng et al. 2011).
Biochip Tan et al. 2010	Anreicherung von Tumorzellen durch Nutzung der Flexibilitäts- und Größenunterschiede zwischen CTCs ($> 20 \mu\text{m}$) und normalen Blutzellen ($8-10 \mu\text{m}$). Gabe von Blut auf einen Biochip mit aufgebrachtten Fallen. Durchwinden der kleinen und flexibleren Blutzellen und Auffangen der CTCs (Tan et al. 2010).
MOFF- und DEP-Kanal Moon et al. 2011	Methode zur Anreicherung von CTCs, die Kombination aus zwei verschiedenen physikalischen Eigenschaften nutzt. Zuerst Auftrennung der Zellen nach ihrer Größe im MOFF-Kanal (multi-orifice flow fractionation) mit anschließender Sortierung der Zellen nach deren dielektrophoretischen Eigenschaften im DEP-Kanal (dielectrophoresis) (Moon et al. 2011).
depFFF (dielectrophoretic flow-field fractionation) Gascoyne et al. 2009	Anreicherung von CTCs durch Nutzung der dielektrophoretischen Eigenschaften der Zellen. Injektion von Zellen in eine Kammer. Induktion einer Strömung und Anlegen eines elektrischen Feldes. Bewegung der Zellen nach ihren physikalischen Eigenschaften (z.B. Größe, Membran etc.) und unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Kammer und Fraktionierung (Gascoyne et al. 2009).

Tabelle 6-2: Technologien zur Anreicherung von CTCs nach biologischen Eigenschaften.

Assay und Hersteller	Beschreibung der Technologie
CellSearch CTC Kit ehemals Veridex, Janssen Diagnostics, seit 2017 Menarini Silicon Biosystems Inc.	Immunomagnetische Anreicherung von CTCs aus 7,5 ml Vollblut unter Verwendung eines Capture-Reagenz auf Ferrofluidbasis mit anschließender Charakterisierung der CTCs mittels Immunfluoreszenzmarkierung. Bindung der CTCs an Anti-EpCAM-Antikörper, welche auf Partikeln mit magnetischem Kern befestigt sind (Ferrofluidreagenz). Anreicherung der Antigen-Antikörper-Komplexe in einem magnetischen Feld und die Zugabe von Fluoreszenzreagenzien. Charakterisierung der Zellen mittels Anti-CK-Phykoerythrin (für Epithelzellen charakteristisches Cytokeratin), DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole; Anfärbung des Zellkerns) und Anti-CD45-Allophycocyanin (APC = antigen-presenting cell; spezifisch für Leukozyten) (Menarini Silicon Biosystems Inc. 2017)

<p>MagSweeper</p> <p>Talasaz et al. 2009</p>	<p>Immunomagnetische Anreicherung von EpCAM exprimierenden zirkulierenden epithelialen Zellen aus Vollblut über Bindung an einen magnetischen Kern. Dabei Eliminierung aller übrigen Zellen. Prozessierung von 9 ml Blut pro Stunde. Direkt im Anschluss molekulare Analyse möglich (Powell et al. 2012; Talasaz et al. 2009).</p>
<p>CTC-Chip</p> <p>D. Haber und M. Toner, D. Farber und Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA</p> <p>Entwickler: On-Q-ity, Waltham, MA, USA ICx Biosystems, San Diego, CA, USA Johnson & Johnson</p>	<p>Anreicherung von CTCs aus Vollblut. Der sogenannte „CTC-Chip“ besteht aus 78.000 mit Anti-EpCAM-Antikörpern beschichteten Mikropfosten, welche auf einer durchflutbaren Ebene angebracht sind. Fangen der CTCs durch Interaktion mit den Mikropfosten während kontrollierter flächiger Durchströmung der Ebene mit Vollblut. Detektion der CTCs mit einer Kamera (Maheswaran et al. 2008; Nagrath et al. 2007).</p>
<p>HB-Chip (Herringbone-Chip)</p> <p>M. Toner und D. Haber, Massachusetts General Hospital u. Harvard Medical School, Boston, MA, USA</p>	<p>Erweiterte Methode des CTC-Chips. Durch die Anordnung von Rillen im Fischgrätenmuster, durch welche das auf CTCs zu untersuchende Blut fließt, werden Mikrowirbel induziert. Dadurch wird die Anzahl der Zellkontakte mit den Antikörper-beschichteten Wänden erhöht und eine höhere Abfangungsleistung der CTCs erzielt (Stott et al. 2010).</p>
<p>CTC-Chip „Ephesia“</p> <p>Saliba et al. 2010</p>	<p>Methode zur Anreicherung von CTCs durch den Einsatz von Antikörpern und das Anlegen eines magnetischen Feldes. Kammer, auf dessen Boden magnetische Pole im hexagonalen Muster angebracht sind. Befüllung der Kammer mit Antikörper-beschichteten magnetischen Beads, welche Zellen an sich binden können. Die Beads unterliegen der Brownschen Bewegung, bis ein Magnetfeld erzeugt wird, wodurch sich die Beads an den Polen selbständig sortieren und aufreihen (Saliba et al. 2010).</p>
<p>μ-Hall Detektor</p> <p>Issadore et al. 2012</p>	<p>Messung und Charakterisierung von CTCs aus Vollblutprobe. Markierung von Zellen mit immunomagnetischen Nanopartikeln und deren Messung mittels eines auf einem mikrofluidem Chip basierendem micro-Hall Detektors. Zeitgleiche Detektion von EpCAM-, HER2/neu- und EGFR-exprimierenden Zellen möglich (Issadore et al. 2012).</p>
<p>Vortex micromixer</p> <p>Lin et al. 2013</p>	<p>Anreicherung von CTCs durch Bildung von CTC-Mikropartikel-Komplexen und dadurch erleichterte Differenzierung und Separation von Leukozyten. Generierung von sekundären Wirbelströmen, sogenannten Taylor-Gortler Wirbeln, und Ermöglichung der Bindung einer großen Anzahl an 3 μm großen Mikropartikeln über anti-EpCAM Antikörper an CTCs. Anschließend Abfangung der vergrößerten CTC-Mikropartikel-Komplexe in einem Mikrofilter (Lin et al. 2013).</p>
<p>FSMW (functionalized structured medical wire)</p> <p>Gilupi GmbH, Potsdam</p>	<p>Methode zur Anreicherung von CTCs in vivo. An funktionalisierten Katheter-Führungsdraht sind über ein biokompatibles Hydrogel Antikörper gebunden, die gegen das Tumor-Antigen EpCAM gerichtet sind. Einführen des Drahtes in eine periphere Vene der Patientin für eine Dauer von 30 Minuten. Währenddessen Anreicherung von CTCs aus 1,5 -3 Litern Blut (Saucedo-Zeni et al. 2012).</p>

6. Anhang

Tabelle 6-3: Darstellung aller Experimente der MCF-7 Zelllinie.

RNA-Extr.	Zellzahl	Fixierung	RT	qPCR	Einsatz/well (cDNA; Zellzahl)	preamp	qPCR	Einsatz/well (cDNA; Zellzahl)
1	7,5x10 ⁶	unfixiert	1.1a	1.1a.1	7143-3,5pg			
						1.1a*	1.1a*.1	7143-3,5pg
							1.1a*.2	7143-3,5pg
			1.1b	1.1b.1	7143-3,5pg			
2	2000	unfixiert	2.1	2.1.1	2000			
				} 2.1.2a-g	1000			
					500			
					250			
					125			
					62,5			
					31,25			
				15,625				
3a	125	unfixiert	3a.1	} 3a-f.1.1	125			
3b	62,5	unfixiert	3b.1		62,5			
3c	31,25	unfixiert	3c.1		31,25			
						3c.1*	} 3 c-e.1*.1	31,25
3d	15,625	unfixiert	3d.1		15,625	3d.1*		15,625
						3e.1*		7,8125
3e	7,8125	unfixiert	3e.1		7,8125			
3f	3,90625	unfixiert	3f.1		3,90625			
4a	100	unfixiert	4a.1	} 4a-f.1.1	100			
4b	80	unfixiert	4b.1		80			
4c	60	unfixiert	4c.1		60			
4d	40	unfixiert	4d.1		40			
4e	20	unfixiert	4e.1		20			
4f	10	unfixiert	4f.1		10			
5a	100	unfixiert	5a.1	} 5a-d.1.1	100			
5b	75	unfixiert	5b.1		75			
5c	50	unfixiert	5c.1		50			
5d	25	unfixiert	5d.1		25			
6a	100	unfixiert	6a.1	} 6a-d.1.1	100			
						6a.1*	} 6a-d.1*.1	100
6b	75	unfixiert	6b.1		75	6b.1*		75
						6c.1*		50
6c	50	unfixiert	6c.1		50			
						6d.1*	25	
6d	25	unfixiert	6d.1		25			
7a	20	unfixiert	7a.1	} 7a-f.1.1	20			
7b	10	unfixiert	7b.1		10			
7c	10	unfixiert	7c.1		10			
7d	5	unfixiert	7d.1		5			
7e	5	unfixiert	7e.1		5			
7f	1	unfixiert	7f.1		1			
8a	100	unfixiert	8a.1	} 8a-e.1.1	100			
8b	20	unfixiert	8b.1		20			
8c	10	unfixiert	8c.1		10			
8d	5	unfixiert	8d.1		5			
8e	1	unfixiert	8e.1		1			
9a	20	unfixiert	9a.1	} 9a-d.1.1	20			
						9a.1*	} 9a-d.1*.1	20
9b	10	unfixiert	9b.1		10	9b.1*		10
						9c.1*		2
9c	2	unfixiert	9c.1		2			
9d	1	unfixiert	9d.1		1			
						9d.1*	1	
10a	20	unfixiert	10a.1		20			
10b	10	unfixiert	10b.1		10			
10c	5	unfixiert	10c.1		5			
10d	1	unfixiert	10d.1		1			
11a	100	unfixiert	11a.1		100			
11b	10	unfixiert	11b.1		10			
11c	2	unfixiert	11c.1		2			
11d	1	unfixiert	11d.1		1			
12a	10	unfixiert	12a.1		10			
12b	2	unfixiert	12b.1		2			
12c	1	unfixiert	12c.1		1			

6. Anhang

13	2000	acetonfixiert	13.1	13.1.1	2000			
				} 13.1.2a-g	1000			
					500			
					250			
					125			
					62,5			
					31,25			
					15,625			
14a	1000	acetonfixiert	14a.1	} 14a-e.1.1	1000			
14b	750	acetonfixiert	14b.1		750			
14c	500	acetonfixiert	14c.1		500			
14d	250	acetonfixiert	14d.1		250			
14e	100	acetonfixiert	14e.1		100			
15a	125	acetonfixiert	15a.1	} 15a-f.1.1	125			
15b	62,5	acetonfixiert	15b.1		62,5			
						15b.1*	} 15 b-d.1*.1	62,5
15c	31,25	acetonfixiert	15c.1		31,25	15c.1*		31,25
						15d.1*		15,625
15d	15,625	acetonfixiert	15d.1		15,625			
15e	7,8125	acetonfixiert	15e.1	7,8125				
15f	3,90625	acetonfixiert	15f.1	3,90625				
16a	100	acetonfixiert	16a.1	} 16a-f.1.1	100			
16b	80	acetonfixiert	16b.1		80			
16c	60	acetonfixiert	16c.1		60			
16d	40	acetonfixiert	16d.1		40			
16e	20	acetonfixiert	16e.1		20			
16f	10	acetonfixiert	16f.1		10			

Tabelle 6-4: Darstellung aller Experimente der SK-BR-3 Zelllinie.

RNA-Extr.	Zellzahl	Fixierung	RT	qPCR	Einsatz/well (cDNA; Zellzahl)	preamp	qPCR	Einsatz/well (cDNA; Zellzahl)
1	1,7x10 ⁷	unfixiert	1.1a	1.1a.1	7143-3,5pg			
						1.1a*	1.1a*.1	7143-3,5pg
							1.1a*.2	7143-3,5pg
			1.1b	1.1b.1	7143-3,5pg			
2	2000	unfixiert	2.1	2.1.1	2000			
3a	1000	unfixiert	3a.1	} 3a-d.1.1	1000			
3b	500	unfixiert	3b.1		500			
3c	250	unfixiert	3c.1		250			
3d	125	unfixiert	3d.1		125			
4a	125	unfixiert	4a.1	} 4a-f.1.1	125			
4b	62,5	unfixiert	4b.1		62,5			
4c	31,25	unfixiert	4c.1		31,25			
4d	15,625	unfixiert	4d.1		15,625			
4e	7,8125	unfixiert	4e.1		7,8125			
4f	3,90625	unfixiert	4f.1		3,90625			
5a	1000	unfixiert	5a.1	} 5a-d.1.1	1000			
5b	100	unfixiert	5b.1		100			
5c	10	unfixiert	5c.1		10			
5d	2	unfixiert	5d.1		2			
6a	1000	unfixiert	6a.1	} 6a-c.1.1	1000			
6b	100	unfixiert	6b.1		100			
6c	10	unfixiert	6c.1		10			
7a	1000	unfixiert	7a.1	} 7a-c.1.1	1000			
7b	100	unfixiert	7b.1		100	7a.1*	} 7a-c.1*.1	1000
						7b.1*		100
7c	10	unfixiert	7c.1		10	7c.1*		10
8a	1000	unfixiert	8a.1	} 8a-c.1.1	1000			
8b	100	unfixiert	8b.1		100	8a.1*	} 8a-c.1*.1	1000
						8b.1*		100
8c	10	unfixiert	8c.1		10	8c.1*		10
9	400	unfixiert	9.1	} 9.1.1a-d	400			
					75			
					50			

6. Anhang

					25					
10a	100	unfixiert	10a.1	} 10a-d.1.1	100					
							10a.1*	} 10a-d.1*.1	100	
10b	75	unfixiert	10b.1			75				75
							10b.1*			50
10c	50	unfixiert	10c.1			50				25
						10c.1*			100	
10d	25	unfixiert	10d.1		25			10		
						10d.1*		1		
11a	100	unfixiert	11a.1			11a.1*	} 11a-d.1*.1	100		
11b	10	unfixiert	11b.1			11b.1*			10	
11c	1	unfixiert	11c.1			11c.1*			1	
11d	1	unfixiert	11d.1			11d.1*			1	
12	100	unfixiert	12.1	} 12.1-4.1	48					
			12.2			9				
			12.3			2,25				
			12.4			0,75				
13	2000	acetonfixiert	13.1		13.1.1	2000				
14a	1000	acetonfixiert	14a.1	} 14a-d.1.1	1000					
14b	500	acetonfixiert	14b.1			500				
14c	250	acetonfixiert	14c.1			250				
14d	125	acetonfixiert	14d.1			125				
15a	125	acetonfixiert	15a.1		} 15a-f.1.1	125				
15b	62,5	acetonfixiert	15b.1			62,5				
15c	31,25	acetonfixiert	15c.1			31,25				
15d	15,625	acetonfixiert	15d.1			15,625				
15e	7,8125	acetonfixiert	15e.1			7,8125				
15f	3,90625	acetonfixiert	15f.1			3,90625				
16a	1000	acetonfixiert	16a.1	} 16a-e.1.1		1000				
16b	750	acetonfixiert	16b.1			750				
16c	500	acetonfixiert	16c.1			500				
16d	250	acetonfixiert	16d.1			250				
16e	100	acetonfixiert	16e.1			100				
17	400	acetonfixiert	17.1	} 17.1.1a-d	100					
						75				
						50				
						25				
18a	100	acetonfixiert	18a.1				18a.1*	} 18a-b.1*.1	100	
18b	10	acetonfixiert	18b.1			18b.1*			10	
19a	100	unfixiert	19a.1	} 19a-d.1.1	100					
19b	100	unfix.+Draht	19b.1			100				
19c	100	acetonfixiert	19c.1			100				
19d	100	acetonfix.+D	19d.1			100				
20a	100	unfixiert	20a.1		} 20a-b.1.1	100				
							20a.1*.1	} 20a-b.1*.1	100	
20b	100	unfix.+Draht	20b.1			100				100
						20b.1*.1				
21a	100	unfixiert	21a.1	} 21a-b.1.1a-d	100					
						25				
						6,25				
						1,5625				
21b	100	unfix.+Draht	21b.1			100				
						25				
						6,25				
					1,5625					

Tabelle 6-5: Darstellung aller Experimente der U937 Zelllinie.

