



**Funktionale Charakterisierung des  
*macrophage capping protein* (CapG)  
und dessen Nachweis auf zirkulierenden Tumorzellen  
des Mammakarzinoms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Martin H.D. Neumann**

aus Köln

Düsseldorf, September 2015

Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2016

Teile dieser Dissertation werden veröffentlicht:

„Macrophage capping protein a putative oncogene affects gene expression of transmembrane glycoprotein non-metastatic B in breast cancer cells“,  
Neumann MHD et al., *Modern Pathol* eingereicht November 2015

„All for one, one for all: combining CellSearch and CellCelector enables the characterization of circulating tumor cells“,  
Neumann MHD et al. *Biotechnol Prog* voraussichtlich Anfang 2016

*für Sarah*

*Wer A sagt, der muss nicht B sagen.  
Er kann auch erkennen, dass A falsch war.*  
- Bertolt Brecht, 1898 - 1956

*Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt,  
sondern durch Arbeit und eigene Leistung.*  
- Albert Einstein, 1879 - 1955



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1	Kennzeichen maligner Neoplasien . . . . .	2
1.2	Prozess der Migration und Invasion . . . . .	4
1.3	Das Macrophage-capping Protein (CapG) . . . . .	5
1.4	CapG im Zusammenhang mit malignen Neoplasien . . . . .	6
1.5	CapG im Mammakarzinom . . . . .	6
1.6	Vorarbeiten zu dieser Arbeit . . . . .	7
1.7	Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) . . . . .	8
1.7.1	Isolierung von CTCs . . . . .	10
1.8	Zielsetzung . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Patientenproben . . . . .	13
2.1.1	Blutproben . . . . .	13
2.2	Zelllinien und Zellkultur . . . . .	14
2.2.1	Zelllinien . . . . .	14
2.2.2	Zellkultur . . . . .	14
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	15
2.2.4	Kryokonservierung und Re-Kultivierung . . . . .	15
2.3	Retrovirale stabile Überexpression von CapG . . . . .	15
2.4	RNA Silencing vermittelter Knock-Down von CapG . . . . .	16
2.5	Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen . . . . .	16
2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	16
2.7	Subzelluläre Fraktionierung . . . . .	17
2.8	SDS-PAGE und Immunoblotting . . . . .	18
2.8.1	Protein-Auftrennung mittels SDS-PAGE . . . . .	18
2.8.2	Immunoblotting . . . . .	19
2.8.3	Densitometrie . . . . .	19
2.9	Immunofluoreszenz . . . . .	19
2.9.1	CTCF - <i>corrected total cell fluorescence</i> . . . . .	20
2.9.2	Scoring . . . . .	20
2.10	Antikörper und immunomagnetische Beads . . . . .	21
2.11	Co-Immunpräzipitation . . . . .	23
2.12	ESI-MS/MS . . . . .	24
2.13	RNA-Isolation . . . . .	25
2.13.1	RNA-Isolation aus Zelllinien . . . . .	25
2.14	Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA . . . . .	25
2.15	qRT-PCR . . . . .	25
2.16	Microarray . . . . .	26
2.17	Whole Genome Amplification (WGA) . . . . .	27
2.18	Sequenzierung . . . . .	27
2.19	Quantifizierung, Anreicherung und Isolation von zirkulierenden Tumorzellen	27
2.19.1	Anreicherung mittels AdnaTest Breast Cancer Select/Detect . . . . .	27
2.19.2	Anreicherung und Quantifikation von EpCAM <sup>pos</sup> Einzelzellen . . . . .	28
2.19.3	Isolation mittels automatischer Mikromanipulation . . . . .	30
2.20	Gene Ontology . . . . .	31
2.21	Statistik . . . . .	32

2.21.1	Statistik mit R . . . . .	32
2.21.2	Statistik mit SPSS . . . . .	32
2.21.3	<i>Cut-Off</i> -Definition der CapG-Expression in den Tumorproben . . .	32
2.21.4	ROC-Analyse . . . . .	33
2.21.5	Statistik-Microarray . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Patientendaten und klinisch-pathologische Parameter . . . . .	34
3.2	CapG Expression in Brustkrebszelllinien . . . . .	38
3.3	Subzelluläre Verteilung von CapG . . . . .	40
3.4	Microarray basierte Transkriptomanalyse des Zellkulturmodells zeigt ein CapG-abhängiges Expressionsprofil . . . . .	41
3.5	<i>Gene Ontology</i> -Analyse der Microarray-Ergebnisse . . . . .	47
3.6	CapG- und GPNMB-Expression ist assoziiert mit der Progression vom dukta- len Karzinom <i>in situ</i> zum invasiven dukta- len Karzinom . . . . .	49
3.7	GPNMB-Expression in Abhängigkeit zur CapG-Expression im Zellkultur- modell . . . . .	50
3.8	Untersuchung des CapG-Interaktoms . . . . .	52
3.9	CapG in zirkulierenden Tumorzellen (CTC) . . . . .	56
3.9.1	Technologie-Etablierung zur Isolation von CTCs . . . . .	58
3.9.2	Optimierung der Isolationsparameter . . . . .	58
3.9.3	Etablierung des Mikromanipulations-Systems CellCelector . . . . .	59
3.9.4	CapG-Expression in zirkulierenden Tumorzellen . . . . .	63
3.10	CapG Expressionsanalyse von CTCs von Mammakarzinom Patientinnen . .	64
3.11	Machbarkeitsnachweis: Sequenzierung isolierter EpCAM <sup>pos</sup> CTCs nach Im- munfluoreszenzfärbung . . . . .	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	CapG-Expression in Brustkrebsproben und Zelllinien . . . . .	71
4.2	CapG-Lokalisation im Nucleus . . . . .	72
4.3	CapG übt Einfluss auf die Gen-Expression aus . . . . .	73
4.4	Einfluss auf die Gen-Expression des Transmembran-Glykoproteins GPNMB durch CapG . . . . .	75
4.5	Untersuchung des CapG-Interaktoms validiert CapG-Einfluss auf die Gen- Expression . . . . .	77
4.6	Mögliche Ursachen erhöhter CapG-induzierter Invasivität . . . . .	78
4.7	CTC-Isolation . . . . .	79
4.8	CapG <sup>pos</sup> -CTCs . . . . .	81
4.9	Machbarkeitsnachweis: Sequenzierung von isolierten CTCs . . . . .	82
4.10	Schlussbetrachtung und Ausblick . . . . .	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>88</b>

<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
8.1	Potentielle CapG-Interaktionspartner . . . . .	99
8.2	CellCelector - Bestandteile . . . . .	106
8.3	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	106
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung</b>	<b>112</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Kennzeichen maligner Neoplasien . . . . .	3
2	CapG-abhängiges Invasionspotential im Zellkulturmodell . . . . .	8
3	Schema der Zirkulierende Tumorzellen . . . . .	9
4	Veranschaulichung der Ratio der CTC-Anzahl zum Blut-Hintergrund . . .	10
5	Ablauf der Blutprobenprozessierung mittels CellSearch . . . . .	29
6	Beschreibung des Mikromanipulatorsystem CellCelector . . . . .	31
7	CapG Expression in Tumorproben . . . . .	36
8	CapG ROC-Analyse . . . . .	38
9	Invasionspotential von CapG in Zelllinien . . . . .	40
10	Subzelluläre Lokalisation von CapG . . . . .	41
11	CapG-abhängiges Genexpressionsprofil mittels Microarray . . . . .	44
12	<i>Gene Ontology</i> -Analyse der Microarray-Daten . . . . .	48
13	Erhöhte CapG- und GPNMB-Expression im invasiven duktalem Karzinom	50
14	GPNMB-Expression im Zellkulturmodell . . . . .	51
15	Venn Diagramm der Anzahl potentieller CapG-Interaktionspartner . . . . .	52
16	CapG-Interaktionspartner im Kontext der biologischen Funktion . . . . .	54
17	CapG-Interaktionspartner im Kontext der zellulären Komponente . . . . .	55
18	GO-Analysen zur CapG-Funktion verglichen zu bekannten Interaktions- partnern . . . . .	56
19	GO-Analysen der CapG-Interaktionspartner im Kontext der zellulären Kom- ponente . . . . .	56
20	CapG mRNA Nachweis in zirkulierenden Tumorzellen . . . . .	57
21	Optimierung der Isolationsparameter - Aspirationsvolumen und -höhe . . .	59
22	Prüfung der Bildgebung des CellCelectors . . . . .	60
23	Prüfung der Leistungsfähigkeit des CellCelectors . . . . .	61
24	Post-CellSearch Isolation von CTCs mittels CellCelector-System . . . . .	62
25	Arbeitsablauf der Probenprozessierung . . . . .	63
26	CellSearch-Prozess weist keinen Einfluss auf Downstream geführte Immun- fluoreszenzfärbung auf . . . . .	64
27	CapG-Expression in CTCs - Quantifizierung der Immunfluoreszenzaufnah- men . . . . .	65
28	CTC-Klassifizierung nach CapG-Status . . . . .	67
29	<b>Whole Genome Amplification</b> von CapG <sup>pos</sup> -CTCs . . . . .	69
30	Sequenzierung von CTCs und Zelllinien nach Mikromanipulation . . . . .	70
31	Mechanismen der CapG-Überexpression und die Folgen . . . . .	85
32	CapG im komplexen Kontext von Physiologie und Neoplasie . . . . .	105
33	CellCelector-Bestandteile . . . . .	106

## Tabellenverzeichnis

1	Liste der verwendeten Zelllinien . . . . .	14
2	Liste der verwendeten Antikörper . . . . .	21
3	Klinische und histopathologische Daten des Patientenkollektivs . . . . .	35
4	Assoziation der klinisch-pathologischen Parameter und der CapG Expression	37
5	Signifikant differentiell exprimierte Gene vom Microarray . . . . .	45
6	Hervorgehobene CapG-Interaktionspartner . . . . .	53
7	CellCelector-Etablierung . . . . .	60
8	CapG-Expression in CTCs, WBCs und Zelllinien [CTCF-Werte] . . . . .	65
9	CTC-Technologien . . . . .	80
10	Potentielle CapG-Interaktionspartner . . . . .	99