RNA-Extr.	Zellzahl	Fixierung	RT	qPCR	Einsatz/well (cDNA; Zellzahl)	preamp	qPCR	Einsatz/well (cDNA; Zellzahl)		
1	3,3x10 ⁷	unfixiert	1.1a	1.1a.1	7143-3,5pg					
						1.1a*	1.1a*.1	7143-3,5pg		
							1.1a*.2	7143-3,5pg		
			1.1b	1.1b.1	7143-3,5pg					
2	2000	unfixiert	2.1	2.1.1	2000					
3a	500	unfixiert	3a.1	} 3a-f.1.1	500					
3b	250	unfixiert	3b.1			250				
3c	125	unfixiert	3c.1			125				
							3c.1*	} 3c-f.1*.1	125	
3d	125	unfixiert	3d.1			125				125
							3d.1*			
3e	62,5	unfixiert	3e.1			62,5				

6. Anhang

						3e.1*		62,5		
3f	31,25	unfixiert	3f.1		31,25					
						3f.1*		31,25		
				} 3a-f.1.2	500		} 3c-f.1*.2	125		
					250				125	
					125				62,5	
					125				31,25	
					62,5					
					31,25					
4a	100	unfixiert	4a.1	} 4a-f.1.1	100					
4b	80	unfixiert	4b.1		80					
4c	60	unfixiert	4c.1		60					
4d	40	unfixiert	4d.1		40					
4e	20	unfixiert	4e.1		20					
4f	10	unfixiert	4f.1		10					
5a	10	unfixiert	5a.1		10	5a.1*		10		
5b	9	unfixiert	5b.1		9					
						5b.1*		9		
5c	8	unfixiert	5c.1		8					
						5c.1*		8		
5d	7	unfixiert	5d.1		7					
						5d.1*		7		
5e	6	unfixiert	5e.1	} 5a-j.1.1	6		} 5a-j.1*.1	6		
5f	5	unfixiert	5f.1		5			5e.1*		
								5f.1*		5
5g	4	unfixiert	5g.1		4					
								5g.1*		4
5h	3	unfixiert	5h.1		3					
						5h.1*		3		
5i	2	unfixiert	5i.1		2					
						5i.1*		2		
5j	1	unfixiert	5j.1		1					
						5j.1*		1		
6	2000	acetonfixiert	6.1	6.1.1	2000					
7a	500	acetonfixiert	7a.1	} 7a-f.1.1	500		} 7a-e.1*.1			
								7a.1*		500
7b	250	acetonfixiert	7b.1		250					
								7b.1*		250
7c	125	acetonfixiert	7c.1		125					
								7c.1*		125
7d	125	acetonfixiert	7d.1		125					
						7d.1*		125		
7e	62,5	acetonfixiert	7e.1	62,5						
						7e.1*		62,5		
7f	31,25	acetonfixiert	7f.1		31,25		} 7a-e.1*.2	500		
					500				250	
					250				125	
				} 7a-f.1.2	125				125	
						125				62,5
					62,5					
					31,25					
8a	100	acetonfixiert	8a.1	} 8a-f.1.1	100					
8b	80	acetonfixiert	8b.1		80					
8c	60	acetonfixiert	8c.1		60					
8d	40	acetonfixiert	8d.1		40					
8e	20	acetonfixiert	8e.1		20					
8f	10	acetonfixiert	8f.1		10					

6. Anhang

Tabelle 6-6: Analyse der Expressionsmuster von *HMBS* und *ER* anhand der Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der MCF-7 Zelllinie. Aufgeführt sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte, deren erwartete $2^{-\Delta CT}$ -Werte, den real errechneten mittleren $2^{-\Delta CT}$ -Werten mit Standardabweichung, jeweils getrennt für beide Läufe und als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Abweichungen der errechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte von über 20% von den erwarteten $2^{-\Delta CT}$ -Werten sind orange markiert. Abweichungen von den Standardabweichungen vom Mittelwert der $2^{-\Delta CT}$ -Werte der einzelnen Läufe über 20% und beider Läufe über 30% sind gelb markiert.

MCF-7		HMBS													
		qPCR 1.1a.1					qPCR 1.1b.1					beide Läufe			
cDNA in pg/well	≅ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	24,47	1,0000	1,0000	0,0313	3,13%	24,30	1,0000	1,0000	0,0734	7,34%	24,39	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	25,39	0,5000	0,5297	0,0120	2,26%	25,53	0,5000	0,4253	0,0223	5,24%	25,46	0,5000	0,4775	15,46%
1785,71	5952	26,50	0,2500	0,2454	0,0149	6,07%	26,36	0,2500	0,2404	0,0129	5,38%	26,43	0,2500	0,2429	1,47%
892,86	2976	27,60	0,1250	0,1148	0,0081	7,05%	27,34	0,1250	0,1216	0,0090	7,42%	27,47	0,1250	0,1182	4,08%
446,43	1488	28,53	0,0625	0,0600	0,0029	4,77%	28,23	0,0625	0,0656	0,0036	5,48%	28,38	0,0625	0,0628	6,37%
223,21	744	29,40	0,0313	0,0329	0,0017	5,17%	29,38	0,0313	0,0295	0,0029	9,83%	29,39	0,0313	0,0312	7,67%
111,61	372	30,59	0,0156	0,0144	0,0013	9,33%	30,22	0,0156	0,0165	0,0011	6,45%	30,41	0,0156	0,0154	9,79%
55,80	186	31,26	0,0078	0,0090	0,0008	8,69%	31,27	0,0078	0,0080	0,0008	10,33%	31,27	0,0078	0,0085	8,97%
27,90	93	32,37	0,0039	0,0042	0,0006	14,65%	32,12	0,0039	0,0044	0,0002	5,21%	32,25	0,0039	0,0043	3,76%
13,95	47	33,14	0,0020	0,0025	0,0004	17,00%	32,79	0,0020	0,0028	0,0004	16,01%	32,96	0,0020	0,0026	8,81%
6,98	23	33,83	0,0010	0,0015	0,0003	21,69%	33,85	0,0010	0,0013	0,0003	22,95%	33,84	0,0010	0,0014	9,46%
3,49	12	34,96	0,0005	0,0007	0,0001	20,65%	35,17	0,0005	0,0005	0,0000	5,20%	35,06	0,0005	0,0006	18,60%
MCF-7		ER													
		qPCR 1.1a.1					qPCR 1.1b.1					beide Läufe			
cDNA in pg/well	≅ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	25,02	1,0000	1,0000	0,0382	3,82%	24,76	1,0000	1,0000	0,0208	2,08%	24,89	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	26,01	0,5000	0,5035	0,0255	5,06%	26,02	0,5000	0,4185	0,0115	2,74%	26,01	0,5000	0,4610	13,03%
1785,71	5952	27,04	0,2500	0,2460	0,0085	3,44%	26,75	0,2500	0,2517	0,0089	3,53%	26,90	0,2500	0,2489	1,63%
892,86	2976	28,09	0,1250	0,1188	0,0072	6,09%	27,82	0,1250	0,1202	0,0061	5,05%	27,95	0,1250	0,1195	0,82%
446,43	1488	28,87	0,0625	0,0690	0,0087	12,55%	28,76	0,0625	0,0625	0,0018	2,86%	28,82	0,0625	0,0658	7,02%
223,21	744	29,92	0,0313	0,0333	0,0016	4,79%	29,71	0,0313	0,0323	0,0031	9,73%	29,82	0,0313	0,0328	2,29%
111,61	372	31,18	0,0156	0,0140	0,0005	3,69%	30,77	0,0156	0,0155	0,0006	3,65%	30,98	0,0156	0,0147	7,18%
55,80	186	32,04	0,0078	0,0077	0,0010	13,22%	31,93	0,0078	0,0069	0,0004	5,37%	31,99	0,0078	0,0073	7,02%
27,90	93	33,12	0,0039	0,0036	0,0007	18,17%	32,78	0,0039	0,0039	0,0007	18,39%	32,95	0,0039	0,0037	3,92%
13,95	47	34,25	0,0020	0,0017	0,0001	4,79%	33,73	0,0020	0,0020	0,0004	22,19%	33,99	0,0020	0,0018	13,03%
6,98	23	35,52	0,0010	0,0007	0,0002	26,78%	34,70	0,0010	0,0010	0,0001	6,92%	35,11	0,0010	0,0009	27,27%
3,49	12	35,98	0,0005	0,0005	0,0004	78,09%	36,12	0,0005	0,0004	0,0001	22,85%	36,05	0,0005	0,0004	19,16%

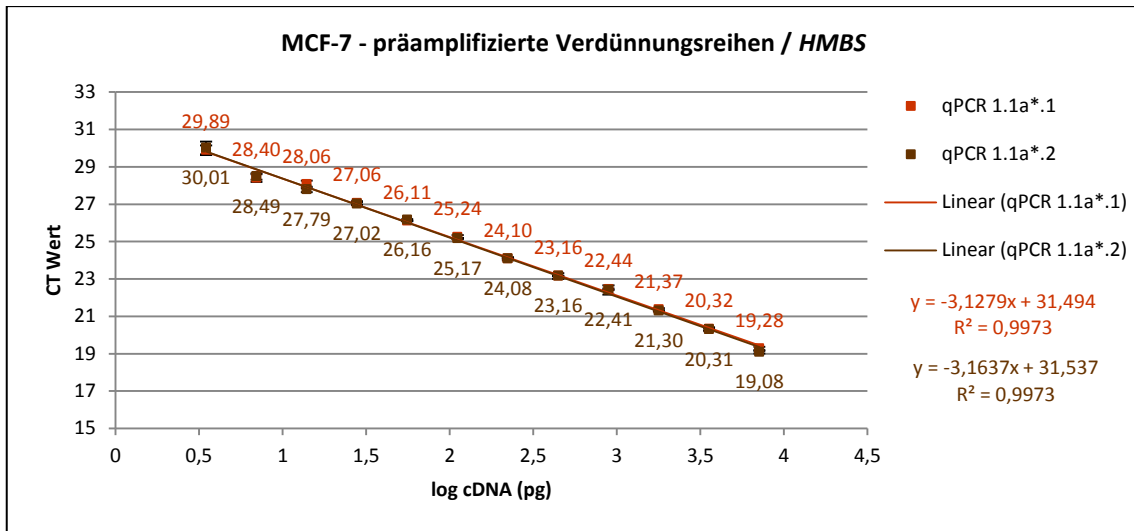


Abbildung 6-1: Expressionsmuster von *HMBS* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen aus der MCF-7 Zelllinie (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

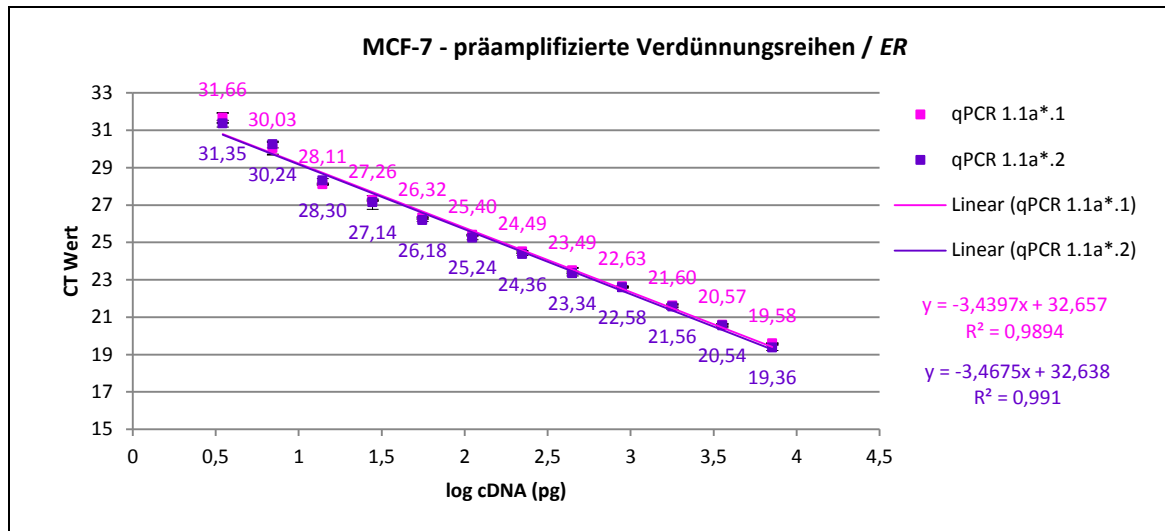


Abbildung 6-2: Expressionsmuster von *ER* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen aus der MCF-7 Zelllinie (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

Tabelle 6-7: Real-time PCR Effizienzen der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der Zelllinie MCF-7 für die Marker *HMBS* und *ER*. Aufgeführt sind die aus den jeweiligen präamplifizierten Verdünnungsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen inklusive Mittelwerten und Standardabweichung.

MCF-7	HMBS		ER	
	qPCR 1.1a*.1	qPCR 1.1a*.2	qPCR 1.1a*.1	qPCR 1.1a*.2
Steigung	-3,1279	-3,1637	-3,4397	-3,4675
Steigung-Varianz (MW)	-3,1458		-3,4536	
Steigung-Varianz (STABW)	0,025314423		0,019657569	
Abweichung der Steigung in %	0,80%		0,57%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	2,087869333	2,070549397	1,953093471	1,942639493
Effizienz-Varianz (MW)	2,079209365		1,947866482	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,012247044		0,007392079	
Abweichung der Effizienz in %	0,59%		0,38%	

6. Anhang

Tabelle 6-8: Analyse der Expressionsmuster von *HMBS* und *ER* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der MCF-7 Zelllinie. Aufgeführt sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte, deren erwartete $2^{-\Delta CT}$ -Werte, den real errechneten mittleren $2^{-\Delta CT}$ -Werten mit Standardabweichung, jeweils getrennt für beide Läufe und als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Abweichungen der errechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte von über 20% von den erwarteten $2^{-\Delta CT}$ -Werten sind orange markiert. Standardabweichungen vom Mittelwert der $2^{-\Delta CT}$ -Werte der einzelnen Läufe über 20% und beider Läufe über 30% sind gelb markiert.

MCF-7		HMBS													
		qPCR 1.1a*.1					qPCR 1.1a*.2					beide Läufe			
cdNA in pg/well	$\hat{=}$ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	19,28	1,0000	1,0000	0,0644	6,44%	19,08	1,0000	1,0000	0,0472	4,72%	19,18	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	20,32	0,5000	0,4875	0,0329	6,74%	20,31	0,5000	0,4283	0,0198	4,62%	20,31	0,5000	0,4579	9,14%
1785,71	5952	21,37	0,2500	0,2354	0,0141	5,99%	21,30	0,2500	0,2146	0,0092	4,29%	21,34	0,2500	0,2250	6,53%
892,86	2976	22,44	0,1250	0,1119	0,0058	5,16%	22,41	0,1250	0,0994	0,0124	12,43%	22,43	0,1250	0,1057	8,32%
446,43	1488	23,16	0,0625	0,0682	0,0031	4,62%	23,16	0,0625	0,0593	0,0048	8,12%	23,16	0,0625	0,0638	9,95%
223,21	744	24,10	0,0313	0,0356	0,0017	4,69%	24,08	0,0313	0,0313	0,0017	5,38%	24,09	0,0313	0,0334	9,14%
111,61	372	25,24	0,0156	0,0161	0,0011	6,89%	25,17	0,0156	0,0147	0,0005	3,49%	25,21	0,0156	0,0154	6,53%
55,80	186	26,11	0,0078	0,0088	0,0004	4,67%	26,16	0,0078	0,0074	0,0003	4,02%	26,13	0,0078	0,0081	12,38%
27,90	93	27,06	0,0039	0,0046	0,0003	6,77%	27,02	0,0039	0,0041	0,0002	4,79%	27,04	0,0039	0,0043	8,16%
13,95	47	28,06	0,0020	0,0023	0,0003	10,99%	27,79	0,0020	0,0024	0,0002	7,79%	27,92	0,0020	0,0023	3,43%
6,98	23	28,40	0,0010	0,0018	0,0002	10,80%	28,49	0,0010	0,0015	0,0001	9,02%	28,44	0,0010	0,0016	14,00%
3,49	12	29,89	0,0005	0,0006	0,0001	13,50%	30,01	0,0005	0,0005	0,0001	17,03%	29,95	0,0005	0,0006	15,62%

MCF-7		ER													
		qPCR 1.1a*.1					qPCR 1.1a*.2					beide Läufe			
cdNA in pg/well	$\hat{=}$ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	19,58	1,0000	1,0000	0,0243	2,43%	19,36	1,0000	1,0000	0,1035	10,35%	19,47	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	20,57	0,5000	0,5035	0,0165	3,28%	20,54	0,5000	0,4403	0,0391	8,88%	20,56	0,5000	0,4719	9,46%
1785,71	5952	21,60	0,2500	0,2471	0,0097	3,93%	21,56	0,2500	0,2181	0,0228	10,47%	21,58	0,2500	0,2326	8,81%
892,86	2976	22,63	0,1250	0,1213	0,0032	2,62%	22,58	0,1250	0,1071	0,0079	7,42%	22,61	0,1250	0,1142	8,81%
446,43	1488	23,49	0,0625	0,0667	0,0046	6,95%	23,34	0,0625	0,0635	0,0063	9,92%	23,41	0,0625	0,0651	3,43%
223,21	744	24,49	0,0313	0,0333	0,0010	2,97%	24,36	0,0313	0,0313	0,0025	7,86%	24,43	0,0313	0,0323	4,25%
111,61	372	25,40	0,0156	0,0177	0,0004	1,98%	25,24	0,0156	0,0170	0,0015	8,59%	25,32	0,0156	0,0174	3,10%
55,80	186	26,32	0,0078	0,0094	0,0002	2,53%	26,18	0,0078	0,0089	0,0007	7,81%	26,25	0,0078	0,0091	4,25%
27,90	93	27,26	0,0039	0,0049	0,0001	2,62%	27,14	0,0039	0,0045	0,0009	19,30%	27,20	0,0039	0,0047	4,90%
13,95	47	28,11	0,0020	0,0027	0,0001	2,33%	28,30	0,0020	0,0020	0,0002	9,39%	28,20	0,0020	0,0024	20,12%
6,98	23	30,03	0,0010	0,0007	0,0001	16,42%	30,24	0,0010	0,0005	0,0001	11,54%	30,14	0,0010	0,0006	20,92%
3,49	12	31,66	0,0005	0,0002	0,0000	13,35%	31,35	0,0005	0,0002	0,0000	11,59%	31,51	0,0005	0,0002	4,41%

6. Anhang

Tabelle 6-9: Darstellung der aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der MCF-7 Zelllinie errechneten *ER/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für beide Läufe sowie als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2) und Darstellung von Intra- und Inter-Assay-Varianzen. Abweichungen der normalisierten Werte ($2^{-\Delta CT}$) von über 30% vom Mittelwert der Verdünnungsschritte 1-7 sind rot markiert. Intra-Assay-Varianzen über 20% und Inter-Assay-Varianzen über 30% sind gelb markiert.

MCF-7		ER/HMBS					
		qPCR 1.1a*.1		qPCR 1.1a*.2		beide Läufe	
cDNA in pg/well	≅ Zellzahl am Draht	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$ - MW	Inter-AV
7142,86	23810	0,81	4,87%	0,83	8,04%	0,82	1,14%
3571,43	11905	0,84	5,70%	0,85	5,96%	0,84	0,82%
1785,71	5952	0,85	5,26%	0,84	7,96%	0,85	1,14%
892,86	2976	0,88	3,13%	0,89	12,04%	0,88	0,65%
446,43	1488	0,79	6,78%	0,88	9,98%	0,84	7,67%
223,21	744	0,76	2,67%	0,83	5,11%	0,79	6,04%
111,61	372	0,90	5,26%	0,95	4,61%	0,92	4,57%
55,80	186	0,86	2,12%	0,99	3,53%	0,93	9,30%
27,90	93	0,87	5,38%	0,92	18,18%	0,89	4,41%
13,95	47	0,97	10,12%	0,70	9,18%	0,83	22,36%
6,98	23	0,32	19,04%	0,30	12,24%	0,31	5,88%
3,49	12	0,29	18,35%	0,40	18,97%	0,34	21,08%

Tabelle 6-10: Expressionsmuster von *HMBS* und *ER* der Läufe qPCR 7-12. Aufgeführt sind die Anzahl der erhaltenen Signale pro Triplet sowie die gemessenen CT-Werte. Konnten mehrere Signale detektiert werden, wurde der jeweilige Mittelwert der CT-Werte berechnet. Range: 100 Zellen bis 1 Zelle (MCF-7, unfixiert).

HMBS	Zellzahl															
	100		20		10		10		5		5		2		1	
7a-f.1.1			3/3	35,52	3/3	36,46	3/3	36,08	3/3	36,71	3/3	36,91			n.d.	n.d.
8a-e.1.1	3/3	34,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			3/3	37,95					n.d.	n.d.
9a-d.1.1			3/3	29,92	3/3	31,69							3/3	32,77	3/3	32,45
9a-d.1*.1			3/3	23,49	3/3	24,59							3/3	26,11	3/3	25,77
10a-d.1*.1			3/3	24,69	3/3	30,58			2/3	32,31					2/3	33,76
11a-d.1*.1	3/3	23,51			3/3	26,28							3/3	30,68	3/3	32,68
12a-c.1*.1					3/3	30,21							3/3	32,42	3/3	31,41
ER	Zellzahl															
qPCR	100		20		10		10		5		5		2		1	
7a-f.1.1			2/3	35,70	2/3	37,11	3/3	36,41	1/3	37,70	1/3	38,16			n.d.	n.d.
8a-e.1.1	2/3	36,12	n.d.	n.d.	1/3	38,53			2/3	39,21					n.d.	n.d.
9a-d.1.1			3/3	30,39	2/3	32,30							3/3	33,57	3/3	33,94
9a-d.1*.1			3/3	24,36	3/3	25,74							3/3	27,02	3/3	27,34
10a-d.1*.1			3/3	27,35	2/3	33,34			3/3	33,84					n.d.	n.d.
11a-d.1*.1	3/3	24,10			3/3	26,76							3/3	32,41	n.d.	n.d.
12a-c.1*.1					3/3	31,91							3/3	33,73	n.d.	n.d.
3/3	Signal für 3 Proben des Triplets erhalten															
2/3	Signal für 2 Proben des Triplets erhalten															
1/3	Signal für 1 Probe des Triplets erhalten															
n.d.	nicht detektiert															
Zahl	Mittelwerte der CTs															

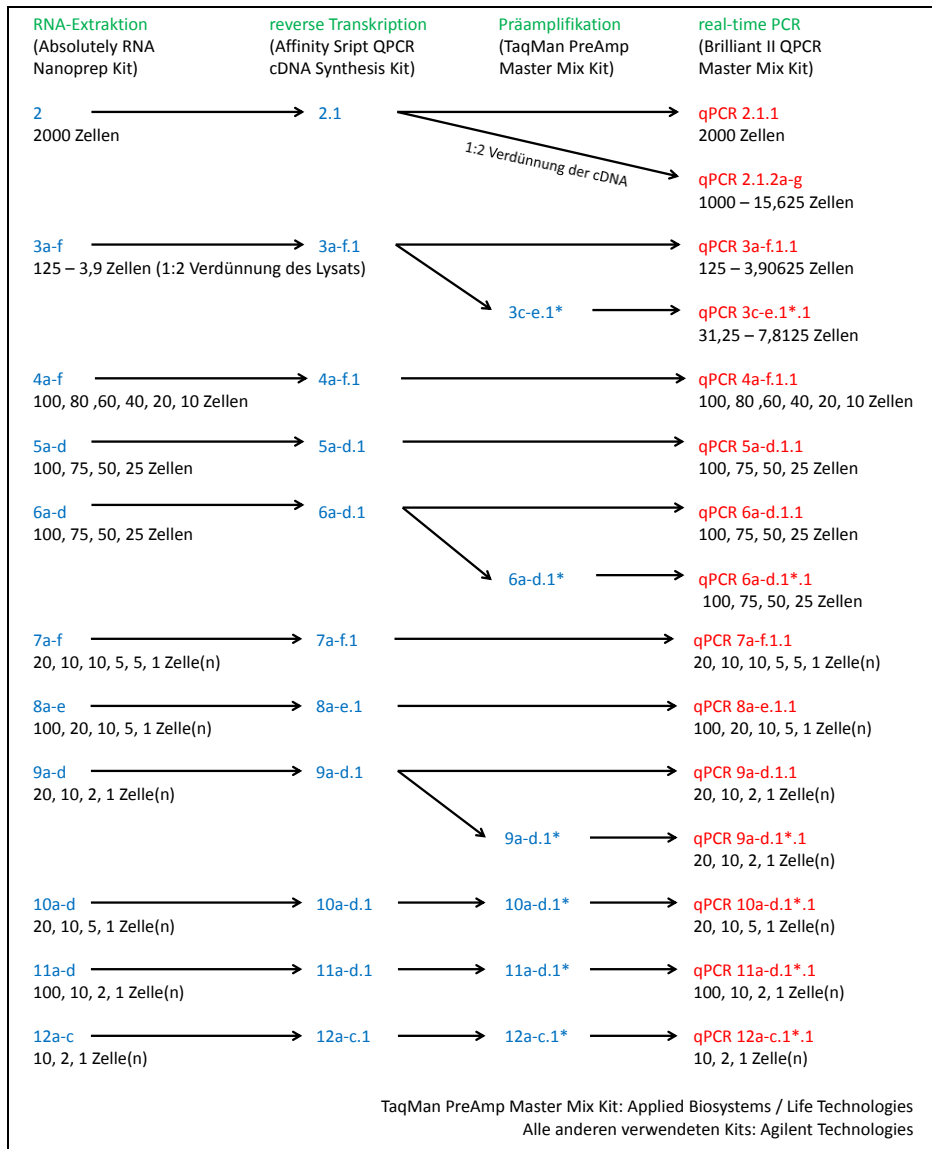


Abbildung 6-3: Arbeitsschritte zur Untersuchung von unfixierten MCF-7 Zellen ≤ 2000 Zellen.

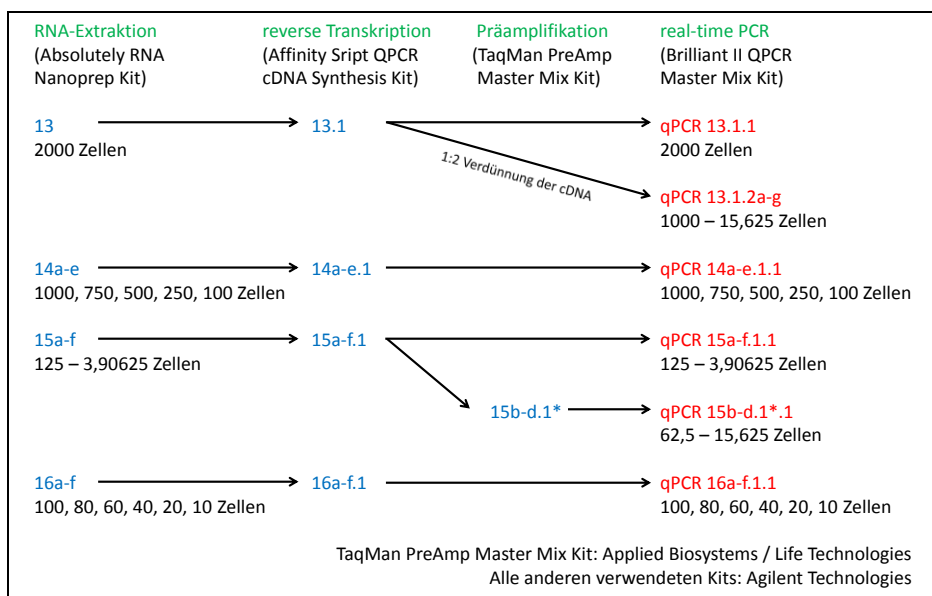


Abbildung 6-4: Arbeitsschritte zur Untersuchung von Aceton-fixierten MCF-7 Zellen ≤ 2000 Zellen.

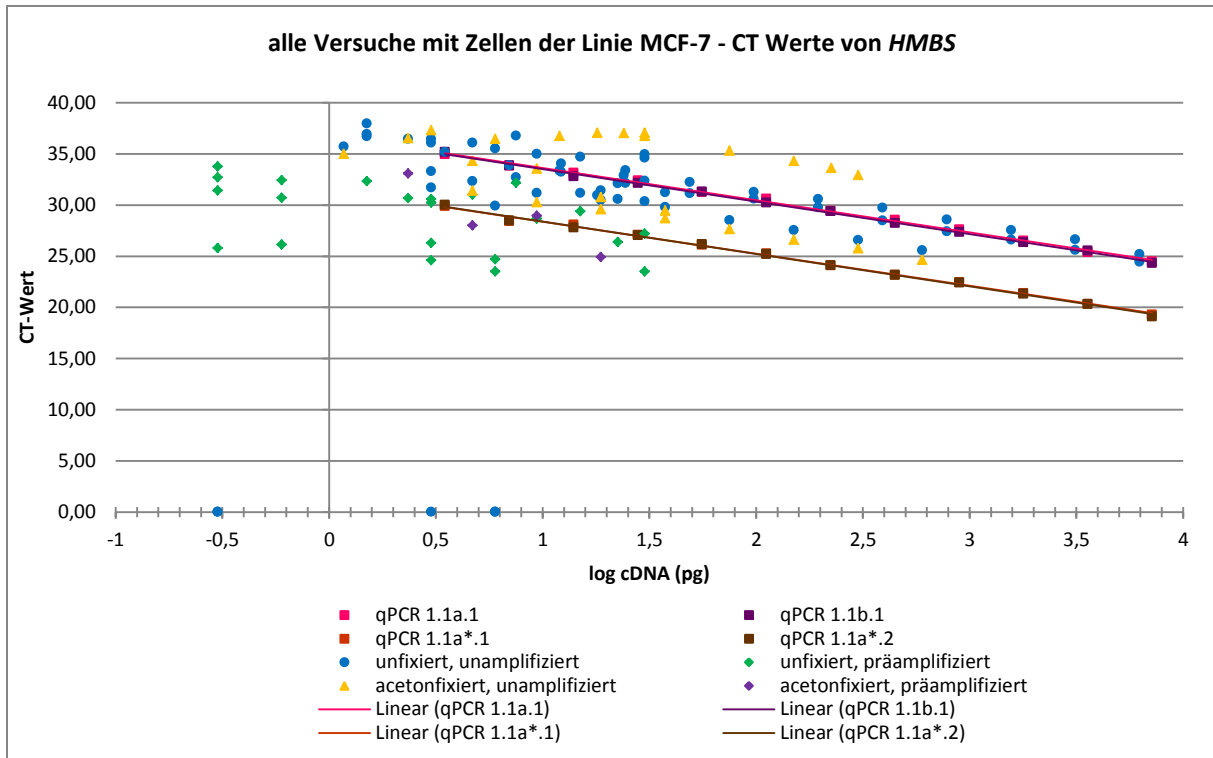


Abbildung 6-5: Expressionsmuster von *HMBS* aller durchgeführten Versuche mit Zellen der Linie MCF-7. Die Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 und die präamplifizierten Verdünnsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 wurden zur Übersicht mit abgebildet. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 0,3 pg pro well.