## 1 Einleitung

### 1.1 Kennzeichen maligner Neoplasien

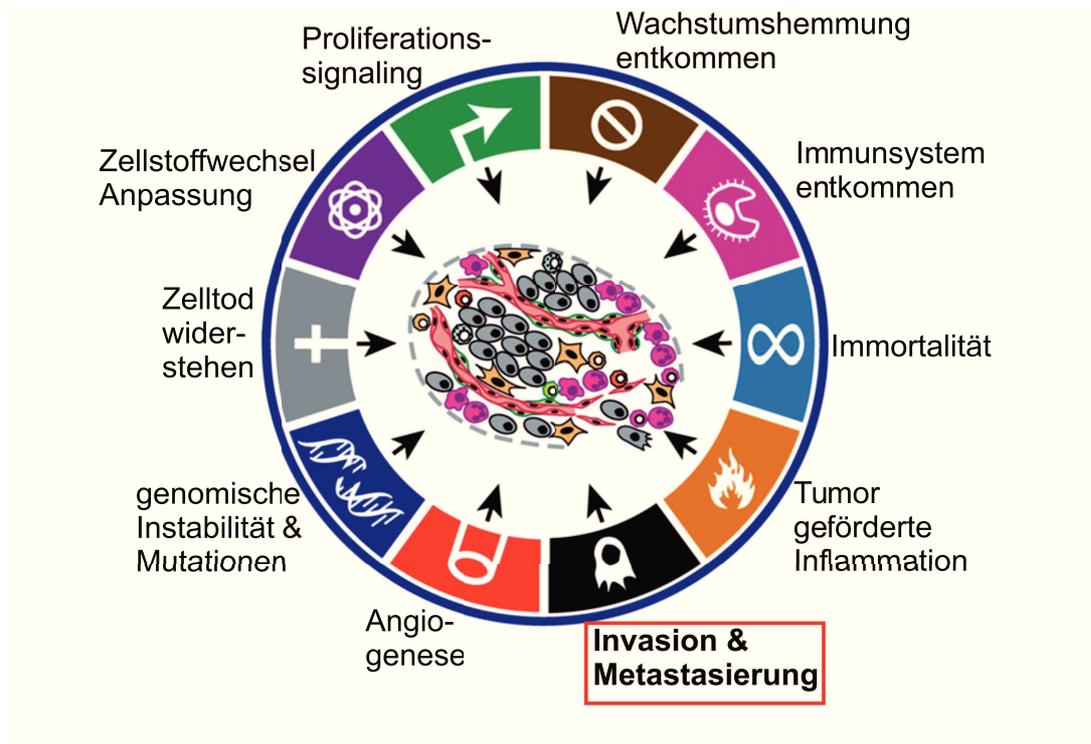
Der Entstehung von Krebs liegt ursprünglich eine genetische Veränderung zugrunde, wobei Zellen maligner Neoplasien grob zwei Eigenschaften aufweisen:

**Unkontrollierte Proliferation** - Sie weisen ein exzessives Wachstum unter Missachtung physiologischer Regulationsmechanismen auf.

**Migration und Invasion** - Sie sind in der Lage, umliegendes und distales Gewebe zu infiltrieren.

Ist nur die erste Eigenschaft vorhanden spricht man von einem benignen, "gutartigen", Tumor. Um eine maligne Neoplasie handelt es sich, wenn beide Eigenschaften vorhanden sind. Diese zweite Eigenschaft ermöglicht es Krebszellen sich vom Primärtumor zu lösen, in umliegendes Gewebe (Stroma) einzuwandern, schließlich in Blut- und Lymphbahnen zu gelangen und diese per Extravasation wieder zu verlassen. Diese zweite Eigenschaft ist die Prämisse für den deutlich komplexeren Vorgang der Dissemination und final der Bildung von Metastasen. Die Metastasierung ist klinisch bedeutsam, da das therapeutische Potential deutlich limitiert ist, sodass sie für 90% der Todesfälle verantwortlich ist[31][10]. In Abbildung 1 sind nach Hanahan und Weinberg[41] die 10 Kennzeichen (Hallmarks) maligner Neoplasien symbolisch dargestellt.

Die **Hallmarks of Cancer** sind ein Prinzip, um die äußerst komplexen Vorgänge der Tumorentstehung besser zu verstehen. Eines dieser Kennzeichen ist die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (rot umrandet, Abb. 1), wodurch Krebs als eine systemische Erkrankung mit schlechter Prognose angesehen werden kann.



**Abb. 1: Kennzeichen maligner Neoplasien nach Hanahan und Weinberg[41].** Tumorzellen weisen gewisse Kennzeichen (Hallmarks) auf, die während des mehrschrittigen Prozesses der Tumorentstehung erworben werden oder vorliegen müssen. Ein Tumor weist einen hohen Stoffwechsel und Energiebedarf auf, insbesondere ab einer gewissen Größe wird die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) notwendig, um diesen Bedarf zu decken. Tumorzellen weisen genomische Instabilität, d.h. DNA-Veränderungen, auf und erwerben einen Widerstand gegen die Apoptose (programmierter Zelltod). Sie reprogrammieren ihren Zellstoffwechsel, um sich auf Veränderungen der Tumormikroumgebung einzustellen, beispielsweise die Reaktion auf Hypoxie. Weiterhin erwerben Tumorzellen häufig Mutationen, die eine ständige Aktivierung bestimmter Signalwege zur Folge haben, wie z.B. in ca.40% der Melanome eine Strukturveränderung des B-Raf-Proteins zur ständigen mitogenen Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges führt[25]. Zudem können Tumorzellen von wachstumshemmenden Signalwegen entkoppelt sein oder dem Immunsystem entkommen. Sie erwerben die Fähigkeit der Immortalität, beispielsweise durch Reaktivierung von Telomerasen. Tumor-bedingte Entzündungsreaktionen nehmen Einfluss auf das Mikromilieu und liefern u.A. Wachstumsfaktoren oder führen zu Veränderungen der extrazellulären Matrix (ECM). Der komplexe Vorgang der Invasion-Metastasierungskaskade (IMC)[112] erlaubt den Tumorzellen den epithelialen Primärtumor zu verlassen, die Basallamina zu durchbrechen, durch das Bindegewebe zu migrieren und in Blut- und Lymphgefäße einzudringen. Anschließend können CTCs im Flüssigkeitsstrom überleben, die Gefäßwand durchbrechen und an dieser neuen Stelle siedeln und überleben. Diese Fähigkeit führt zur systemischen schwer therapierbaren Krebserkrankung.

## 1.2 Prozess der Migration und Invasion

Die Karzinomentwicklung gipfelt in lokalen Infiltrationen und Fernmetastasierung. Die Invasions-Metastasierungs-Kaskade[112] ist ein mehrstufiger sequenzieller Prozess aus eigenständigen Schritten (vergleiche Abb. 3 auf Seite 9). Zunächst erfolgt die Reduzierung des Zell-Zell-Kontaktes mit benachbarten Zellen und die Abwanderung vom Primärtumor von möglicherweise einzelnen Zellen. Beispielsweise durch den Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, welches an der Bildung von *adherens junctions* beteiligt ist. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Überexpression von E-Cadherin zu einer geringeren Invasivität führte, während ein Knock-Down den gegenteiligen Phänotyp verursachte. In Karzinomen ist häufig eine Suppression oder Inaktivierung von E-Cadherin zu beobachten [12][17]. Zusätzlich werden bei aggressiven Karzinomen andere Zell-Zell oder Zell-ECM Adhäsionsmoleküle überexprimiert, welche unter physiologischen Bedingungen an der Zellmigration während der Embryogenese beteiligt sind. N-Cadherin, zum Beispiel, ist während der Organogenese an der Migration von Neuronen und mesenchymalen Zellen beteiligt, wird aber in invasiven Karzinomzellen überexprimiert[17].

Zudem ist ein *Rearrangement* und Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) beim invasiven Progress der Tumorzellen zu verzeichnen. Hierbei sezernieren die Tumorzellen Proteasen, häufig aus der Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und degradieren die ECM[33][79]. Invasive Tumorzellen exprimieren verstärkt bestimmte FACIT Collagene (**F**ibril **A**ssociated **C**ollagens with **I**nterrupted **T**riple **H**elices), wie COL12A1, COL16A1 und COL19A1, die im Zusammenhang mit Invasivität beschrieben wurden[9][4]. Am Anfang der Invasion dienen bestimmte FACIT Collagene als erste Adhäsionspunkte und als *attractants* (Lockstoffe, Lockboten), an denen die Tumorzellen adhären und migrieren können. Hierzu werden unter Beteiligung dieser Gruppe von Collagenen sogenannten *Focal Adhesion Contacts* ausgebildet[33][9]. *Focal Adhesion Contacts* (FACs) sind verankernde Zellverbindungen, die das Actin-Cytoskelett mit der Zelle mechanisch an das Substrat (ECM) koppeln[9]. Folglich binden infiltrierende Tumorzellen an (FACIT)-Collagene, re-strukturieren und degradieren die umliegende ECM und adhären schließlich an der Basalmembran. Die Basalmembran ist eine avaskuläre und azelluläre Struktur mit Stützfunktion für den Aufbau des Endothels und eine kritische Barriere für die Tumorzell-Dissemination. Bei der Entwicklung von duktalem Karzinomen wird die Basalmembran des Brustgewebes fragmentiert und es kann zu einer Infiltration kommen[9][4][33]. Die zentrale Prämisse für die Dissemination von Tumorzellen ist die Fähigkeit zur Zellmotilität. Die Zellmotilität ist ein komplexer Prozess und bedarf der koordinierten Extension von Pseudopodia, Membran-Ruffling (aktive Veränderungen der Zellmembran), Ausbildung von FACs und Anheftung an die ECM [33][79]. Für diese Abläufe wird eine Regulation des Actin-Cytoskeletts notwendig[33][28]. An dieser Regulation sind diverse Actin-bindende Proteine (ABP) beteiligt, die den Polymerisationszustand modulieren und

so den Auf- oder Abbau von Actin-Filamenten kontrollieren. Beispielsweise werden die in der Zellmotilität involvierten Gen-Produkte Cofilin, Vinculin, Zyxin und Moesin häufig in Tumoren verstärkt exprimiert[19]. Ein weiteres ABP ist das *macrophage-capping protein* (CapG).

### 1.3 Das Macrophage-capping Protein (CapG)

Die hohe Actin-Dynamik und schnelle Re-Organisation des Cytoskeletts sind Charakteristika von Makrophagen. Daher werden Actin-modulierende Proteine in höheren Mengen exprimiert. CapG liegt in Makrophagen als Actin-modulierendes Protein mit 0,9 - 1% des cytoplasmatischen Gesamtproteins in relativ hohen Mengen vor[50]. CapG führt unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit zum Blockieren (cappen) der wachsenden F-Actin-Filamente und ermöglicht damit eine gesteigerte Actin-Dynamik[35][78]. Dadurch erhöht sich die kritische Konzentration von G-Actin, welches für nicht schnell wachsende Actin-Filamente zur Verfügung steht.

CapG ist ein ca. 40 kDa schweres Protein mit 348 Aminosäuren[127] und wurde erstmals aus Kaninchen-Makrophagen isoliert[106]. Es gehört zur Gelsolin-Familie, wobei 49% der genomischen Sequenz mit der von Gelsolin identisch ist[50]. CapG ist sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert, wobei die Funktion im Zellkern völlig unbekannt ist. Innerhalb der Gelsolin-Familie weisen noch zwei weitere Mitglieder neben der cytoplasmatischen eine Kernlokalisierung auf: Flightless-1 und Supervillin[75][126][62][102]. Interessanterweise besitzt CapG keine *nuclear export sequence* (NES), insbesondere die entscheidenden Leucine (L17, L21 und L27) fehlen. Allerdings liegt eine *nuclear localization sequence* (NLS)-ähnliche Domäne vor[119]. Diese liegt zwischen den Aminosäuren 134 und 147 innerhalb der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ )-Bindungsdomäne, welche funktional äquivalent mit einer canonischen NLS-Sequenz ist[78][27]. Die Translokation zum Nukleus scheint mit der Phosphorylierung assoziiert zu sein[71]. Der Kernimport von CapG wird Importin $\beta$ -abhängig von *nuclear transport factor 2* (NFT2) und Ran-GTPase vermittelt. NFT2 und Ran-GTPase sind zwei Hauptregulatoren für den Cytoplasma-Kern-Transport[120].

Wie bereits erwähnt besitzt CapG eine  $\text{PIP}_2$ -Bindungsdomäne. Die CapG Interaktion mit  $\text{PIP}_2$  führt zur Dissoziation und Freigabe der Actin-Filamente was darauf schließen lässt, dass CapG im Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg eine Rolle spielen könnte[127][102]. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass im Zellkern CapG mit PI3K interferiert[64], wodurch CapG möglicherweise im Phosphatidylinositol-getriebenen Chromatin-Remodeling involviert sein könnte[83][108]. Weiterhin wurde im Zellkern die Interaktion von CapG mit Kern-Actin nachgewiesen, was auch hier auf eine Beteiligung von CapG an Kernprozessen[83] oder dem Kernexport von *protein kinase inhibitors* (PKI) hinweist[42].

Allerdings bleibt die genaue Funktion von CapG im Zellkern unbekannt.

## 1.4 CapG im Zusammenhang mit malignen Neoplasien

Die Überexpression und Kernpräsenz von CapG konnte im Zellkulturexperiment mit der Invasivität assoziiert werden: in MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) Zellen korrelierte die Kernlokalisation mit der verstärkten Invasivität[27] und auch in der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB 231 konnte die gleiche Beobachtung gemacht werden[85]. Allerdings konnten die genauen Mechanismen nicht entschlüsselt werden.

Dass CapG deutlich im Zusammenhang mit der Metastasierung steht, bewiesen kürzlich Van Impe und Kollegen mit einer spektakulären Nanobody-Technologie[121]. Hier generierten sie einen gegen CapG gerichteten Kamel-Antikörper<sup>1</sup>, der im Mausmodell endogenes CapG bindet und die Metastasierung deutlich reduzierte. Allerdings wurden keine Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Kernlokalisation genannt. Diese Arbeit von Van Impe *et al.* gliedert sich ein in die Reihe von klinischen Beobachtungen. Die Assoziation einer CapG-Überexpression mit unkontrollierter Migration, Invasion, höherem Tumorgrading und Lymphknoten-Metastasen wurde in diversen Tumorentitäten nachgewiesen. Diese Korrelation zwischen CapG-Expression und erhöhter Malignität wurde beispielsweise im Okular-Melanomen[117], Glioblastomen[61], Cholangiokarzinom[66], Kolorektalkarzinom[125], Pankreaskarzinom[113], NCSLC (Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom)[101][128] und Ovarialkarzinom[72][37] bestätigt.

## 1.5 CapG im Mammakarzinom

Im Jahre 2010 sind in Deutschland 477.300 Krebsneuerkrankungen registriert worden, wobei 218.258 Sterbefälle durch maligne Neoplasien verursacht wurden[89]. Das Mammakarzinom ist mit 32% aller Krebsneuerkrankungen die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau[107]. Mögliche intramammäre Mikroinfiltrationen bei Brustkrebs können sich auf Grund der frühzeitigen Transition vom duktalem Karzinom *in situ* (DCIS) zum invasiven duktalem Karzinom (IDC) als klinisch schwer erkennbar erweisen[99]). Daher sind mögliche unvollständige Resektionen und die damit verbundene Tendenz der Rezidivbildung gegeben. Ein Rest-Risiko der Metastasierung nach Entfernung des Primärtumors bleibt bestehen.

Ein tiefer gehendes Verständnis der molekularen Veränderungen sowie Detektion neuer Marker könnte die verantwortlichen Mechanismen aufdecken und somit als Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien sein.

Das Actin-bindende *macrophage capping protein*, CapG, wurde erstmals innerhalb eines

---

<sup>1</sup>Kamel-Antikörper bestehen nur aus der monomeren variablen Domänen der Schwereketten von "normalen" Antikörpern. Sie wurden in Vertretern der Familie der Kamele und Knorpelfischen entdeckt. Sie sind mit 12 - 15 kDa die kleinsten Antikörper.

Genom-weiten Screenings für differentiell regulierte Tumorsuppressor- und Onkogene zur Detektion neuer Brustkrebs-assoziierte Kandidaten mit gynäkologischen Tumoren in Verbindung gebracht[98]. Dahl und Kollegen wiesen in 31% (n=50) der Brustkrebsproben und 56% (n=14) der Ovarialkarzinomproben eine CapG-Überexpression nach[24]. Insbesondere in den invasiven Ausläufern vom Mammakarzinom konnte bei der Erstellung eines Massenspektrometrie-basierten Protein-Profiles eine CapG-Überexpression gemessen werden[51].

Die genaue Rolle von CapG in der Invasivität im Mammakarzinom ist noch unklar und die Erforschung von Cytoskelett-modulierenden und transformierenden Proteinen, wie das Actin-bindende Proteine CapG kann dabei helfen den Prozess der Zellinvasion auf zu decken.

## 1.6 Vorarbeiten zu dieser Arbeit

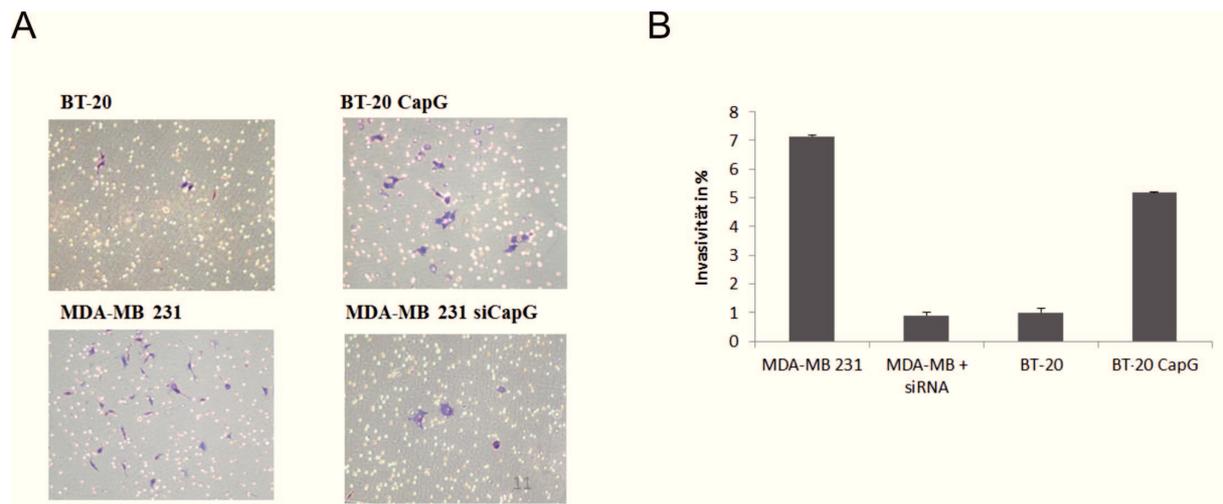
Daten dieser Arbeit bauen auf Vorarbeiten der Dissertation von Nicole Seier[100] und der Diplomarbeit von Carolin Schleithoff[96] auf. Diese Vorarbeiten bestanden aus:

- Stabile Überexpression von CapG in BT-20 Tumorzellen (BT-20/CapG)[100]
- Invasionsassay zum Nachweis der CapG induzierten Invasivität im Zellkulturmodell[100]
- Experimentelle Durchführung des Microarrays mit dem Zellkulturmodell (*Wet-Lab-Teil*<sup>2</sup>)[96]

Insbesondere der Nachweis, dass durch CapG-Überexpression das Invasionspotential in der niedrig invasiven Zelllinie BT-20 stark erhöht war bzw. nach CapG-Knock-Down in der hoch invasiven Zelllinie MDA-MB 231 drastisch abfiel, ist von Bedeutung (Abb. 2). Aus dieser Beobachtung wurde mit diesen Zelllinien ein Versuchs- und Zellkulturmodell etabliert.