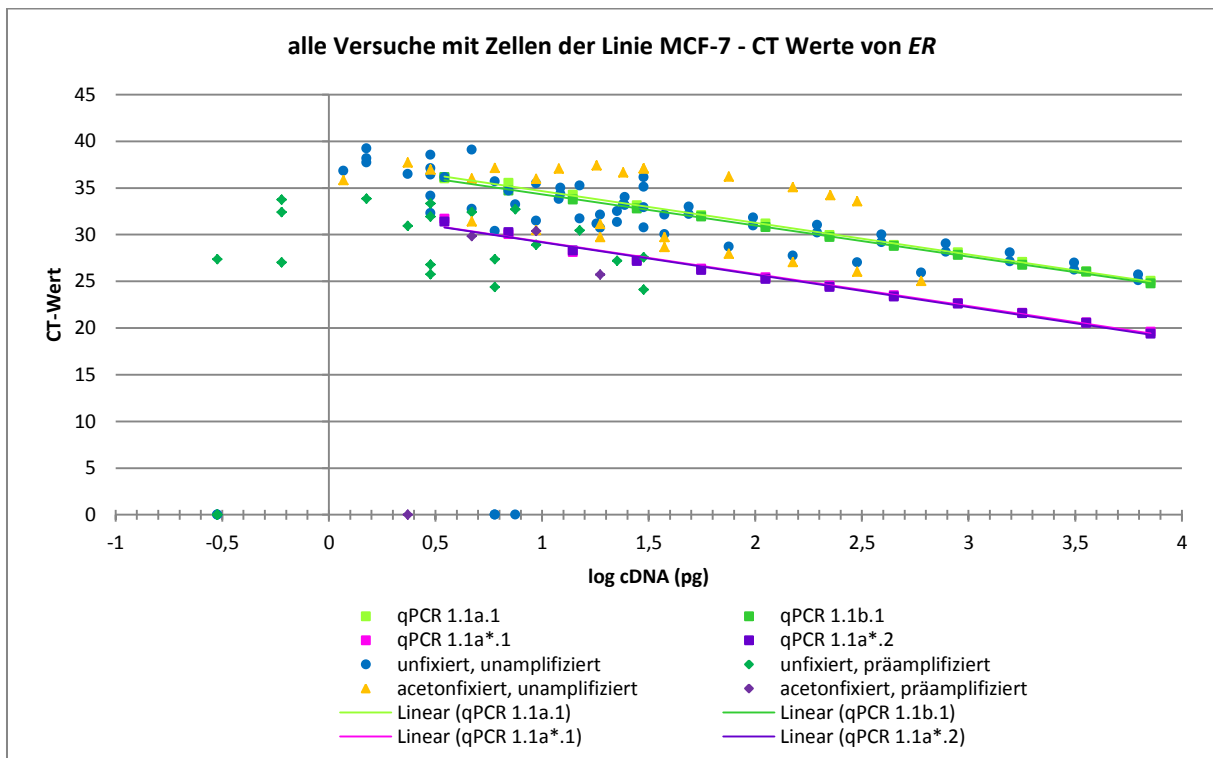


Abbildung 6-6: Expressionsmuster von *ER* aller durchgeführten Versuche mit Zellen der Linie MCF-7. Die Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 und die präamplifizierten Verdünnsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 wurden zur Übersicht mit abgebildet. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 0,3 pg pro well.

6. Anhang

Tabelle 6-11: Analyse der Expressionsmuster von *HMBS* und *HER2* anhand der Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der SK-BR-3 Zelllinie. Aufgeführt sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte, deren erwartete $2^{-\Delta CT}$ -Werte, den real errechneten mittleren $2^{-\Delta CT}$ -Werten mit Standardabweichung, jeweils getrennt für beide Läufe und als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Abweichungen der errechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte von über 20% von den erwarteten $2^{-\Delta CT}$ -Werten sind orange markiert. Standardabweichungen vom Mittelwert der $2^{-\Delta CT}$ -Werte der einzelnen Läufe über 20% und beider Läufe über 30% sind gelb markiert.

SK-BR-3		HMBS													
		qPCR 1.1a.1					qPCR 1.1b.1					beide Läufe			
cDNA in pg/well	≙ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	28,40	1,0000	1,0000	0,0462	4,62%	27,88	1,0000	1,0000	0,0313	3,13%	28,14	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	29,60	0,5000	0,4353	0,0318	7,30%	29,07	0,5000	0,4403	0,0264	6,00%	29,34	0,5000	0,4378	0,82%
1785,71	5952	30,58	0,2500	0,2207	0,0369	16,73%	29,85	0,2500	0,2564	0,0132	5,16%	30,22	0,2500	0,2386	10,60%
892,86	2976	31,74	0,1250	0,0990	0,0068	6,85%	31,13	0,1250	0,1056	0,0055	5,20%	31,43	0,1250	0,1023	4,57%
446,43	1488	32,73	0,0625	0,0500	0,0047	9,47%	31,95	0,0625	0,0598	0,0069	11,49%	32,34	0,0625	0,0549	12,71%
223,21	744	33,20	0,0313	0,0361	0,0043	11,90%	33,00	0,0313	0,0289	0,0025	8,64%	33,10	0,0313	0,0325	15,62%
111,61	372	34,65	0,0156	0,0131	0,0007	5,23%	33,71	0,0156	0,0177	0,0037	20,72%	34,18	0,0156	0,0154	20,76%
55,80	186	35,16	0,0078	0,0093	0,0004	4,07%	35,24	0,0078	0,0061	0,0018	28,92%	35,20	0,0078	0,0077	29,38%
27,90	93	36,42	0,0039	0,0039	0,0002	4,51%	37,18	0,0039	0,0016	0,0001	4,82%	36,80	0,0039	0,0027	58,99%
13,95	47	35,90	0,0020	0,0055	-	-	37,05	0,0020	0,0017	0,0013	74,55%	36,48	0,0020	0,0036	73,79%
6,98	23	36,83	0,0010	0,0029	0,0008	26,54%	39,11	0,0010	0,0004	-	-	37,97	0,0010	0,0017	105,91%
3,49	12	0,00	0,0005	-	-	-	37,18	0,0005	0,0016	-	-	18,59	0,0005	-	141,42%
SK-BR-3		HER2													
		qPCR 1.1a.1					qPCR 1.1b.1					beide Läufe			
cDNA in pg/well	≙ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	28,87	1,0000	1,0000	0,0629	6,29%	28,27	1,0000	1,0000	0,0424	4,24%	28,57	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	30,03	0,5000	0,4496	0,0259	5,77%	29,32	0,5000	0,4841	0,0242	5,01%	29,67	0,5000	0,4668	5,23%
1785,71	5952	31,05	0,2500	0,2207	0,0112	5,06%	30,34	0,2500	0,2387	0,0129	5,40%	30,70	0,2500	0,2297	5,55%
892,86	2976	32,00	0,1250	0,1145	0,0110	9,63%	31,35	0,1250	0,1188	0,0041	3,45%	31,67	0,1250	0,1166	2,61%
446,43	1488	32,85	0,0625	0,0637	0,0056	8,86%	32,41	0,0625	0,0567	0,0050	8,87%	32,63	0,0625	0,0602	8,16%
223,21	744	34,03	0,0313	0,0280	0,0020	7,25%	33,37	0,0313	0,0292	0,0015	5,19%	33,70	0,0313	0,0286	3,10%
111,61	372	35,29	0,0156	0,0117	0,0026	22,07%	34,43	0,0156	0,0140	0,0028	19,70%	34,86	0,0156	0,0129	12,55%
55,80	186	35,88	0,0078	0,0078	0,0012	15,85%	36,08	0,0078	0,0045	0,0020	43,88%	35,98	0,0078	0,0061	38,39%
27,90	93	37,46	0,0039	0,0026	0,0009	34,74%	36,07	0,0039	0,0045	0,0011	25,23%	36,76	0,0039	0,0036	37,63%
13,95	47	38,31	0,0020	0,0014	0,0009	60,09%	36,95	0,0020	0,0024	0,0003	12,32%	37,63	0,0020	0,0019	36,72%
6,98	23	39,46	0,0010	0,0006	0,0002	28,88%	38,94	0,0010	0,0006	-	-	39,20	0,0010	0,0006	3,76%
3,49	12	39,00	0,0005	0,0009	0,0001	12,27%	38,07	0,0005	0,0011	-	-	38,53	0,0005	0,0010	15,86%

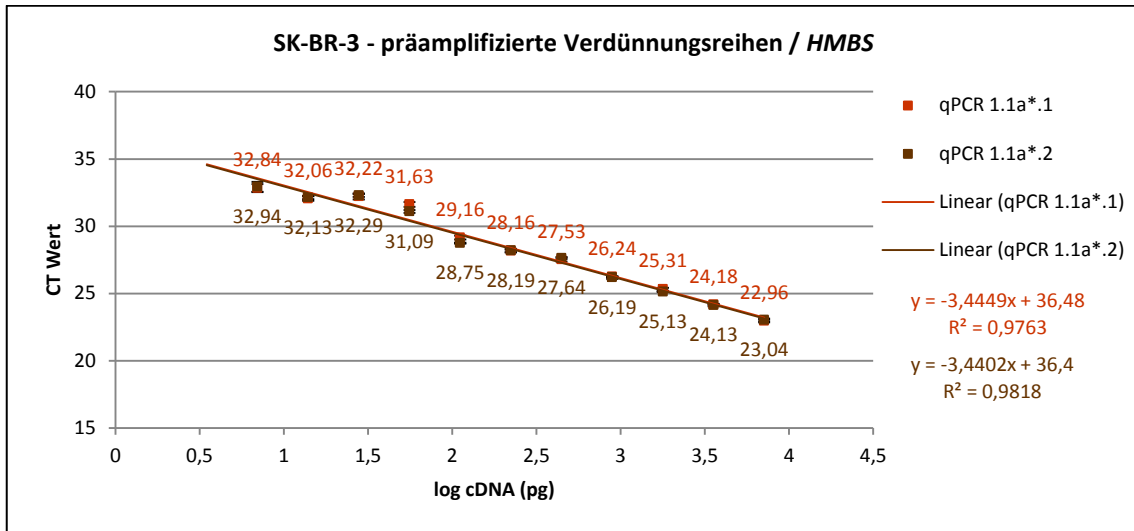


Abbildung 6-7: Expressionsmuster von *HMBS* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen aus der SK-BR-3 Zelllinie (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

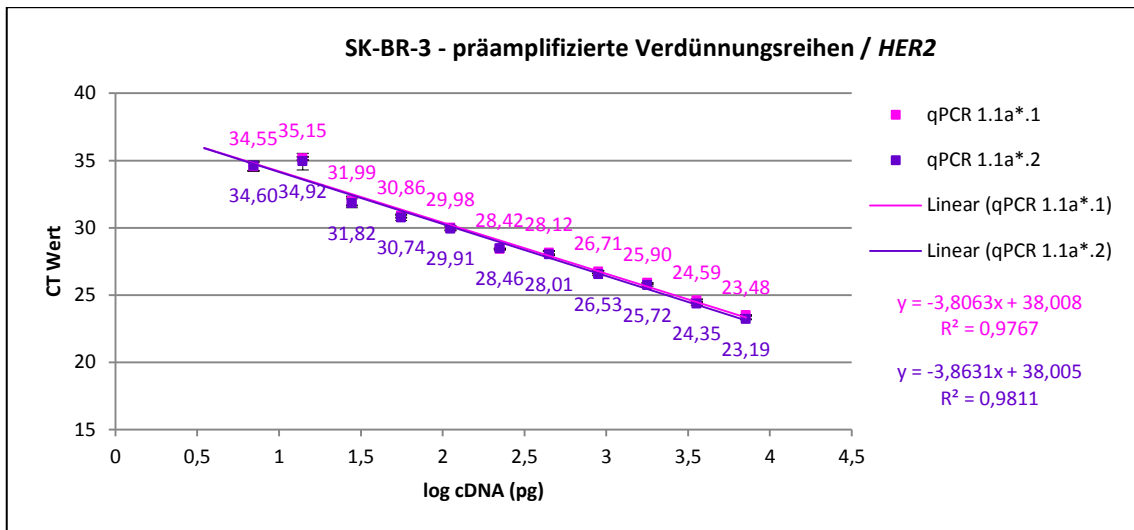


Abbildung 6-8: Expressionsmuster von *HER2* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen aus der SK-BR-3 Zelllinie (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,49 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

Tabelle 6-12: Real-time PCR Effizienzen der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der Zelllinie SK-BR-3 für die Marker *HMBS* und *HER2*. Aufgeführt sind die aus den jeweiligen Kontrollverdünnungsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

SK-BR-3	HMBS		HER2	
	qPCR 1.1a*.1	qPCR 1.1a*.2	qPCR 1.1a*.1	qPCR 1.1a*.2
Steigung	-3,4449	-3,4402	-3,8063	-3,8631
Steigung-Varianz (MW)	-3,44255		-3,8347	
Steigung-Varianz (STABW)	0,003323402		0,040163665	
Abweichung der Steigung in %	0,10%		1,05%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	1,951120932	1,952903458	1,831143285	1,814928269
Effizienz-Varianz (MW)	1,952012195		1,823035777	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,001260436		0,011465748	
Abweichung der Effizienz in %	0,06%		0,63%	

6. Anhang

Tabelle 6-13: Analyse der Expressionsmuster von *HMBS* und *HER2* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der SK-BR-3 Zelllinie. Aufgeführt sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte, deren erwartete $2^{-\Delta CT}$ -Werte, den real errechneten mittleren $2^{-\Delta CT}$ -Werten mit Standardabweichung, jeweils getrennt für beide Läufe und als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Abweichungen der errechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte von über 20% von den erwarteten $2^{-\Delta CT}$ -Werten sind orange markiert. Standardabweichungen vom Mittelwert der $2^{-\Delta CT}$ -Werte der einzelnen Läufe über 20% und beider Läufe über 30% sind gelb markiert.

SK-BR-3		HMBS													
		qPCR 1.1a*.1					qPCR 1.1a*.2					beide Läufe			
cDNA in pg/well	$\hat{=}$ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	22,96	1,0000	1,0000	0,0735	7,35%	23,04	1,0000	1,0000	0,0708	7,08%	23,00	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	24,18	0,5000	0,4293	0,0253	5,90%	24,13	0,5000	0,4687	0,0311	6,64%	24,15	0,5000	0,4490	6,20%
1785,71	5952	25,31	0,2500	0,1957	0,0143	7,29%	25,13	0,2500	0,2343	0,0121	5,17%	25,22	0,2500	0,2150	12,71%
892,86	2976	26,24	0,1250	0,1029	0,0055	5,32%	26,19	0,1250	0,1124	0,0077	6,85%	26,21	0,1250	0,1077	6,20%
446,43	1488	27,53	0,0625	0,0420	0,0040	9,44%	27,64	0,0625	0,0412	0,0026	6,29%	27,58	0,0625	0,0416	1,31%
223,21	744	28,16	0,0313	0,0271	0,0019	7,15%	28,19	0,0313	0,0280	0,0023	8,18%	28,18	0,0313	0,0276	2,45%
111,61	372	29,16	0,0156	0,0136	0,0012	8,83%	28,75	0,0156	0,0190	0,0010	5,29%	28,96	0,0156	0,0163	23,47%
55,80	186	31,63	0,0078	0,0025	0,0002	9,98%	31,09	0,0078	0,0038	0,0003	7,18%	31,36	0,0078	0,0031	29,62%
27,90	93	32,22	0,0039	0,0016	0,0002	12,60%	32,29	0,0039	0,0016	0,0001	7,55%	32,26	0,0039	0,0016	0,49%
13,95	47	32,06	0,0020	0,0018	0,0002	9,72%	32,13	0,0020	0,0018	0,0001	7,54%	32,10	0,0020	0,0018	0,16%
6,98	23	32,84	0,0010	0,0011	0,0002	15,62%	32,94	0,0010	0,0010	0,0002	18,60%	32,89	0,0010	0,0011	0,82%
3,49	12	-	0,0005	-	-	-	-	0,0005	-	-	-	0,00	0,0005	-	3,92%
SK-BR-3		HER2													
		qPCR 1.1a*.1					qPCR 1.1a*.2					beide Läufe			
cDNA in pg/well	$\hat{=}$ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	23,48	1,0000	1,0000	0,0240	2,40%	23,19	1,0000	1,0000	0,0212	2,12%	23,34	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	24,59	0,5000	0,4633	0,0222	4,80%	24,35	0,5000	0,4475	0,0252	5,62%	24,47	0,5000	0,4554	2,45%
1785,71	5952	25,90	0,2500	0,1873	0,0032	1,72%	25,72	0,2500	0,1731	0,0055	3,20%	25,81	0,2500	0,1802	5,55%
892,86	2976	26,71	0,1250	0,1066	0,0058	5,46%	26,53	0,1250	0,0992	0,0046	4,64%	26,62	0,1250	0,1029	5,06%
446,43	1488	28,12	0,0625	0,0400	0,0030	7,57%	28,01	0,0625	0,0356	0,0013	3,52%	28,07	0,0625	0,0378	8,32%
223,21	744	28,42	0,0313	0,0327	0,0011	3,44%	28,46	0,0313	0,0260	0,0004	1,52%	28,44	0,0313	0,0293	15,94%
111,61	372	29,98	0,0156	0,0110	0,0008	7,51%	29,91	0,0156	0,0095	0,0007	7,30%	29,95	0,0156	0,0103	10,76%
55,80	186	30,86	0,0078	0,0060	0,0004	6,15%	30,74	0,0078	0,0054	0,0005	9,93%	30,80	0,0078	0,0057	7,83%
27,90	93	31,99	0,0039	0,0027	0,0004	16,12%	31,82	0,0039	0,0025	0,0004	16,39%	31,90	0,0039	0,0026	5,72%
13,95	47	35,15	0,0020	0,0003	0,0000	6,37%	34,92	0,0020	0,0003	0,0001	30,48%	35,04	0,0020	0,0003	2,94%
6,98	23	34,55	0,0010	0,0005	0,0001	15,79%	34,60	0,0010	0,0004	0,0001	17,47%	34,58	0,0010	0,0004	16,27%
3,49	12	-	0,0005	-	-	-	-	0,0005	-	-	-	-	0,0005	-	14,00%

6. Anhang

Tabelle 6-14: Darstellung der aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der SK-BR-3 Zelllinie errechneten *HER2/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für beide Läufe sowie als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2) und Darstellung von Intra- und Inter-Assay-Varianzen. Abweichungen der normalisierten Werte ($2^{-\Delta CT}$) von über 30% vom Mittelwert der Verdünnungsschritte 1-7 sind rot markiert. Intra-Assay-Varianzen über 20% und Inter-Assay-Varianzen über 30% sind gelb markiert.