---

<sup>2</sup> *Wet-Lab* (Nass-Labor) meint hier die Vorbereitung zur Messung. Im Zuge der vorliegenden Arbeiten wurden die erhaltenen Daten aus der Microarray-Messung bioinformatisch neu ausgewertet und analysiert.



**Abb. 2: CapG-abhängige Invasionspotential im Zellkulturmodell.** Abbildung und Daten entnommen von [100]. **A)** Repräsentative Bilder des Invasionsassays, durchgeführt mit den Zellen des Zellkulturmodells mit modulierter CapG-Expression. **B)** Quantifizierung des Invasionsassays.

## 1.7 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) sind eine enorm heterogene Population. Gemeinsam haben sie allerdings, dass sie alle von einem epithelialen Primärtumor abstammen und erfolgreich in den Blutstrom gelangt sind. Dass sie epithelialen Ursprungs sind, d.h. z.B. Cytokeratine exprimieren, wird bei der Suche nach einer geeigneten Definition genutzt. Der **Definition von CTCs**[3] liegen folgende Kriterien zugrunde (CellSearch-Kriterien):

**Positivität für Cytokeratine (CK)** - CTCs können über die immunologische Färbung der CK 8, 18 und 19 detektiert werden.

**Positivität für DAPI** - Es muss der Nachweise eines intakten Zellkerns vorliegen, dieser wird mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) erbracht.

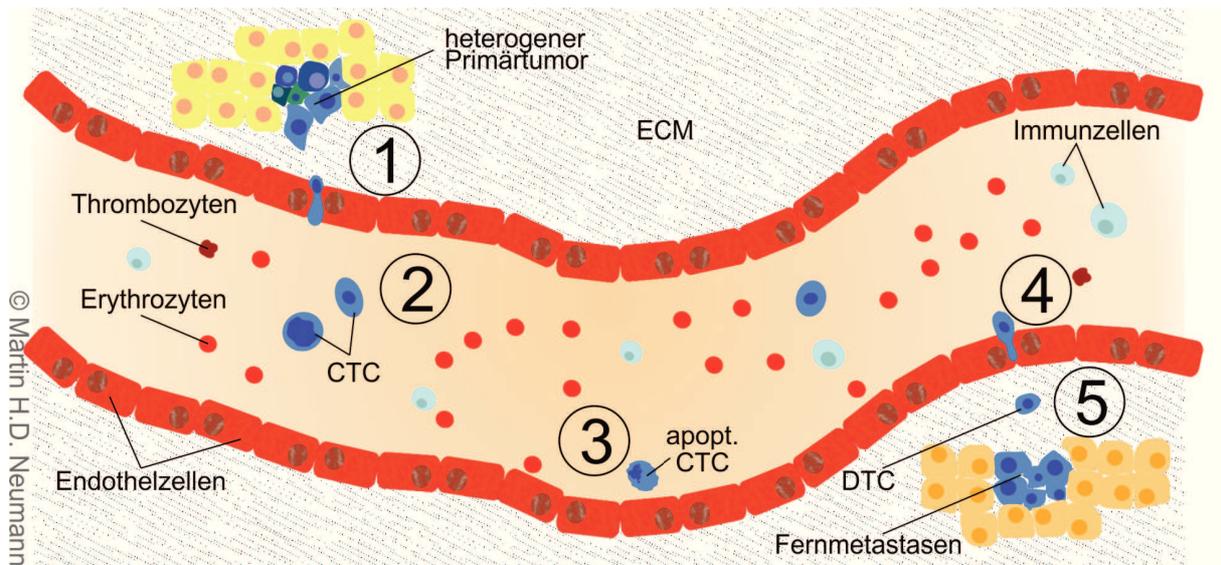
**Kern/ Cytoplasma - Ratio** - Das Verhältnis zwischen Zellkern und Cytoplasma sollte minimal 0,5 betragen (Zellkern sollte mindestens 50% des Cytoplasmas ausmachen).

**Negativität für CD45** - CTCs sind negativ für den Leukozytenmarker CD45.

**Zell-ähnliche Morphologie und Größe** - CTCs sind rund bis oval und mind.  $4\mu\text{m}$  bis max.  $40\mu\text{m}$  im Durchmesser.

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) wurden bereits 1869 von Thomas Ashworth als "...cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death" [6] beschrieben. Allerdings auf Grund des Fehlens geeigneter Detektions- und Isolationsmethoden sowie sensiblerer Möglichkeiten zur Charakterisierung erfolgten detailliertere Studien sehr viel später. CTCs besitzen das Potential Metastasen zu bilden[69], haben den Blutstrom per Intravasation bereits erreicht und somit teilweise den Prozess der Invasion und Metastasierung

(wie unter 1.2 beschrieben) erfolgreich abgeschlossen (① und ② wie in Abb. 3 schematisch dargestellt). Nach der Intravasation der CTCs in den Blutstrom, müssen diese anschließend den enormen Bedingungen, wie Scherkräften und immunologischen Reaktion, standhalten. Viele CTCs gehen zugrunde (Abb. 3,③) und nur wenige disseminieren in distales Gewebe als DTCs (**D**isseminierte **T**umorzellen, Abb. 3,④ und ⑤). In Folge dessen können die DTCs proliferieren und Metastasen ausbilden.

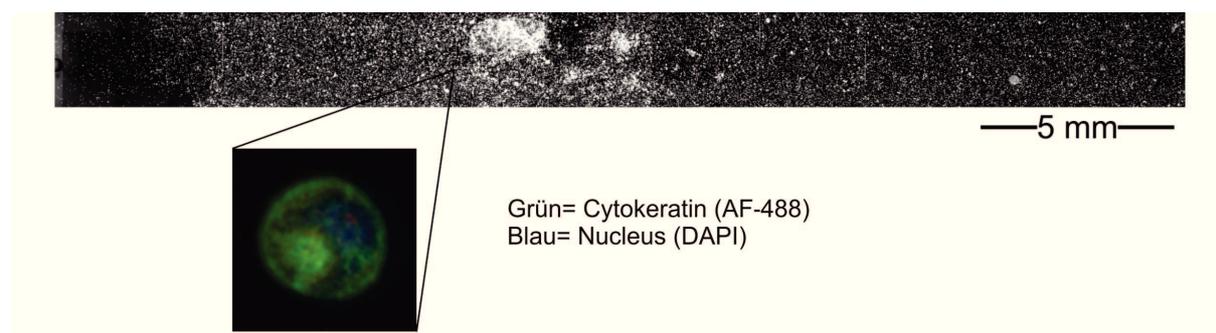


**Abb. 3: Schematischer Ablauf der Metastasierung durch CTCs.**①) CTCs lösen sich vom Primärtumor ab, infiltrieren benachbartes Gewebe und degradieren die extrazelluläre Matrix (ECM). Anschließend Intravasation in den Blutstrom. ②) Zirkulation von Tumorzellen im Blutstrom, wobei die Mehrzahl zugrunde geht (③). Extravasation an einem Zielort und Einwanderung in distales Gewebe (④). Disseminierte Tumorzellen (DTC) können proliferieren und Metastasen bilden (⑤).

Zirkulierende Tumorzellen sind aus tumorbiologischer und medizinischer Sicht besonders interessant, da ihre Anzahl im Blut einer Brustkrebspatientin mit dem Progressions-freien-Überleben sowie Gesamtüberleben korreliert[22]. Deshalb stellen CTCs als sogenannte *Liquid Biopsy* eine Möglichkeit dar, den Therapieerfolg zu bewerten[8]. In Brustkrebs führen CTC-Quantifizierungen zu einer besseren Vorhersage über den Therapieerfolg als bildgebende Verfahren[36]. Zudem repräsentieren sie die Tumorprogression deutlich besser, verglichen zu einer lokalen Tumorprobe, da sie als erfolgreich vom Primärtumor dissoziierte Zellen gelten können. Weiterhin ist die Gewinnung der Blutprobe als *Liquid Biopsy* schneller sowie weniger invasiv im Vergleich zu einer Gewebebiopsie.

Allerdings ist die Anzahl an CTCs im Blut meist relativ gering (veranschaulicht in Abb. 4). Mit etwa zehn zirkulierenden Tumorzellen unter  $6 \cdot 10^6$  Leukozyten,  $2 \cdot 10^8$  Thrombozyten und  $4 \cdot 10^9$  Erythrozyten pro ml Blut[3][21] sind CTCs relativ rar und schwer zu detektieren[93]. Erschwerend kommt hinzu, wie eingangs erwähnt, dass sie eine sehr heterogene Population bilden. Das heißt, sie variieren im Profil ihrer Oberflächenmarker, ihrer Größe und Morphologie sowie in ihrem Metabolismus. Dies führt zum Bedarf von

geeigneten Technologien zur Quantifizierung und Detektion sowie Isolation.



**Abb. 4: Veranschaulichung des Ratio der CTC-Anzahl zum Blut-Hintergrund.** Dargestellt ist der Hintergrund in einer CellSearch-Kartusche. Jeder weiße Punkt stellt eine Zelle dar, gezeigt ist der DAPI-Kanal (=Zellkern). Eine zirkulierende Tumorzelle (Grün= Cytokeratin, Blau= Nucleus) ist abgebildet, deren Maßstab ist nicht korrekt. Maßstabsangabe für die Kartusche (Scanbereich) ist angegeben.