SK-BR-3		HER2/HMBS					
		qPCR 1.1a*.1		qPCR 1.1a*.2		beide Läufe	
cdDNA in pg / well	± Zellzahl am Draht	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$ - MW	Inter-AV
7142,86	23810	0,70	5,47%	0,90	5,23%	0,80	17,88%
3571,43	11905	0,75	5,29%	0,86	6,95%	0,80	9,30%
1785,71	5952	0,67	5,12%	0,66	3,11%	0,66	0,33%
892,86	2976	0,72	5,31%	0,79	6,42%	0,76	6,69%
446,43	1488	0,66	10,80%	0,77	4,97%	0,72	10,92%
223,21	744	0,84	5,75%	0,83	6,48%	0,84	0,49%
111,61	372	0,57	10,23%	0,45	7,35%	0,51	16,43%
55,80	186	1,70	10,37%	1,28	11,09%	1,49	19,80%
27,90	93	1,18	19,72%	1,39	17,28%	1,28	11,74%
13,95	47	0,12	10,26%	0,14	30,96%	0,13	14,81%
6,98	23	0,30	21,52%	0,32	24,98%	0,31	2,45%
3,49	12	-	-	-	-	-	-

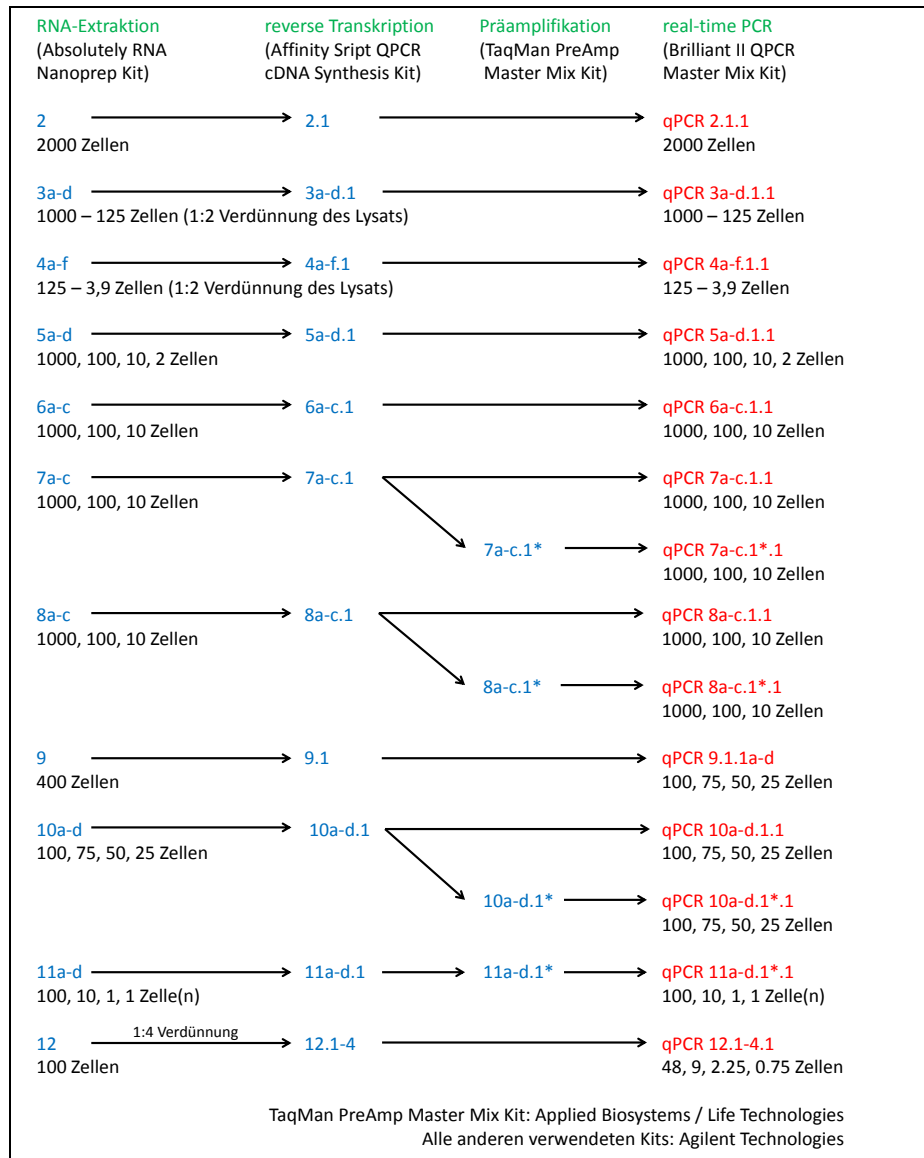


Abbildung 6-9: Arbeitsschritte zur Untersuchung von unfixierten SK-BR-3 Zellen ≤ 2000 Zellen.

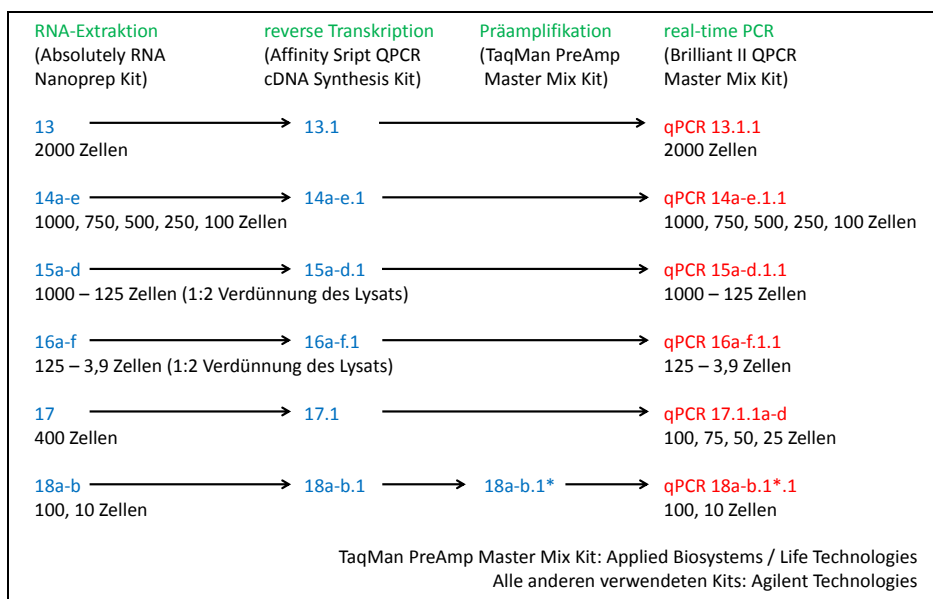


Abbildung 6-10: Arbeitsschritte zur Untersuchung von Aceton-fixierten SK-BR-3 Zellen ≤ 2000 Zellen.

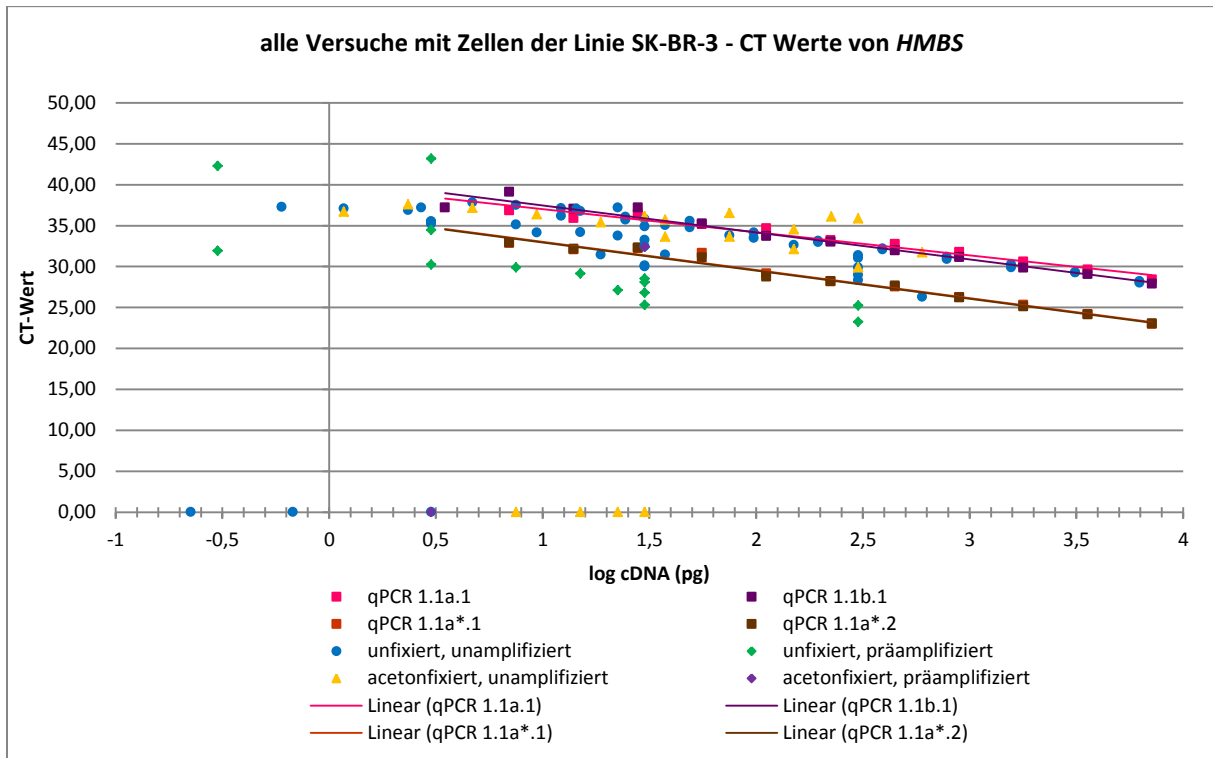


Abbildung 6-11: Expressionsmuster von *HMBS* aller durchgeführten Versuche mit Zellen der Linie SK-BR-3. Die Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 und die präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 wurden zur Übersicht mit abgebildet. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 0,225 pg pro well.

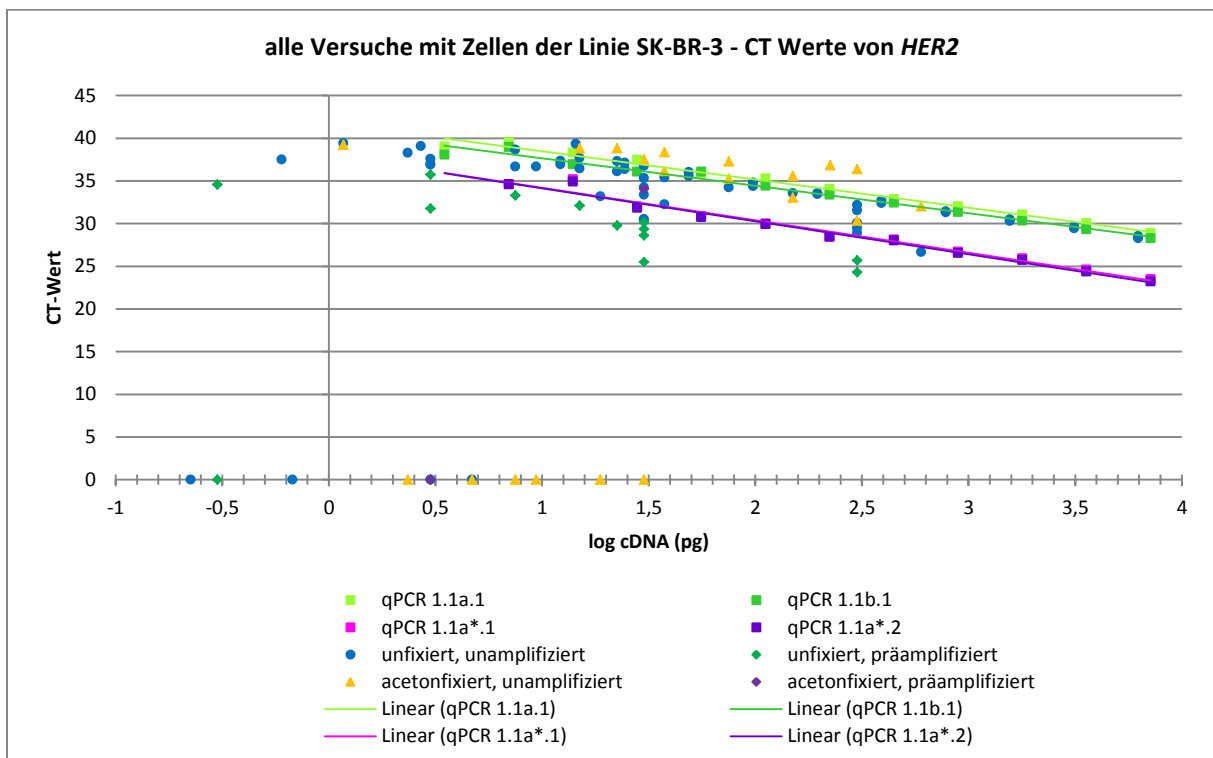


Abbildung 6-12: Expressionsmuster von *HER2* aller durchgeführten Versuche mit Zellen der Linie SK-BR-3. Die Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 und die präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 wurden zur Übersicht mit abgebildet. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 0,225 pg pro well.

6. Anhang

Tabelle 6-15: CT-Werte von *HMBS* der Standardverdünnsreihen aus der U937 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Für jede Verdünnungsstufe sind die CT-Werte der einzelnen Triplikate und die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung aufgeführt. Ausgebliebene Signale sind rot markiert (nicht detektiert).

U937	qPCR 1.1a.1			qPCR 1.1b.1		
	Einsatz cDNA	CT-Werte <i>HMBS</i>	CT-MW	STABW	CT-Werte <i>HMBS</i>	CT-MW
7142,86 pg/well	29,71	29,68	0,03	29,29	29,37	0,08
	29,68			29,38		
	29,66			29,44		
3571,43 pg/well	30,49	30,61	0,10	30,49	30,43	0,10
	30,64			30,49		
	30,69			30,32		
1785,71 pg/well	31,42	31,68	0,26	31,76	31,78	0,23
	31,94			31,56		
	31,69			32,01		
892,86 pg/well	32,6	32,63	0,32	32,92	32,83	0,10
	32,96			32,72		
	32,33			32,85		
446,43 pg/well	nicht detektiert	33,96	0,20	33,6	33,92	0,68
	34,1			33,47		
	33,82			34,7		
223,21 pg/well	35,02	35,08	0,14	nicht detektiert	33,97	0,91
	35,24			33,32		
	34,99			34,61		
111,61 pg/well	36,37	36,10	0,55	36,48	35,80	1,22
	36,46			36,52		
	35,47			34,39		
55,80 pg/well	nicht detektiert	36,12	0,09	35,9	36,75	1,20
	36,18			37,59		
	36,05			nicht detektiert		
27,90 pg/well	nicht detektiert	37,17	-	nicht detektiert	36,46	-
	nicht detektiert			36,46		
	37,17			nicht detektiert		
13,95 pg/well	nicht detektiert	37,12	-	nicht detektiert	35,85	-
	37,12			nicht detektiert		
	nicht detektiert			35,85		
6,98 pg/well	nicht detektiert	-	-	37,13	37,13	-
	nicht detektiert			nicht detektiert		
	nicht detektiert			nicht detektiert		
3,49 pg/well	nicht detektiert	37,57	-	nicht detektiert	-	-
	nicht detektiert			nicht detektiert		
	37,57			nicht detektiert		

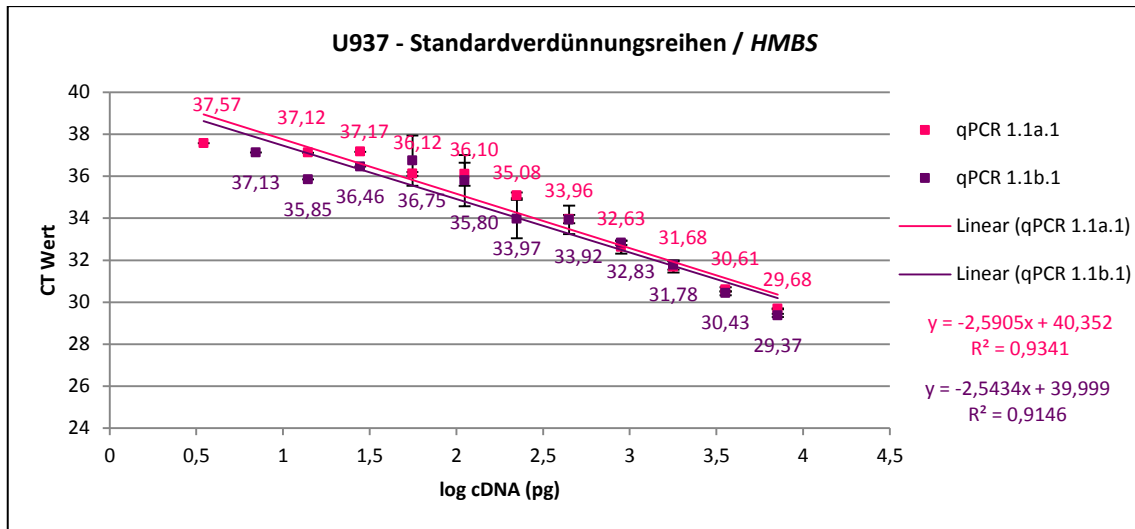


Abbildung 6-13: Expressionsmuster von *HMBS* anhand der Standardverdünnsreihen aus der U937 Zelllinie (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

Tabelle 6-16: Real-time PCR Effizienzen der Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der Zelllinie U937 für den Marker *HMBS*. Aufgeführt sind die aus den Standardverdünnsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen mit Mittelwert und Standardabweichung.

U937	HMBS	
	qPCR 1.1a.1	qPCR 1.1b.1
Steigung	-2,5905	-2,5434
Steigung-Varianz (MW)	-2,56695	
Steigung-Varianz (STABW)	0,033304729	
Abweichung der Steigung in %	1,30%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	2,43234886	2,472717434
Effizienz-Varianz (MW)	2,452533147	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,028544893	
Abweichung der Effizienz in %	1,16%	

6. Anhang

Tabelle 6-17: Analyse der Expressionsmuster von *GUSB* und *PTPRC* anhand der Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der U937 Zelllinie. Aufgeführt sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte, deren erwartete $2^{-\Delta CT}$ -Werte, den real errechneten mittleren $2^{-\Delta CT}$ -Werten mit Standardabweichung, jeweils getrennt für beide Läufe und als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1). Abweichungen der errechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte von über 20% von den erwarteten $2^{-\Delta CT}$ -Werten sind orange markiert. Standardabweichungen vom Mittelwert der $2^{-\Delta CT}$ -Werte der einzelnen Läufe über 20% und beider Läufe über 30% sind gelb markiert.

U937		GUSB													
		qPCR 1.1a.1					qPCR 1.1b.1					beide Läufe			
cDNA in pg/well	≙ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	25,33	1,0000	1,0000	0,0894	8,94%	25,23	1,0000	1,0000	0,0392	3,92%	25,26	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	26,41	0,5000	0,4719	0,0312	6,62%	26,22	0,5000	0,4931	0,0402	8,14%	26,32	0,5000	0,4825	3,10%
1785,71	5952	27,40	0,2500	0,2382	0,0158	6,62%	27,39	0,2500	0,2197	0,0081	3,68%	27,39	0,2500	0,2289	5,72%
892,86	2976	28,43	0,1250	0,1164	0,0082	7,02%	28,44	0,1250	0,1058	0,0062	5,82%	28,44	0,1250	0,1111	6,69%
446,43	1488	29,13	0,0625	0,0718	0,0049	6,80%	29,11	0,0625	0,0664	0,0032	4,86%	29,12	0,0625	0,0691	5,55%
223,21	744	30,11	0,0313	0,0363	0,0026	7,09%	30,12	0,0313	0,0331	0,0016	4,81%	30,11	0,0313	0,0347	6,53%
111,61	372	31,06	0,0156	0,0188	0,0018	9,64%	31,12	0,0156	0,0166	0,0010	6,13%	31,09	0,0156	0,0177	9,14%
55,80	186	32,33	0,0078	0,0078	0,0010	12,94%	32,51	0,0078	0,0063	0,0005	8,44%	32,42	0,0078	0,0070	15,30%
27,90	93	32,81	0,0039	0,0056	0,0005	8,86%	33,03	0,0039	0,0044	0,0004	8,69%	32,92	0,0039	0,0050	16,91%
13,95	47	34,50	0,0020	0,0017	0,0003	18,58%	34,78	0,0020	0,0013	0,0003	21,50%	34,64	0,0020	0,0015	19,96%
6,98	23	35,11	0,0010	0,0011	0,0006	52,79%	35,26	0,0010	0,0009	0,0002	18,35%	35,19	0,0010	0,0010	13,84%
3,49	12	36,42	0,0005	0,0005	0,0003	54,78%	36,28	0,0005	0,0005	0,0000	7,34%	36,35	0,0005	0,0005	0,57%
U937		PTPRC													
		qPCR 1.1a.1					qPCR 1.1b.1					beide Läufe			
cDNA in pg/well	≙ Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	25,88	1,0000	1,0000	0,0971	9,71%	25,49	1,0000	1,0000	0,0069	0,69%	25,68	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	27,10	0,5000	0,4293	0,0334	7,79%	26,80	0,5000	0,4024	0,0063	1,58%	26,95	0,5000	0,4158	4,57%
1785,71	5952	28,08	0,2500	0,2166	0,0170	7,85%	27,88	0,2500	0,1912	0,0193	10,08%	27,98	0,2500	0,2039	8,81%
892,86	2976	29,08	0,1250	0,1083	0,0084	7,79%	29,02	0,1250	0,0868	0,0022	2,56%	29,05	0,1250	0,0975	15,62%
446,43	1488	29,75	0,0625	0,0682	0,0089	13,08%	29,86	0,0625	0,0485	0,0054	11,19%	29,80	0,0625	0,0584	23,95%
223,21	744	30,87	0,0313	0,0314	0,0024	7,68%	30,83	0,0313	0,0247	0,0008	3,30%	30,85	0,0313	0,0281	16,75%
111,61	372	31,96	0,0156	0,0147	0,0011	7,64%	31,99	0,0156	0,0110	0,0006	5,42%	31,98	0,0156	0,0129	20,28%
55,80	186	32,90	0,0078	0,0077	0,0011	14,07%	33,18	0,0078	0,0048	0,0007	14,80%	33,04	0,0078	0,0063	32,26%
27,90	93	33,84	0,0039	0,0040	0,0004	10,04%	33,87	0,0039	0,0030	0,0005	18,30%	33,86	0,0039	0,0035	20,44%
13,95	47	34,72	0,0020	0,0022	0,0003	14,98%	35,32	0,0020	0,0011	0,0004	32,71%	35,02	0,0020	0,0016	46,70%
6,98	23	35,91	0,0010	0,0010	0,0001	11,33%	36,97	0,0010	0,0004	0,0002	44,36%	36,44	0,0010	0,0007	65,51%
3,49	12	36,53	0,0005	0,0006	0,0001	20,97%	37,68	0,0005	0,0002	0,0001	38,23%	37,10	0,0005	0,0004	69,05%

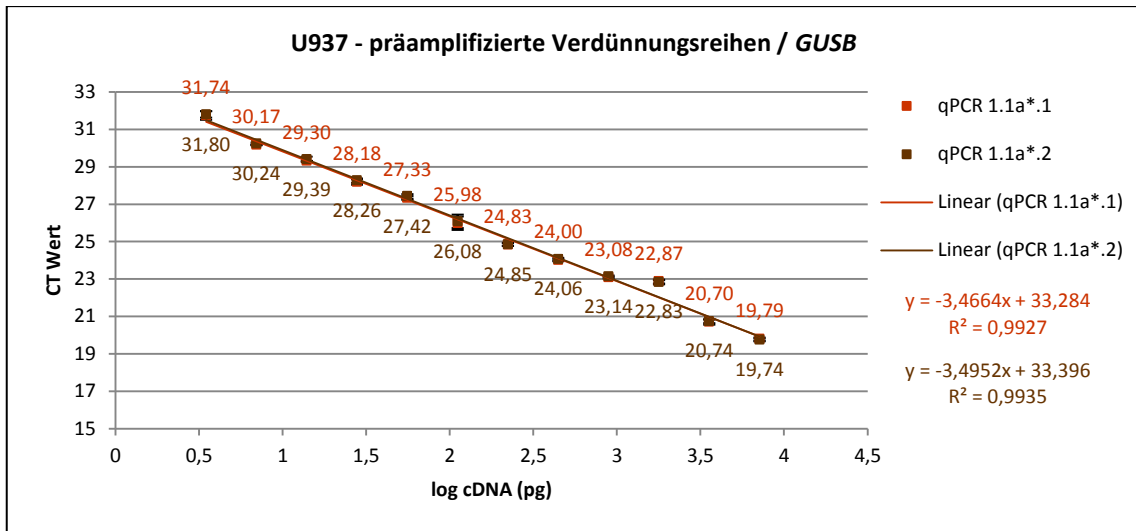


Abbildung 6-14: Expressionsmuster von *GUSB* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen aus der U937 Zelllinie (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

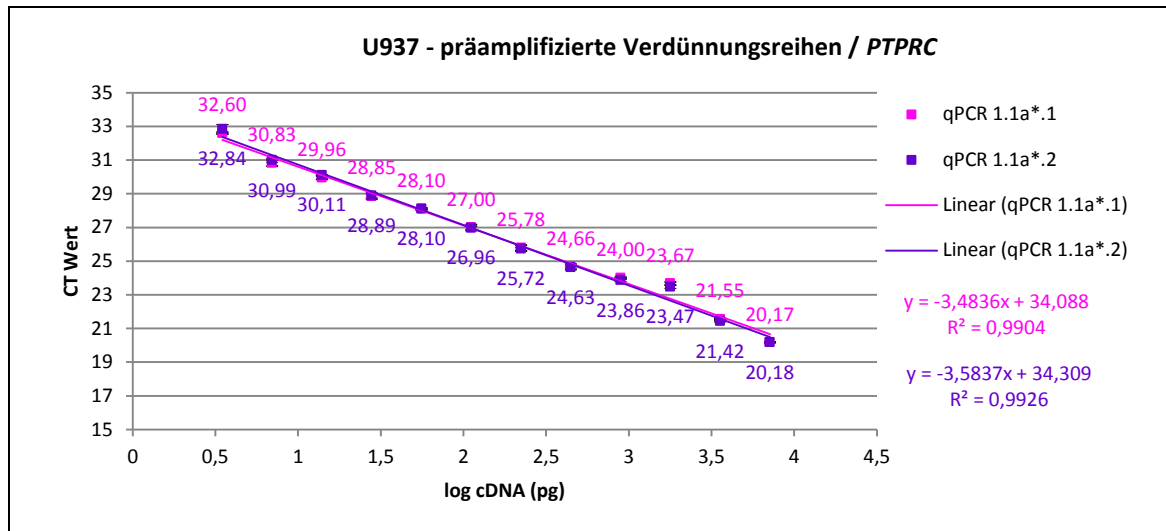


Abbildung 6-15: Expressionsmuster von *PTPRC* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen aus der U937 Zelllinie (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 3,5 pg pro well. Die Regressionsgeradengleichung und der Regressionskoeffizient sind ebenfalls angegeben.

Tabelle 6-18: Real-time PCR Effizienzen der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der Zelllinie U937 für die Marker *GUSB* und *PTPRC*. Aufgeführt sind die aus den jeweiligen präamplifizierten Verdünnungsreihen ermittelten Steigungen und die daraus errechneten Effizienzen mit Mittelwerten und Standardabweichung.

U937	GUSB		PTPRC	
	qPCR 1.1a*.1	qPCR 1.1a*.2	qPCR 1.1a*.1	qPCR 1.1a*.2
Steigung	-3,4664	-3,4952	-3,4836	-3,5837
Steigung-Varianz (MW)	-3,4808		-3,53365	
Steigung-Varianz (STABW)	0,020364675		0,070781389	
Abweichung der Steigung in %	0,59%		2,00%	
Effizienz $10^{(-1/Steigung)}$	1,943048896	1,932442857	1,936686672	1,9012587
Effizienz-Varianz (MW)	1,937745876		1,918972686	
Effizienz-Varianz (STABW)	0,007499602		0,025051359	
Abweichung der Effizienz in %	0,39%		1,31%	

6. Anhang

Tabelle 6-19: Analyse der Expressionsmuster von *GUSB* und *PTPRC* anhand der präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der U937 Zelllinie. Aufgeführt sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte, deren erwartete $2^{-\Delta CT}$ -Werte, den real errechneten mittleren $2^{-\Delta CT}$ -Werten mit Standardabweichung, jeweils getrennt für beide Läufe und als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2). Abweichungen der errechneten $2^{-\Delta CT}$ -Werte von über 20% von den erwarteten $2^{-\Delta CT}$ -Werten sind orange markiert. Standardabweichungen vom Mittelwert der $2^{-\Delta CT}$ -Werte der einzelnen Läufe über 20% und beider Läufe über 30% sind gelb markiert.