### 1.7.1 Isolierung von CTCs

Die meisten Technologien umfassen die Anreicherung entweder per Oberflächenmarker gekoppelt an immunomagnetischen Beads (überwiegend EpCAM, *Epithelial Cellular Adhesion Molecule*) oder per Filtration mittels Größe (Porengrößen variieren zwischen 4 bis 10  $\mu\text{m}$ ). Die einzige FDA-zertifizierte<sup>3</sup> Technologie ist zur Zeit das CellSearch-System[8]. Bei diesem Prozess werden CTCs über immunomagnetisches Ferrofluid (paramagnetische Beads im Nanometerbereich) mittels Oberflächenmolekül EpCAM angereichert und quantifiziert. Die eindeutige Identifizierung von CTCs wird anschließend anhand der aktuellen Definition von CTCs nach CellSearch (siehe Seite 8) über Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Nachteilig ist, dass nur eine EpCAM<sup>pos</sup>-Subpopulation von CTCs angereichert werden kann. Um unabhängig von Oberflächenmarkern CTCs anzureichern, besteht die Möglichkeit diese aufgrund ihrer Größe vom Hintergrund des Blutes zu separieren. Eine optimale Filtration erlaubt eine limitierte Menge Blut zu prozessieren, ohne Bildung von Agglomerationen an den Filterporen. Nachteilig ist, dass hier eine CTC-Subpopulation anhand der Größe angereichert wird.

Wirkliche Isolation, sprich Vereinzelung von CTCs, ist nur über *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) oder (automatisierter) Mikromanipulation möglich. Letzteres hat den Vorteil der mikroskopischen Betrachtung und einer Isolation unter niedrigerem Druck und geringen Scherkräften. Nachteil ist der größere Zeitaufwand.

Nach wie vor ist der Bedarf nach optimierten Arbeitsabläufen, welche Technologien zur finalen Charakterisierung von CTCs kombinieren, hoch[8].

Die Biologie der CTCs ist nur wenig entschlüsselt, um optimal in der *Personalisierten*

<sup>3</sup> Die FDA (*Food and Drug Administration*) ist die Behörde zur Aufsicht und Überwachung von Lebensmitteln und Arzneimitteln der USA und untersteht dem Gesundheitsministerium. Damit geht eine besondere Bedeutung einher, da FDA-zertifizierte Technologien zur Diagnostik eingesetzt werden können. Das Pendant in Europa ist die europäische Gesundheitsbehörde European Medicine Agency (EMA) und in Deutschland ist es das BfArM, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.

*Medizin* Verwendung zu finden. Für ein ausreichendes biologisches Profil fehlen Daten zu Genom, Transkriptom und Proteom von CTCs. Insbesondere nach neuen Oberflächen- und Biomarkern (Transkriptom, Proteom) oder den Mechanismen, welche z.B. durch Mutationen das invasive Potential verursachen, wird gesucht.

## 1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung des potentiellen Tumorproteins *macrophage-capping protein* (CapG) im Hinblick auf dessen progressiven Effekt auf die Invasivität von Tumorzellen sowie den Nachweis von CapG auf zirkulierenden Tumorzellen (CTCs). Zunächst sollte die invasive Eigenschaft und die damit verbundene Aussage, dass CapG ein potentieller Tumordinvasionsmarker ist, anhand von Tumormaterial und einem etablierten Zellkulturmodell bestätigt werden. In diesem Modell liegt entweder eine CapG-Überexpression oder dessen Knock-Down vor. Anschließend erfolgte eine bioinformatische Analyse Daten einer Expressionsanalyse (Microarray) ausgehend vom speziellen Zellkulturmodell. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sollen per qRT-PCR im Zellkulturmodell und in Tumorproben validiert werden. Weiterhin soll eine Untersuchung des CapG-Interaktoms durch Co-Immunpräzipitation mit nachgeschalteter Massenspektrometrie Hinweise zur Funktion im Kontext der Tumorbiologie liefern. Eine weitere Fragestellung basiert auf Grund der Rolle von CapG bei der Invasivität von malignen Neoplasien, wobei hier die Expression des CapG-Proteins in CTCs des Mammakarzinoms quantifiziert werden soll. Hierzu bedarf es der Etablierung einer geeigneten Technologie sowie der Entwicklung eines Arbeitsablaufes, um CTCs zu isolieren. In diese Etablierung und Entwicklung sollen die Systeme: CellSearch und CellCelector inkludiert und kombiniert werden. Die isolierten CTCs sollen genetisch charakterisiert und die Machbarkeit einer solchen Analyse (post CellCelector) demonstriert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenproben

Im Allgemeinen wie auch hier bei allen verwendete Patientendaten wurde der Datenschutz beachtet. Die Identität wurde anonymisiert und die Persönlichkeit der dahinter liegenden Patientin respektiert. Alle Patientenproben wurden unter Beachtung der nach Aufklärung erfolgten Einverständniserklärung der Patienten und nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf verwendet.

Die DCIS- (duktales Karzinom *in situ*) und IDC- (invasives duktales Karzinom) Proben entstammten aus Paraffinblöcken von 30 primären Brustkrebsbiopsien mit DCIS- und IDC-Arealen. Diese wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen bereitgestellt. Der chirurgische Eingriff wurde von der Abteilung für Gynäkologie und Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Gewebeproben wurden entsprechend den Standardprotokollen in gepuffertem Formalin nach der Resektion fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Verwendung der Patientenproben unterliegt dem Ethikvotum der Medizinischen Fakultät Tübingen: AZ.266/98. Zur Kategorisierung der Tumorproben und zur Einteilung in DCIS und IDC wurde das Van Nuys Grading-System verwendet, welches auf dem Kerngrading basiert[103]. Die prädominanten Wachstumsmuster wurden als Solide, Cribriform und Papillär kategorisiert. Die Läsionen zeugten von Kerngrading 2 und 3.

Zur Separation der IDC-Anteile vom DCIS und der anschließenden Isolation des epithelialen Tumorgewebes wurde das FFPE-Gewebe mittels Laser-Capture-Microdissection (LCM) gewonnen. Diese Arbeit mit anschließender RNA-Isolation aus den DCIS-/ IDC-FFPE Proben wurde von Frau Dr. Silke Schultz in Tübingen durchgeführt.

#### 2.1.1 Blutproben

Die verwendeten Blutproben wurden im Rahmen der DETECT- und der AUGUSTA-Studien entnommen und unterliegen dem jeweiligen Ethikvotum. Die Blutproben aus der DETECT-Studie wurden direkt nach Entnahme in CellSave-Tubes aufgenommen. Die CellSave-Tubes beinhalten 300  $\mu$ l CellSave, einen Zellstabilisierungs-Puffer, welcher eine leichte Fixierung der Zellen vornimmt. Die genaue Rezeptur wird durch die Firma (Janssen Diagnostics, USA) nicht bekanntgegeben. Die DETECT-Proben wurden anschließend durch das Gerät CellSearch prozessiert (siehe 2.19.2, Seite 28). Die Blutproben der AUGUSTA-Studie wurden in Standard-EDTA-Container aufgenommen, wobei EDTA als Antikoagulans wirkt. Diese Proben werden entweder mittels CellSearch prozessiert, wobei dieses Blut ebenfalls in CellSave-Tubes überführt wurde, oder es wurde anderweitig aufgearbeitet (innerhalb von Cytospins, 2.9, Seite 19).

## 2.2 Zelllinien und Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

**Tabelle 1:** Liste der verwendeten Zelllinien

Name	Beschreibung	ATCC Nr.
MCF-12A	Aus gesundem Brustdrüsengewebe einer 60-jährigen kaukasischen Frau generiert.	ATCC CRL-10782
MDA-MB 231	Generiert aus einem Adenokarzinom der Brust einer 51-jährigen kaukasischen Frau	ATCC HTB-26
MDA-MB-468	Zellen aus Pleuraerguß isoliert von einer 51-jährigen Schwarzen mit metastasiertem Brustdrüsentumor	ATCC HTB-132
TMX2-28	Kultiviert aus einer aggressiven Variante von MCF7 Zellen	Generiert von Gozgit et al. [39]
T47-D	Generiert aus einem Pleuraerguß einer 54 Jahre alten Patientin mit duktalem Brustkarzinom	ATCC HTB-133
MCF7	Von einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit Adenokarzinom aus einem Pleuraerguß isoliert und kultiviert	ATCC HTB-22
Sk-Br-3	Isoliert und kultiviert aus dem Pleuraerguß einer 43-jährigen kaukasischen Patientin mit Adenokarzinom	ATCC HTB-22
SUM-225	Etabliert aus einem DCIS Rezidiv (Duktalem Carcinoma <i>In Situ</i> )	Erstbeschreibung bei Forozan et al.[32]
BT-20	Kultiviert aus Zellen eines duktalem Brustkarzinoms einer 74-jährigen Frau	ATCC HTB-19
BT-20/CapG	Stabile Überexpression von CapG mittels viraler Transfektion.	Details siehe 2.3, Seite 15

### 2.2.2 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in 75, 250 oder 550 ml Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% mittels 0,5% Trypsin-Behandlung passagiert. Die Trypsinierung beinhaltet eine 5 minütige Inkubation bei 37°C und das anschließende Stoppen der Reaktion mittels Medium.

Die Zelllinien wurden in Vollmedium (genaue Angaben siehe unten) und den Zusätzen

10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten. Medien, FCS, Trypsin und Antibiotika wurden von Gibco, Deutschland, bezogen.

MDA-MB 231, MDA-MB-468 und TMX2-28:

RPMI, L-Glutamin, 10% FCS, 1% Pen./Strep.