U937		GUSB													
		qPCR 1.1a*.1					qPCR 1.1a*.2					beide Läufe			
cDNA in pg/well	\triangle Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	19,79	1,0000	1,0000	0,0577	5,77%	19,74	1,0000	1,0000	0,0556	5,56%	19,77	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	20,70	0,5000	0,5310	0,0445	8,38%	20,74	0,5000	0,5000	0,0304	6,08%	20,72	0,5000	0,5155	4,25%
1785,71	5952	22,87	0,2500	0,1180	0,0076	6,43%	22,83	0,2500	0,1177	0,0080	6,81%	22,85	0,2500	0,1178	0,16%
892,86	2976	23,08	0,1250	0,1022	0,0051	4,94%	23,14	0,1250	0,0950	0,0045	4,79%	23,11	0,1250	0,0986	5,23%
446,43	1488	24,00	0,0625	0,0539	0,0027	5,05%	24,06	0,0625	0,0502	0,0028	5,55%	24,03	0,0625	0,0520	5,06%
223,21	744	24,83	0,0313	0,0303	0,0016	5,19%	24,85	0,0313	0,0291	0,0017	5,73%	24,84	0,0313	0,0297	2,94%
111,61	372	25,98	0,0156	0,0137	0,0025	18,30%	26,08	0,0156	0,0124	0,0022	18,04%	26,03	0,0156	0,0130	7,02%
55,80	186	27,33	0,0078	0,0053	0,0003	6,46%	27,42	0,0078	0,0049	0,0003	7,14%	27,38	0,0078	0,0051	6,37%
27,90	93	28,18	0,0039	0,0030	0,0002	8,34%	28,26	0,0039	0,0027	0,0002	6,89%	28,22	0,0039	0,0029	6,20%
13,95	47	29,30	0,0020	0,0014	0,0001	4,24%	29,39	0,0020	0,0012	0,0001	8,18%	29,35	0,0020	0,0013	6,53%
6,98	23	30,17	0,0010	0,0007	0,0000	4,28%	30,24	0,0010	0,0007	0,0000	4,94%	30,20	0,0010	0,0007	5,39%
3,49	12	31,74	0,0005	0,0003	0,0000	12,20%	31,80	0,0005	0,0002	0,0000	9,08%	31,77	0,0005	0,0002	4,90%
U937		PTPRC													
		qPCR 1.1a*.1					qPCR 1.1a*.2					beide Läufe			
cDNA in pg/well	\triangle Zellzahl am Draht	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	STABW	STABW in Prozent	CT - MW	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$ - MW	STABW in Prozent
7142,86	23810	20,17	1,0000	1,0000	0,0106	1,06%	20,18	1,0000	1,0000	0,0289	2,89%	20,18	1,0000	1,0000	0,00%
3571,43	11905	21,55	0,5000	0,3842	0,0081	2,12%	21,42	0,5000	0,4234	0,0109	2,58%	21,49	0,5000	0,4038	6,86%
1785,71	5952	23,67	0,2500	0,0886	0,0038	4,34%	23,47	0,2500	0,1027	0,0046	4,46%	23,57	0,2500	0,0957	10,44%
892,86	2976	24,00	0,1250	0,0705	0,0016	2,26%	23,86	0,1250	0,0780	0,0033	4,24%	23,93	0,1250	0,0742	7,18%
446,43	1488	24,66	0,0625	0,0445	0,0035	7,91%	24,63	0,0625	0,0458	0,0016	3,45%	24,65	0,0625	0,0451	1,96%
223,21	744	25,78	0,0313	0,0206	0,0017	8,44%	25,72	0,0313	0,0215	0,0009	4,21%	25,75	0,0313	0,0210	3,10%
111,61	372	27,00	0,0156	0,0088	0,0007	8,41%	26,96	0,0156	0,0091	0,0004	4,89%	26,98	0,0156	0,0090	2,45%
55,80	186	28,10	0,0078	0,0041	0,0001	2,65%	28,10	0,0078	0,0041	0,0001	3,03%	28,10	0,0078	0,0041	0,49%
27,90	93	28,85	0,0039	0,0024	0,0002	8,15%	28,89	0,0039	0,0024	0,0001	6,23%	28,87	0,0039	0,0024	1,14%
13,95	47	29,96	0,0020	0,0011	0,0001	5,01%	30,11	0,0020	0,0010	0,0000	2,42%	30,03	0,0020	0,0011	7,02%
6,98	23	30,83	0,0010	0,0006	0,0001	8,86%	30,99	0,0010	0,0006	0,0000	6,13%	30,91	0,0010	0,0006	7,51%
3,49	12	32,60	0,0005	0,0002	0,0000	2,80%	32,84	0,0005	0,0002	0,0000	13,40%	32,72	0,0005	0,0002	11,25%

6. Anhang

Tabelle 6-20: Darstellung der aus den präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 der U937 Zelllinie errechneten *PTPRC/GUSB*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für beide Läufe sowie als gemittelte Werte aus beiden Läufen (qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2) und Darstellung von Intra- und Inter-Assay-Varianzen.

U937		<i>PTPRC/GUSB</i>					
		qPCR 1.1a*.1		qPCR 1.1a*.2		beide Läufe	
cDNA in pg / well	≅ Zellzahl am Draht	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$ - MW	Inter-AV
7142,86	23810	0,76	4,15%	0,74	4,43%	0,75	2,61%
3571,43	11905	0,55	7,58%	0,62	4,89%	0,59	8,49%
1785,71	5952	0,57	6,56%	0,64	6,83%	0,61	8,00%
892,86	2976	0,53	3,51%	0,61	4,61%	0,57	9,79%
446,43	1488	0,63	8,42%	0,67	4,81%	0,65	4,41%
223,21	744	0,52	9,00%	0,54	5,56%	0,53	3,43%
111,61	372	0,49	19,70%	0,54	18,16%	0,52	6,86%
55,80	186	0,59	5,62%	0,62	6,37%	0,61	4,25%
27,90	93	0,63	10,90%	0,65	8,16%	0,64	2,45%
13,95	47	0,64	5,09%	0,61	7,29%	0,62	3,10%
6,98	23	0,63	8,92%	0,59	6,51%	0,61	4,74%
3,49	12	0,55	11,81%	0,49	15,57%	0,52	8,97%

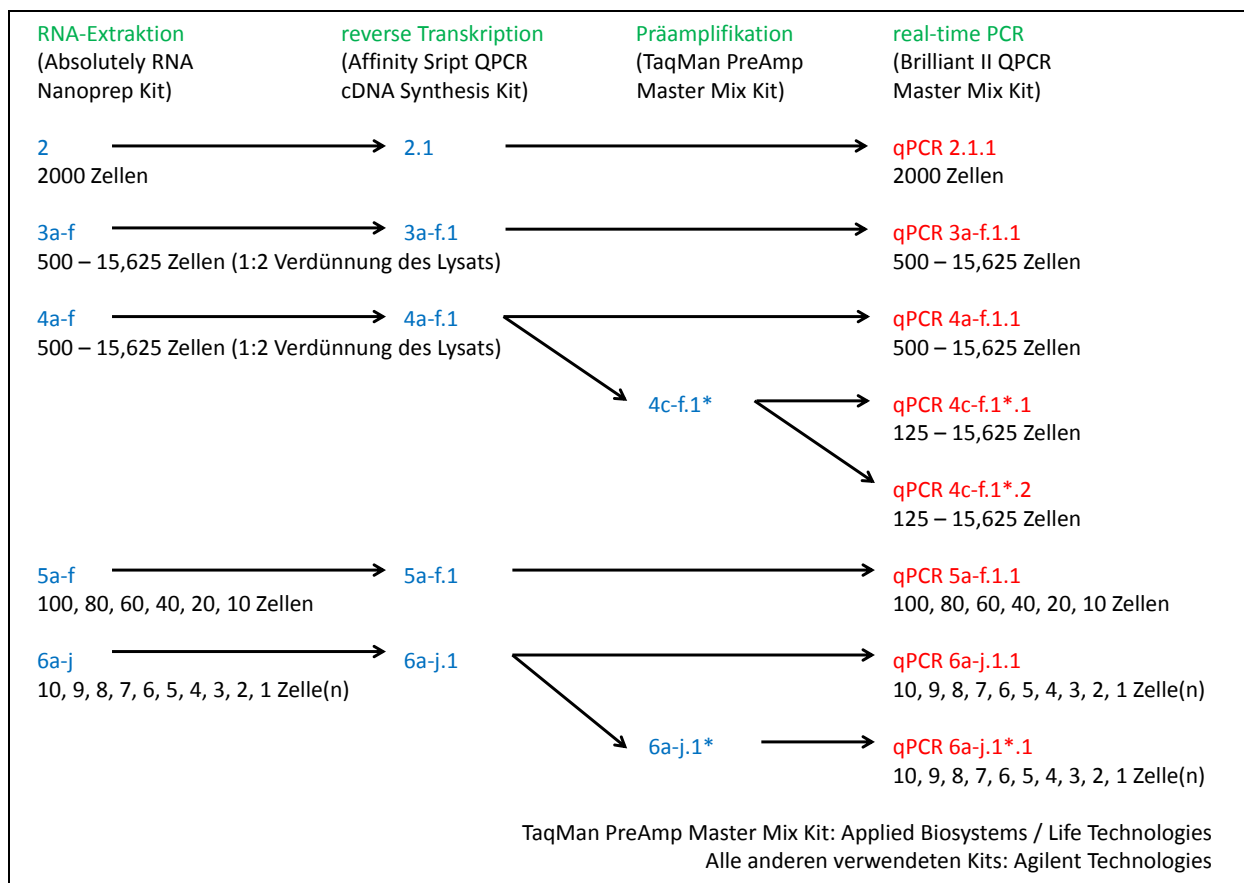


Abbildung 6-16: Arbeitsschritte zur Untersuchung von unfixierten U937 Zellen ≤ 2000 Zellen.

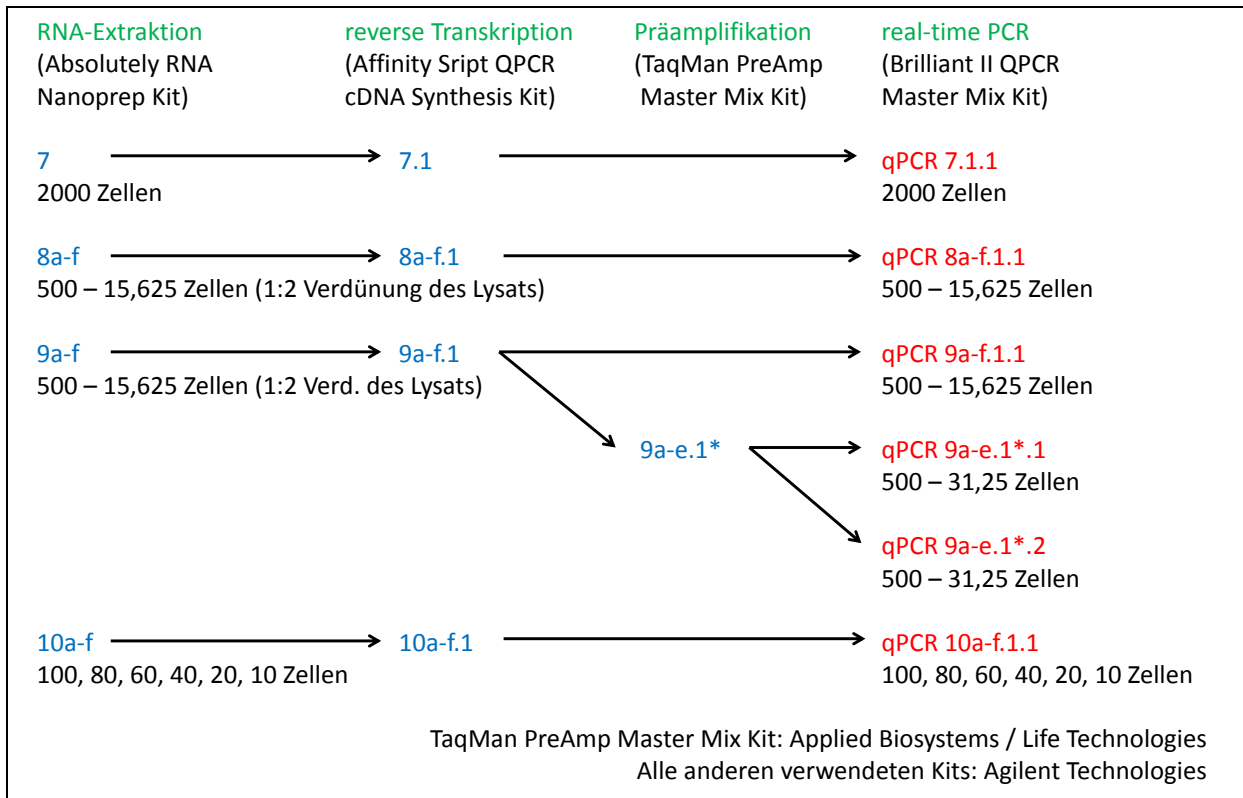


Abbildung 6-17: Arbeitsschritte zur Untersuchung von Aceton-fixierten U937 Zellen ≤ 2000 Zellen.

Tabelle 6-21: Darstellung der Expressionsmuster von *GUSB* und *PTPRC* der Läufe qPCR 5a-j.1.1 und qPCR 5a-j.1*.1. Aufgeführt ist die Anzahl der erhaltenen Signale pro Triplet sowie die gemessenen CT-Werte. Konnten mehrere Signale detektiert werden, wurde der jeweilige Mittelwert der CT-Werte ermittelt. Range: 10 Zellen bis 1 Zelle (U937, unfixiert).

GUSB										
Zellzahl	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
qPCR 5a-j.1.1	1/3 38,16	0/3	1/3 38,00	0/3	2/3 38,10	0/3	1/3 37,94	0/3	0/3	0/3
qPCR 5a-j.1*.1	0/3	0/3	0/3	3/3 33,68	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
PTPRC										
Zellzahl	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
qPCR 5a-j.1.1	0/3	0/3	1/3 38,84	2/3 37,34	1/3 37,52	1/3 37,64	1/3 38,81	3/3 37,80	2/3 38,45	1/3 38,84
qPCR 5a-j.1*.1	0/3	0/3	0/3	3/3 32,92	3/3 32,09	3/3 32,44	0/3	3/3 33,48	0/3	0/3
3/3	Signal für 3 Proben des Triplets erhalten									
2/3	Signal für 2 Proben des Triplets erhalten									
1/3	Signal für 1 Probe des Triplets erhalten									
0/3	kein Signal erhalten									
Zahl	Mittelwerte der CTs									

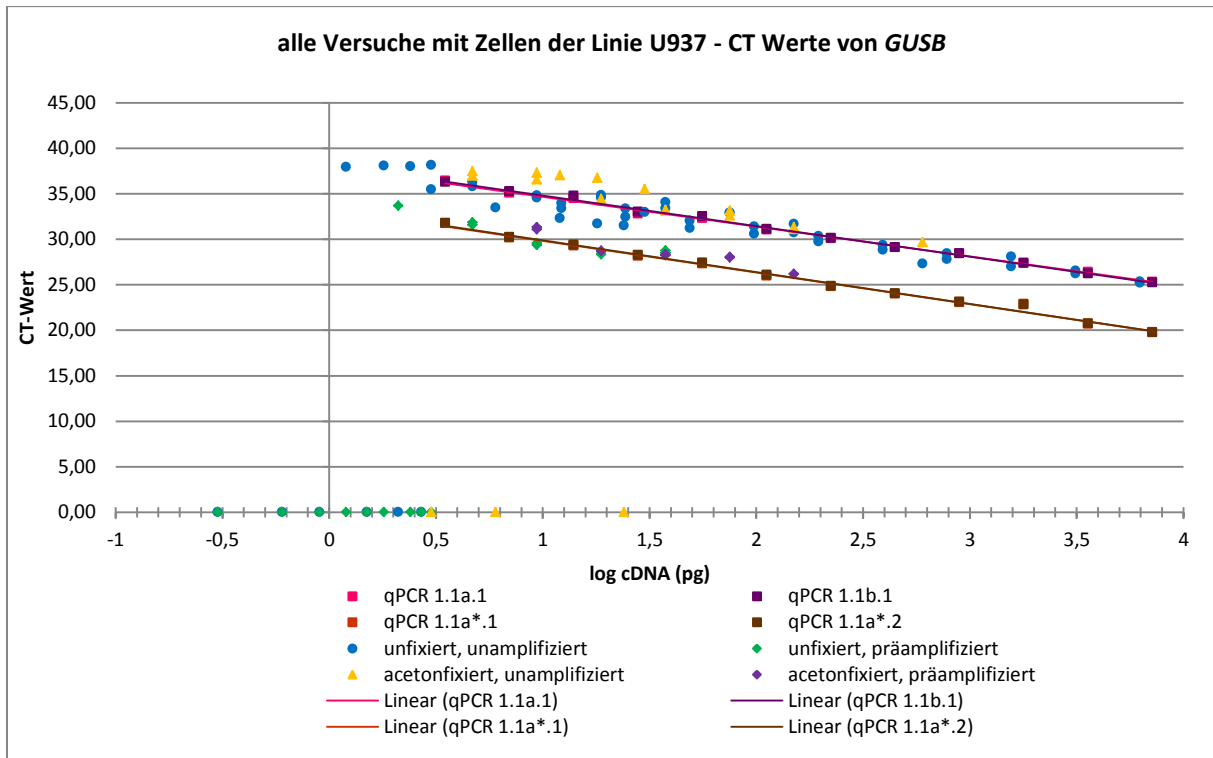


Abbildung 6-18: Expressionsmuster von *GUSB* aller durchgeführten Versuche mit Zellen der Linie U937. Die Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 und die präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 wurden zur Übersicht mit abgebildet. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 0,3 pg pro well.

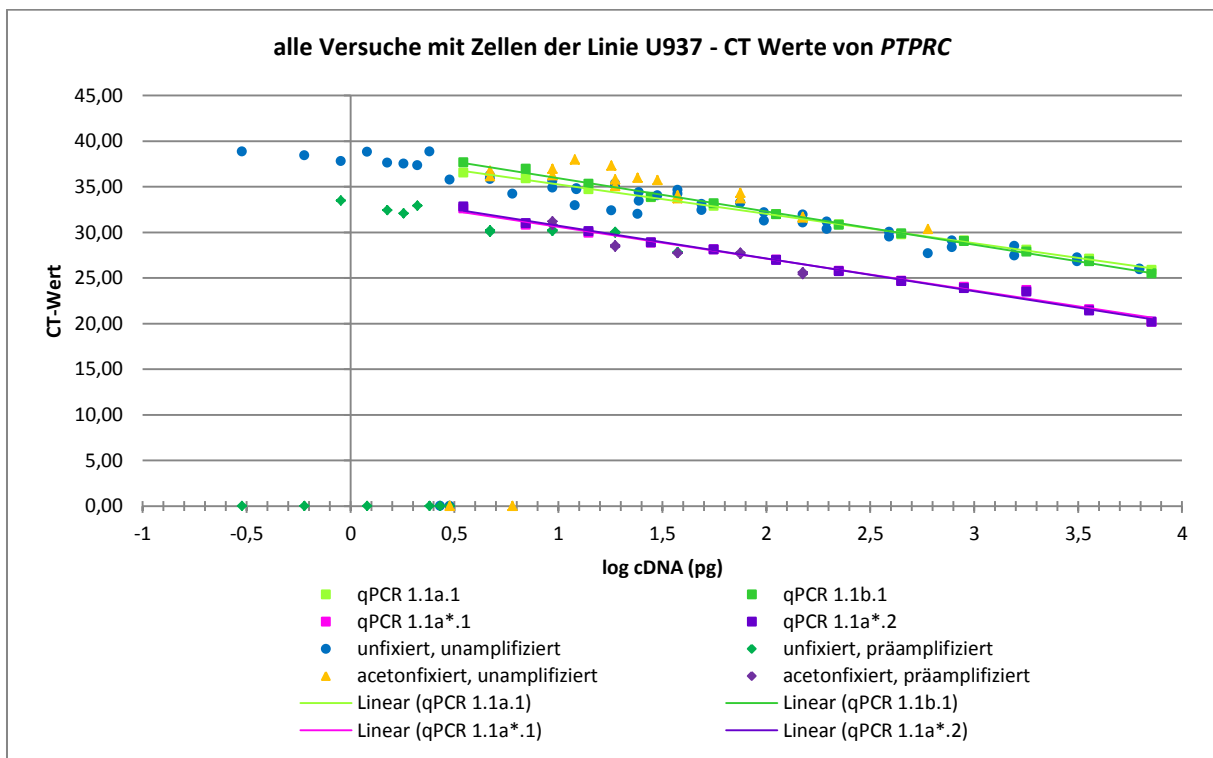


Abbildung 6-19: Expressionsmuster von *PTPRC* aller durchgeführten Versuche mit Zellen der Linie U937. Die Standardverdünnungsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 und die präamplifizierten Verdünnungsreihen qPCR 1.1a*.1 und qPCR 1.1a*.2 wurden zur Übersicht mit abgebildet. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Range: 7143 pg bis 0,3 pg pro well.

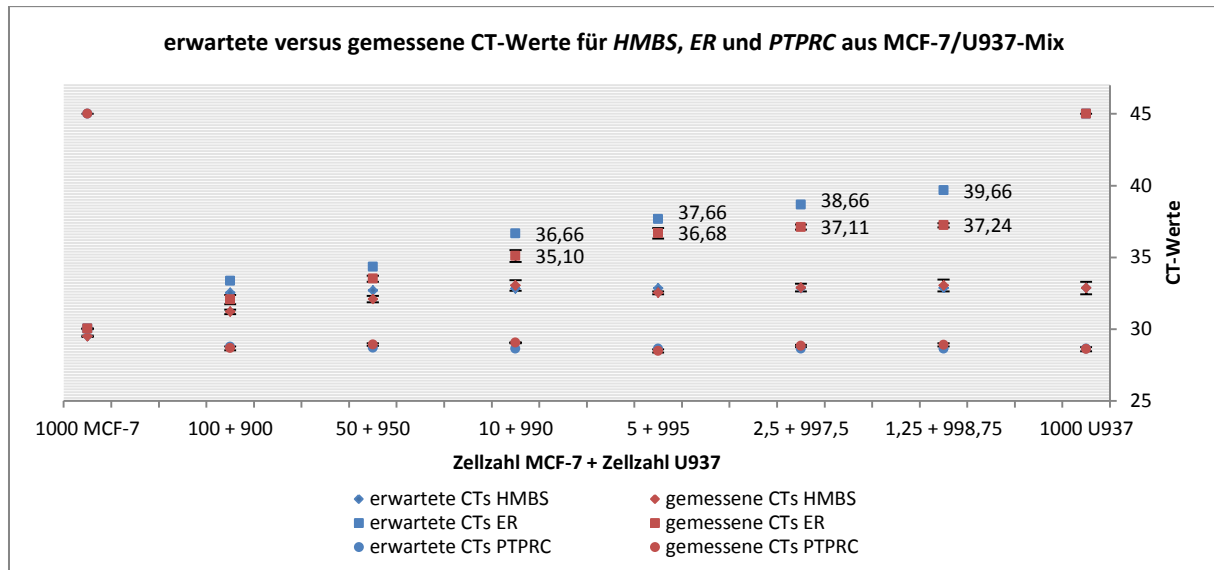


Abbildung 6-20: Expressionsmuster von *HMBS*, *ER* und *PTPRC* aus den Versuchen mit cDNA-Gemischen aus unfixierten Zellen der Linien MCF-7 und U937. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen die Zellzahl-Gemische aus den Linien MCF-7 und U937. Weiterhin sind zum Vergleich die erwarteten CT-Werte abgebildet, welche sich aus den Geradengleichungen der Standardverdünnsreihen der jeweiligen Zelllinien, unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse, ergeben.

Tabelle 6-22: Darstellung der *ER/HMBS*- sowie der *PTPRC/HMBS*-Ratio der gemischten cDNA-Proben aus unfixierten MCF-7 und U937 Zellen. Zum Vergleich sind die erwarteten *ER/HMBS*- bzw. *PTPRC/HMBS*-Ratiowerte abgebildet, welche sich aus den Standardverdünnsreihen qPCR 1.1a.1 und qPCR 1.1b.1 der jeweiligen Zelllinien, unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse, ergeben, mit Abweichung von 30% und dem sich daraus ergebenden minimalen und maximalen normalisierten Grenzwert. Abweichungen von über 30% sind orange markiert.

Zellzahl MCF-7 + Zellzahl U937	<i>ER/HMBS</i>				<i>PTPRC/HMBS</i>			
	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	errechneter $2^{-\Delta CT}$	Min Limit	Max Limit	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	errechneter $2^{-\Delta CT}$	Min Limit	Max Limit
1000 MCF-7	0,70	0,70	0,49	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00
100 + 900	0,57	0,55	0,40	0,74	13,54	5,84	9,48	17,60
50 + 950	0,32	0,37	0,22	0,41	16,05	8,98	11,24	20,87
10 + 990	0,07	0,24	0,05	0,09	18,36	15,93	12,85	23,87
5 + 995	0,04	0,06	0,02	0,05	18,67	16,56	13,07	24,27
2,5 + 997,5	0,02	0,05	0,01	0,02	18,83	16,80	13,18	24,47
1,25 + 998,75	0,01	0,05	0,01	0,01	18,90	17,59	13,23	24,58
1000 U937	0,00	0,00	0,00	0,00	18,98	19,16	13,29	24,68

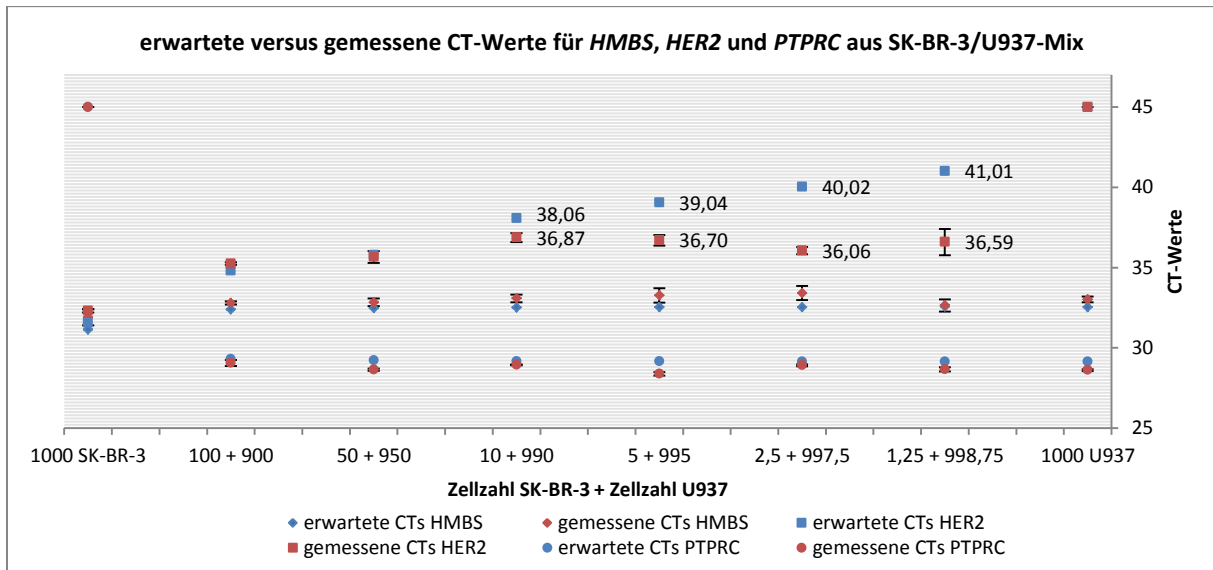


Abbildung 6-21: Expressionsmuster von *HMBS*, *HER2* und *PTPRC* aus den Versuchen mit cDNA-Gemischen aus unfixierten Zellen der Linien SK-BR-3 und U937. Aufgetragen sind die aus den Triplikaten errechneten Mittelwerte der CT-Werte mit Standardabweichung gegen die Zellzahl-Gemische aus den Linien SK-BR-3 und U937. Weiterhin sind zum Vergleich die erwarteten CT-Werte abgebildet, welche sich aus den Geradengleichungen der Standard-verdünnungsreihen der jeweiligen Zelllinien, unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse, ergeben.

Tabelle 6-23: Darstellung der *HER2/HMBS*- sowie der *PTPRC/HMBS*-Ratio der gemischten cDNA-Proben aus unfixierten SK-BR-3 und U937 Zellen. Zum Vergleich sind die erwarteten *HER2/HMBS*- bzw. *PTPRC/HMBS*-Ratiowerte abgebildet, welche sich aus den Standardverdünnungsreihen der jeweiligen Zelllinien, unter Berücksichtigung der jeweiligen cDNA-Mischverhältnisse, ergeben, mit Abweichung von 30% und dem sich daraus ergebenden minimalen und maximalen normalisierten Grenzwert. Abweichungen von über 30% sind orange markiert.

Zellzahl SK-BR-3 + Zellzahl U937	<i>HER2/HMBS</i>				<i>PTPRC/HMBS</i>			
	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	errechneter $2^{-\Delta CT}$	Min Limit	Max Limit	erwarteter $2^{-\Delta CT}$	errechneter $2^{-\Delta CT}$	Min Limit	Max Limit
1000 SK-BR-3	0,76	0,75	0,53	0,99	0,00	0,00	0,00	0,00
100 + 900	0,15	0,18	0,11	0,20	17,63	13,30	12,34	22,92
50 + 950	0,08	0,14	0,06	0,10	19,34	18,25	13,54	25,14
10 + 990	0,02	0,07	0,01	0,02	20,79	17,51	14,55	27,02
5 + 995	0,01	0,09	0,01	0,01	20,97	29,79	14,68	27,27
2,5 + 997,5	0,00	0,16	0,00	0,01	21,07	22,68	14,75	27,39
1,25 + 998,75	0,00	0,06	0,00	0,00	21,11	15,78	14,78	27,45
1000 U937	0,00	0,00	0,00	0,00	21,16	21,11	14,81	27,51

Tabelle 6-24: Darstellung der aus den den Läufen qPCR 19-21 errechneten *HER2/HMBS*-Ratio ($2^{-\Delta CT}$), jeweils getrennt für Proben mit und ohne Draht sowie gemittelte Werte aus den jeweiligen Proben mit und ohne Draht und Darstellung von Intra- und Inter-Assay-Varianzen. Untersuchte Zellen stammen aus der Linie SK-BR-3, unfixiert und Aceton-fixiert (qPCR 19c-d.1.1), zum Teil mit Draht. Range: 100 bis 1,56 Zellen. Abweichungen der normalisierten Werte ($2^{-\Delta CT}$) von über 30% vom Mittelwert der Verdünnungsschritte 1-7 der SK-BR-3-Standardverdünnungsreihen sind rot markiert, Intra-Assay Varianzen über 20% und Inter-Assay Varianzen über 30% sind gelb markiert.

SK-BR-3		<i>HER2/HMBS</i>					
		ohne Draht		mit Draht		beide Läufe	
Lauf	Zellzahl	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Intra-AV	$2^{-\Delta CT}$	Inter-AV
qPCR 19a-b.1.1 unfix.	100	0,54	11,47%	0,60	6,99%	0,57	6,37%
qPCR 19c-d.1.1 acetonfix.	100	-	-	-	-	-	-
qPCR 20a-b.1.1 unfix.	100	0,57	17,09%	0,54	16,79%	0,55	3,76%
qPCR 20a-b.1*.1 unfix.	100	0,03	94,50%	0,10	6,81%	0,06	74,74%
qPCR 21a-b.1.1a unfix.	100	0,60	24,58%	0,60	15,00%	0,60	0,98%
qPCR 21a-b.1.1b unfix.	25	0,39	19,82%	0,32	29,83%	0,36	14,49%
qPCR 21a-b.1.1c unfix.	6,25	0,85	29,57%	0,42	36,77%	0,64	48,88%
qPCR 21a-b.1.1d unfix.	1,5625	0,73	48,69%	-	-	-	141,42%

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation und für seine fachlichen Ratschläge.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Viktor Magdolen für die Begutachtung und Prüfung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Rudolf Napieralski für die optimale Einarbeitung in die Labortechniken und für seine immerwährende Bereitschaft zu Beratung und Gespräch.

Bei Frau Sandra Hippauf und Frau Rosalinde Bräuer möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Bebrütung der Zellkulturen bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Dipl.-Phys. Klaus Lücke und der GILUPI GmbH für die Bereitstellung von Forschungsdrähten und finanziellen Mitteln zur Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Peters, Herrn Dr. rer. nat. Normann Goodwin, Herrn StD Christian Kreikle und meinem Partner Herrn Patrick Peters möchte ich für ihre konstruktive Kritik und technische Unterstützung bei Erstellung dieser Dissertation danken.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Sabine Lüdtké
Geburtsdatum	25.01.1987
Geburtsort	Ulm
Familienstand	ledig

Schulbildung

1993 – 1997	Grundschule Neu-Ulm/Pfuhl
1997 – 2006	Bertha von Suttner Gymnasium Neu-Ulm/Pfuhl
2004	Hoelters Schule, Villa Ballester, Buenos Aires, Argentinien
2006	Abitur

Studium der Humanmedizin

WS 2006 – SS 2008	Vorklinisches Studium an der Semmelweis Universität, Budapest
2008	Physikum
WS 2008 – SS 2011	Klinisches Studium an der Universität Ulm
WS 2009/10	Klinisches Studium an der Université de Franche-Comté, Besançon
WS 2011 – WS 2012	Praktisches Jahr an den Universitäten Bern, Université Pierre et Marie Curie de Paris, University of Sydney und Ludwig-Maximilians-Universität München
5/2013	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Facharztausbildung zur Allgemeinärztin

9/2013 – 3/2014	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg, Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Mark Berneburg
4/2014 – 12/2014	Forschung an der Technischen Universität München im Bereich der Gynäkologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt
1/2015 – 3/2015	Assistenzärztin in der pädiatrischen Praxis von Frau Dr. med. Daniela Heuschmann in Regensburg
4/2015 – 12/2016	Assistenzärztin in der internistischen und hausärztlichen Praxis von Herrn Dr. med. Thomas Bächer in Regensburg, Lehrpraxis der Universität Regensburg
1/2017 bis dato	Assistenzärztin im Bereich der Inneren Medizin an der Kreisklinik Wörth an der Donau, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg, Ärztlicher Direktor: Dr. med. Wolfgang Sieber