MCF-12A, T47-D, MCF7, Sk-Br-3 und BT-20:

DMEM, 4,5 g/L D-Glucose, 10% FCS, 1% Pen./Strep.

SUM-225:

Ham's F-12, HEPES 1%, 5% FCS, 1% Pen./Strep.

### 2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Es werden von einer verdünnten Zellsuspension 10  $\mu\text{l}$  eingesetzt und zwischen Deckglas und Glasslide pipettiert. Anschließend werden vier Großquadrate ausgezählt. Der Titer wird wie folgt berechnet:

$$\frac{n}{A \cdot h \cdot d} \quad (1)$$

Wobei n die Anzahl der Zellen, A die Fläche in  $\text{mm}^2$ , h die Tiefe der Kammer in mm und d die Verdünnung als Faktor ist. Als Ergebnis erhält man die Zellzahl/ $\mu\text{l}$ .

### 2.2.4 Kryokonservierung und Re-Kultivierung

Zur Kryokonservierung werden die Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben geerntet und bei 1100 rpm oder 130 g für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wird anschließend in 6 ml Medium mit 10% DMSO resuspendiert und auf drei Kryoröhrchen (Greiner, 2 ml) verteilt. Die Kryoröhrchen werden anschließend in einem Gefrierkontainer gelagert und bei  $-80^\circ\text{C}$  in  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ -Schritten eingefroren. Für Langzeitlagerung wird flüssiger Stickstoff empfohlen ( $\geq 1$  Jahr). Kryokonservierte Zellen werden bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, zentrifugiert (130 g, 5 Minuten) und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zell-Suspension wird in eine 75 ml Zellkulturflasche überführt.

## 2.3 Retrovirale stabile Überexpression von CapG

Das PCR-amplifizierte cDNA-Fragment des humanen CapG wurde in den retroviralen S11-IN-Vektor kloniert. Der Vektor entstammt dem SF $\beta$ 11 und wurde freundlicherweise von der AG Prof. H. Haneberg zur Verfügung gestellt. Die virale Transfektion und die damit verbundenen S2-Arbeiten wurden freundlicherweise von Fr. Constanze Wiek (Arbeitsgruppe Prof. H. Haneberg, Klinik für Kinder-Onkologie, Düsseldorf) durchgeführt. Die Zelllinie BT-20 mit dem stabil integrierten S11-CapG-IN werden in dieser Arbeit BT-20/CapG genannt.

## 2.4 RNA Silencing vermittelter Knock-Down von CapG

Mit Hilfe des RNA-Silencing Methodik (small interfering RNA, siRNA) kann die Expression einzelner Gene auf Transkriptom-Ebene vermindert oder unterdrückt werden. Bei diesem Prozess werden kurze zur Ziel-RNA komplementäre RNA-Moleküle in die Zelle geschleust und bilden durch Interaktion mit der Zielstruktur eine doppelsträngige RNA (dsRNA). Da dsRNA in der Zelle nicht vorkommt und von der Zelle als mögliche Gefahr (e.g. virale Genome) gedeutet wird, kommt es zu einem zellulärer Abwehrmechanismus bei dem die dsRNA degradiert wird und folglich die Translation des Gens verhindert. Für den siRNA-vermittelten Knock-Down wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen/Well in 6-Wellplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die MDA-MB 231 Zellen mit dem kommerziell erhältlichen CapG-spezifischen siRNA-Molekülen (Ambion Inc., USA) unter Verwendung des Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen, Deutschland) gemäß des Herstellers transfiziert. Die finale siRNA-Konzentration war 15 nM und die siRNA-Sequenz lautet:

5'-ggu ggu gug gag uca gca u-3'

Diese bindet an die 335-373 kodierende Region des CapG-Transkripts. MDA-MB 231 Zellen mit CapG-Knock-Down werden MDA-MB 231/siCapG genannt. Der CapG Knock-Down wurden mittels Immunoblot (Immunoblotting, 2.8.2, Seite 19) verifiziert.

## 2.5 Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen

Zur Herstellung und Extraktion von einem Gesamtprotein-Lysat wurden die Zellen mit einem Lysepuffer auf RIPA-Basis aufgeschlossen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS (Life Technologies, USA) gewaschen und anschließend mit Cell-Dissociation-Buffer (Life Technologies, USA) abgelöst. Die Zellen wurden bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in Lysepuffer aufgenommen, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionstube überführt und gegebenenfalls aliquotiert. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Lysate auf diesem Wege generiert.

Lysepuffer auf RIPA-Basis:

50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, ad 100 ml dH<sub>2</sub>O; 10 ml-Aliquots bei -20°C. Vorgebrauch Zugabe von Protease-Inhibitoren in Tablettenform (Roche, Deutschland).

## 2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Protein-Konzentration wurde der Protein-Assay nach Bradford [14] angewendet. Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Quick Start<sup>TM</sup> Bradford Protein Assay Kit von BioRad (BioRad, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Da Detergenzien, wie beispielsweise Triton X-100,

bei der Messung stören, wurde ein Teil das zur Bestimmung vorgesehene Proteinlysats soweit verdünnt, das eine Messung der Proteine möglich, jedoch störende Faktoren minimiert waren. Die Proteinbestimmung beruht auf der elektrostatischen Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G 250 an die Proteine. Bei jeder Messung wurde eine proteinfreie Kontrolle (Blank) als Referenz mitgeführt, welche aus dem Lysepuffer mit der gleichen Verdünnung bestand. Proteinlysats und Kontrolllösung wurden mit auf RT gebrachtem Bradford-Reagenz gevortext und kurz inkubiert. Als Standardreihe wurde BSA mit einer Ausgangskonzentration von 0,25 mg/ml in 0,25 mg/ml-Schritten bis 2 mg/ml durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm im Küvetten-Fach des NanoDrop Spektralphotometer ND-1000 (NanoDrop Tech, USA).

## 2.7 Subzelluläre Fraktionierung

Die Methode erlaubt die Separation des Cytoplasma-Proteins und des Nucleus-Proteins für weitere Analysen. Hierfür erfolgte die Ernte der Zellen wie unter 2.5 auf Seite 16 beschrieben. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in HB-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 1 min bei 150 g und 4°C zentrifugiert und anschließend das Pellet in SF-Lysepuffer (SFL-Puffer) aufgenommen. Die Probe wurde 10 min auf Eis inkubiert und mehrfach invertiert. Nach der Zentrifugation bei 15000 g für 5 min bei 4°C wurde der Überstand (cytosolische Fraktion) in ein neues Reaktionsstube überführt. Das Pellet wurde erneut in SFL-Puffer gewaschen und 5 min auf Eis inkubiert, nach erneuter Zentrifugation (15000 g, 5 min, 4°C, Überstand wird verworfen) wurde das Pellet wieder mit SFL-Puffer gewaschen. Es folgt eine zweite Zentrifugation mit gleichen Parametern. Das Kernpellet wird in Puffer C resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert, und jede Minute kurz gevortext. Hierbei erfolgt der Zellkern-Aufschluss und der Überstand kann nach einem Zentrifugationsschritt (15000 g, 5 min, 4°C) in ein frisches Reaktionsstube überführt werden (nucleäre Fraktion).

Die saubere Separation der Kern- und Cytoplasma-Fractionen wurde durch Immunnachweis von Histon H<sub>3</sub>, als rein nucleäres Protein und GAPDH, als rein cytoplasmatisches Protein, kontrolliert. War die subzelluläre Fraktionierung sauber liegt in der Kernfraktion nur Histon H<sub>3</sub> und kein GAPDH vor bzw. in der Cytoplasma-Fraktion GAPDH und kein Histon H<sub>3</sub>.

HB-Puffer:

10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,4;  
Protease-Inhibitor (Roche, Deutschland).

SFL-Puffer:

HB-Puffer + 0,4% NP-40

Puffer C:

20 mM HEPES-HCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,9; Protease-Inhibitor (Roche, Deutschland).

## 2.8 SDS-PAGE und Immunoblotting

Zum Nachweis von Proteinen wird die Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Immunodetektion per Immunoblotting durchgeführt. Hierbei wird mittels Polymer-Matrix (Polyacrylamid) eine Protein-Probe anhand von Größe über eine elektrische Spannung, vom Minuspol zum Pluspol, aufgetrennt. Die Proteine besitzen unterschiedliche Ladungen: um die Ladung der Proteine zu equilibrieren wird der Probe das Detergenz SDS zugesetzt, wodurch alle Proteine in der Lösung die gleiche Ladung (negativ) erhalten. Anschließend werden diese erneut mittels elektrische Spannung auf eine verdichtete Matrix (Nitrocellulose, PVDF, o.Ä.) übertragen und immobilisiert. Mittels Antikörper können auf dieser Matrix einzelne Proteine sichtbar gemacht werden. Hierbei kommen Antikörper zum Einsatz, welche mit einem Enzym (z.B. Horse-Radish-Peroxidase) oder einem Fluoreszenzmoleküle (z.B. FITC) gekoppelt sind. Ein Signal wird nach Substratzugabe (Enzym) oder Lichtanregung (Fluoreszenzmolekül) gemessen und ausgewertet. Immunoblotting erlaubt semi-quantitative Aussagen über die Proteinmenge.

### 2.8.1 Protein-Auftrennung mittels SDS-PAGE

Das verwendete SDS-PAGE-System basiert auf einem Verfahren nach Laemmli[60]. Für die SDS-PAGE wurden Mini-PROTEAN TGX Stain-free Precast-Gele (Fertiggele) von BioRad verwendet (BioRad, Deutschland). Im Vergleich zu selbst erstellten Gelen haben diese den Vorteil der besseren Reproduzierbarkeit, Zeitersparnis und der labelfreien Proteinquantifizierung. Für die Protein-Auftrennung und spätere Detektion wurden die Gele in Mini-PROTEAN Tetra Cell-Systemen von BioRad eingesetzt, der Kamm für die Ladetaschen und der Schutzklebestreifen entfernt und anschließend die Geltaschen beladen. Neben 5  $\mu$ l BioRad Plus Precision Standard (Marker) wurden immer gleiche Mengen Proteinlysate aufgetragen. Hierfür wurden 20  $\mu$ g Proteinlysate mit Lade-Puffer (BioRad) vermischt und bei 65°C erhitzt (10 min). Die Tetrazelle wurde mit 1-fachem Laemmli-Laufpuffer gefüllt (1l, BioRad) und die Proben aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 300 V für 15 min angelegt. Nach dem Lauf wurde mit Hilfe des ChemiDoc-System die Auftrennung protokolliert und kontrolliert, sowie die Proteinmenge quantifiziert. Das System erlaubt die Aktivierung der Mini-PROTEAN TGX Stain-free Precast-Gele und visualisiert die Proteine.

### 2.8.2 Immunoblotting

Für das Immunoblotting wird ein Tank-Blotting-System verwendet (BioRad). Nach dem SDS-PAGE-Lauf wird das Gel auf eine vorher in 100% Methanol für 10 min aktivierten PVDF-Membran (Merck Millipore, Deutschland) gelegt. Über dem Gel und unter der Membran werden jeweils 3 in Blotting-Puffer inkubierte, saugfähige Papiere (Whatmanpaper) gelegt. Weiterhin wird oben, wie unten, jeweils ein Schwamm platziert und der gesamte Stapel in eine Kassette eingespannt. Das Blotting wird bei 200 mA nach 60 min beendet und die Membran in Blocking-Puffer (Life Technologies, USA) für 60 min inkubiert. Anschließend wird die Membran mit dem primär Antikörper für 1 h (RT) bis über Nacht (4°C) inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 1-fach TBS-0,1% Tween-20 wird die Membran mit sekundärem Antikörper-HRP gekoppelt (Anti-Spezies-IgG) für 2 h bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschritten wird die Membran mit HRP-Substrat (GE Healthcare, USA) für 2 min inkubiert und per ChemiDoc-System visualisiert und dokumentiert. Die verwendeten Antikörper sind unter 2.10 auf Seite 21 aufgezeigt.

### 2.8.3 Densitometrie

Nach dem Immunoblotting liegt eine Bilddatei (.tiff-Format) mit den Banden der visualisierten Proteine vor. Die detektierten Signalintensitäten der Banden können mittels geeigneter Imaging-Software ausgewertet und quantifiziert werden. Dies beruht auf der Messung der Pixel-Dichte und in Relation zum Hintergrund-Rauschen. Die Densitometrie wurde mit Hilfe der Software ImageJ (Ver.1.46r) durchgeführt. Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen und der semi-quantitativen Aussagen über die CapG Expression in CTCs wurden die 8-bit Graustufen der Bilder analysiert (splitting channels, falls nötig).

## 2.9 Immunofluoreszenz

Für eine lokale und im morphologischen Zusammenhang stehende Detektion von Proteinen wurde eine Fluoreszenzmarkierung (Färbung) in intakten auf Glasobjektträger gewachsenen Zellen vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen 24-48 h vor der Färbung auf Glasobjektträgern ausgesät.

Für eine reine semi-quantitative Aussage über die Protein Expression wurden Cytospins angefertigt. Hierfür wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche mit *Cell Dissociation Buffer* abgelöst und fixiert (siehe weiter unten). Das nachfolgende Protokoll gilt auch für Patientenproben. Es wurde für 2 min bei 600 - 700 g auf Haftobjektträger zentrifugiert. Sowohl auf Glasobjektträger gewachsene Zellen oder als Cytospins: es erfolgte immer eine Fixierung mit 4%-PFA. Nach der 10 minütigen Fixierung werden die Zellen mit TBS-0,1% Tween-20 gewaschen und mit 0,5% Triton-X-100 permeabilisiert (10 min auf Eis). Nach der Permeabilisierung, welche den Zugang der Antikörper zum Cytoplasma und Nucleus

erlaubt, wird die Probe in Blockingpuffer (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) für 60 min bei RT inkubiert. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgt von 1h bei RT bis über Nacht bei 4°C. Die Inkubation der Sekundärantikörper, gekoppelt mit Fluoreszenzmolekülen, erfolgte nach 3 Waschschritten (TBS-0,1% Tween-20, 10 min) für 2 h bei RT. Nach erneuten 3 Waschschritten wurden die Proben kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit Mounting-Medium eingedeckelt (DAKO, Agilent-Technology Company, USA). Nach mind. 4 h kann die Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2 oder Olympus CKX 41) untersucht werden. Während der Färbung und bei späterer Lagerung wurde auf Kühlung (4°C) und Dunkelheit geachtet. Die verwendeten Antikörper und andere Reagenzien zur Färbung sind unter 2.10 auf Seite 21 angegeben.

### 2.9.1 CTCF - *corrected total cell fluorescence*

Mittels Immunfluoreszenz ist eine semi-quantitative Aussage über die Menge eines Proteins möglich. Dieser Annahme liegt zugrunde, dass über die eingesetzte Antikörpermenge auch die Menge des Antigens abschätzbar ist, da theoretisch ein Antikörper pro Epitop bindet. Demzufolge kann die Bildauswertung auf Basis der optischen bzw. integrierten Dichte der Fluoreszenzintensität die Proteinmenge quantifiziert werden. Die unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten der CTCs wurde über den CTCF-Wert (*corrected total cell fluorescence*) definiert. Zur Bestimmung wurde wie folgt vorgegangen:

$$\varrho_{IntDen} - (A \cdot \bar{x}_{BgF}) = CTCF \quad (2)$$

Wobei  $\varrho_{IntDen}$  die integrierte Dichte (*integrated density*), A die Fläche und  $\bar{x}_{BgF}$  das durchschnittliche Hintergrundrauschen (*mean background fluorescence*) ist. CTCF ist schließlich die korrigierte Zell-Gesamtfluoreszenz (*corrected total cell fluorescence*). Die Methode der CTCF-Bestimmung ist anerkannt[15][34][65].

### 2.9.2 Scoring

Das Proteinniveau von CapG in WBCs (Weiße Blutkörperchen) wurde als Null-Niveau eingestuft, somit als Normal-Größe und Ausgangspunkt zur Berechnung eines Scores. Um die CapG-Menge in CTCs zu klassifizieren wurde ein Scoring-System berechnet, wobei für die Berechnung nur CTC-Aufnahmen verwendet wurden, welche mit gleichen Parametern aufgenommen wurden (CKX 41, Olympus, Belichtungszeiten unter 2.19.3 auf Seite 30). Das Scoring-System wurde wie folgt definiert:

$$Scoring_{0-3} = Q_p(\bar{x}_{1CTCF} + \bar{x}_{2CTCF} + \dots + \bar{x}_{nCTCF}) \quad (3)$$

Wobei  $Q_p$  die Funktion zur Berechnung der Quantile ist und  $\bar{x}_{CTCF}$  das arithmetische Mittel (CTCF-Werte) jeder Probe. Demnach basiert das Scoring auf der Quantil-Einteilung des durchschnittlichen CTCF-Wertes jeder Probe. WBC, BT-20 und MDA-MB 231 dienen als Referenzen für das Scoring, da der CTCF-Wert der WBC-Probe als Normalwert, der der BT-20 Zellen als moderater Wert (auf Grund geringer bis moderater CapG-Expression) und der CTCF-Wert der MDA-MB 231 Zellen als hoher Wert (wegen einer hohen CapG-Expression) definiert werden kann. Die Werte für die Einteilung des Scorings waren somit:

$$\text{Score 0} \leq 0,50$$

$$\text{Score 1} + 0,50 - 2,47$$

$$\text{Score 2} + 2,47 - 4,92$$

$$\text{Score 3} + \geq 4,92$$

## 2.10 Antikörper und immunomagnetische Beads

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Einsatz	Hersteller und Informationen
Anti-CapG	Maus	1:200	Sigma Aldrich, SAB1403632-100ug, Klon 6D6, IgG2 <sub>ak</sub> -Isotype
Anti-CapG	Hase	1:300	bereitgestellt vom Forschungslabor der Frauenklinik, Dr. Dieter Niederacher. Gerichtet gegen die Aminosäuresequenz 236 - 249 von CapG
Anti-GPNMB	Maus	1:200	R&D Systems, MAB25501, Klon 303822, IgG2 <sub>b</sub>
Anti-GAPDH	Ziege	1:300	Santa Cruz, sc-48166
Anti-Histone H <sub>3</sub>	Ziege	1:200	Santa Cruz, sc-8654
Anti-Actin	Maus	1:300	Sigma Aldrich, A5316, Klon AC74, IgG2 <sub>a</sub>
Anti-Cytokeratin-FITC		1:300	GeneTex, GTX11212, Klon C-11

Anti-CD45- AlexaFluor 647		1:20	Santa Cruz, sc-1178-AF, Klon 35- Z6
Anti-ACOX3	Maus	1:300	Santa Cruz, sc-373977, Klon G-9, IgG1

<b>Sekundär Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Hersteller und Informationen</b>
Anti-Hase-HRP	Ziege	1:5000	Santa Cruz, sc-2004
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:5000	Santa Cruz, sc-2005
Anti-Ziege-HRP	Hase	1:5000	Santa Cruz, sc-2768
Anti-Hase-AF488	Ziege	1:200	Invitrogen,A-11034
Anti-Hase-AF594	Ziege	1:200	Invitrogen,R37117
Anti-Hase-AF647	Ziege	1:200	Invitrogen,A-21246
Anti-Maus-AF488	Ziege	1:200	Invitrogen,A-11001
Anti-Maus-AF594	Ziege	1:200	Invitrogen, A-11005
Anti-Maus-AF647	Ziege	1:200	Invitrogen,A-21235
<b>Immunomag. Beads</b>	<b>Spezies</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Hersteller und Informationen</b>
Dynabeads Anti-Maus	Schaf	25 $\mu$ l/ 2 $\mu$ g Antikörper	Life Technologies, 11201D
Dynabeads Anti-Hase	Schaf	25 $\mu$ l/ 2 $\mu$ g Antikörper	Life Technologies, 11203D
Dynabeads Anti-CD45	Maus	200 $\mu$ l/ 1,5 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> Zellen	Life Technologies, 11153D, IgG2 <sub>a</sub>

## 2.11 Co-Immunpräzipitation

Zur Isolation einer einzelnen Proteinspezies und deren potentieller Interaktionspartner wurde eine Co-Immunpräzipitation (CoIP) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der immunologischen Bindung und Immobilisation von nativen Proteinen (=Beuteprotein) aus einem Gesamtproteinlysate an eine Matrix, mit der Folge, dass potentielle Bindungspartner und Interaktionspartner im Lysat an dem Beuteprotein binden. Ist diese Interaktion stabil genug, womit ein Teilnachweis einer echten Interaktion erbracht ist, und bleibt diese auch über die folgenden Waschschrte bestehen, kann in anschließenden Nachweisverfahren diese Interaktion aufgezeigt werden. Als erste Nachweismethode bietet sich

eine ESI-MS/MS-Messung an (siehe 2.12, Seite 24) um in einem “Shotgun”-Verfahren eine Liste an potentiellen Kandidaten zu erhalten die anschließend validiert werden. Für die Co-Immunpräzipitation wurden zunächst die immunomagnetischen Beads für die Interaktionsstudie präpariert. Um in der Downstream-Applikation eine Verunreinigung durch Antikörper zu minimieren, werden die Antikörper an den präparierten Beads kovalent gebunden. Hierzu werden die Beads vor der Präparation im Magnetständer 3-mal mit PBS (500 $\mu$ l) gewaschen. Anschließend wurden 25  $\mu$ l Beads pro CoIP-Ansatz mit 2-4  $\mu$ g Antikörper gemischt und 1-2 h bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren PBS-Waschschritten werden die über den Magneten immobilisierten Beads 3-mal mit 500  $\mu$ l 0,2 M Triethanolamine (pH 8,2) kurz gewaschen und in einer DMP-Triethanolamin-Lösung (20 mM Dimethyl-pimelimidat in 0,2 M Triethanolamin, pH 8,2; frisch angesetzt) für 30 min bei RT und Rotation inkubiert. Anschließend werden die Beads wieder immobilisiert und in 600  $\mu$ l 50 mM Tris (pH 7,5) für 15 min gemischt (300 rpm). Darauf folgen mehrere Waschschritten: 1-mal 500  $\mu$ l PBS/BSA (0,1%), 2-mal 500  $\mu$ l RIPA-Puffer, 2-mal 500  $\mu$ l PBS/BSA (0,1%). Zuletzt werden die präparierten Beads in 25  $\mu$ l PBS resuspendiert und für maximal 1 Woche bei 4°C gelagert.

Vor der CoIP werden die Beads mit RIPA-Puffer equilibriert. Ein bis zwei Tage zuvor werden MDA-MB 231 Zellen in einer großen Flaschen (150 cm<sup>2</sup>, 20 ml Vollmedium) pro Ansatz bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Für die CoIP werden die Zellen wie unter 2.5 beschrieben abgelöst. Anschließend wurden die Zellen 30 min unter ständiger Kühlung mit RIPA-Puffer inkubiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (70% Effizienz, 10 s, 3 Zyklen). Nach einer 10 minütigen Zentrifugation (13000 g, 4°C) wurde der Überstand in Protein-LoBind-Tubes (Eppendorf, Deutschland) überführt und das Pellet verworfen. Die präparierten Beads werden nun mit dem Lysat zusammen bei gemäßigter ständiger Rotation inkubiert (1 h, RT oder über Nacht, 4°C). Als Kontrolle dienen präparierte Beads mit Isotypen-IgG. Über einen Magnetständer werden die Beads mit gebundenen Proteinen und Proteinkomplexen aus der Suspension immobilisiert und mit dem Lysepuffer 3-mal gewaschen. Anschließend werden die Proteine und Proteinkomplex von den Beads eluiert (SDS-Puffer oder Citratpuffer, pH 2) und erhitzt (65°C) und  $\frac{1}{9}$  per SDS-PAGE (2.8.1, Seite 18) aufgetrennt. Die Proteinauftrennung wird mittels Silberfärbung oder über die Chemie der Mini-PROTEAN TGX Stain-free Precast-Gele visualisiert. Das Bandenmuster gibt im Vergleich zur Kontrolle Anzeichen und Hinweise über eine mögliche spezifische Anreicherung

## 2.12 ESI-MS/MS

Die massenspektrometrische Analyse der Eluate aus der Co-Immunpräzipitation wurde am *Molecular Proteomics Laboratory* (MPL) am Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) von und in Kooperation mit Herrn Dr. Gereon Poschmann durchgeführt.

Die CapG-Interaktom-Versuche wurden mit insgesamt 15 Ansätzen durchgeführt (verteilt auf zwei ESI-MS/MS Läufe). Jedem Ansatz lag ein Kontrollansatz gegenüber, d.h. ein Ansatz bestand aus mit CapG-gekoppelten immunomagnetischen Beads und Isotyp-IgG-gekoppelten immunomagnetischen Beads. Es wurden nur solche Proteine als potentielle Interaktionspartner anerkannt, welche in der Isotyp-Kontrolle keine Signale lieferten. Final wurde die Proteinkandidaten-Liste mit der Liste potentielle Interaktionspartner aus der van Impe-Studie[121] verglichen.

## **2.13 RNA-Isolation**

### **2.13.1 RNA-Isolation aus Zelllinien**

Zur RNA Isolation aus Zelllinien wurde das Qiagen-Kit RNeasy Mini-Kit verwendet (Qiagen, Deutschland). Hierfür wurden  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen in 6-Wellplatten 24 h vor der RNA-Isolation ausgesät und kultiviert (Kultivierungsbedingungen unter 2.2.2, Seite 14). Zum Isolationszeitpunkt wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, trypsiniert und anschließend in PBS gewaschen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 350  $\mu$ l RLT-Puffer lysiert. Die Zellen wurden durch QIAShredder Spin-Säulen (Qiagen, Deutschland) homogenisiert und der Durchfluss mit 350  $\mu$ l 70% Ethanol durch auf- und ab-pipettieren durchmischt. Das gesamte Volumen wurde auf eine 2 ml RNeasy Spin-Säule transferiert, 15 s bei  $\geq 8000$  g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer die Säule gewaschen (15 s,  $\geq 8000$  g) und anschließend 2-mal mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen (15 s,  $\geq 8000$  g). Zur Elution der RNA wurde die RNeasy Spin-Säule auf ein Collection-Tube platziert und 30 - 50  $\mu$ l RNase-freies Wasser auf die Membrane der RNeasy Spin-Säule getropft und für 1 min bei  $\geq 8000$  g für 15 s zentrifugiert. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch quantifiziert (2.14, Seite 25).

## **2.14 Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA**

Zur Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration und -Reinheit wurde der 260 nm/ 280 nm-Quotient berechnet. Nukleinsäuren (RNA, ssDNA, dsDNA) absorbieren bei 260 nm und tragen somit zur Gesamt-Absorption bei. Eine Reinheit wird demnach bei einem Quotienten von ca. 1,8 für DNA und ca. 2,0 für RNA angegeben. Werte deutlich darunter deuten auf Phenol- oder Protein-Verunreinigungen hin.

## **2.15 qRT-PCR**

Zellkulturproben und Tumorproben wurden mittels Reverse-Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) analysiert. Die Isolation der RNA wurde wie unter 2.13 beschrieben durchgeführt. Die Synthese der complementary DNA (cDNA) erfolgte aus 50 ng - 1  $\mu$ g Gesamt-RNA mit Hilfe des Omniscript RT-Kit (Qiagen, Deutschland)

und oligo(dT)-Primern (Invitrogen, USA). Die PCR wurde auf einem LightCycler 480 (Roche, Deutschland) über 45 Zyklen unter Verwendung des QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Der Master-Mix beinhaltet die HotStar-Taq DNA Polymerase, 200  $\mu$ M dNTPs, 1 $\mu$ M GAPDH Primer, 0,8  $\mu$ M CapG Primer bzw. 0.8  $\mu$ M GPNMB-Primer. Die pro Well eingesetzten Volumina waren 25 oder 50  $\mu$ l. Jede Probe wurde lief in Triplikaten und wurden dreimal gemessen. Relative Quantitäten wurden entsprechend der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode[76] berechnet und auf die Expression des Housekeeper-Gens GAPDH normalisiert. Die Primer-Sequenzen waren folgende:

Forward-GAPDH:	5'-ctc ctc aca gtt gcc atg ta-3'
Reverse-GAPDH:	5'-gca cag ggt act tta ttg atg g-3'
Forward-CapG:	5'-cga aca ctc agg tgg aga tt-3'
Reverse-CapG:	5'-tcc agt cct tga aaa att gc-3'
Forward-GPNMB:	5'-aac aca agg aat aca acc caa t-3'
Reverse-GPNMB:	5'-ggg aag aac acg gct ttt-3'

## 2.16 Microarray

Eine Microarray-Studie erlaubt eine parallele Analyse von tausenden Gentranskripten und gibt Rückschlüsse auf das Expressionsmuster des Modells. Die Durchführung des Microarrays erfolgte am BMFZ der Heinrich-Heine Universität. Für die Microarray-Studie wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen der Konditionen BT-20, BT-20/CapG und MDA-MB 231, MDA-MB 231/siCapG verwendet. Als Plattform dienten die Produkte von Agilent (Agilent Technologies, USA), wobei zur Hybridisierung der Proben ein Agilent 4x44k Whole Genome Microarray Chip benutzt wurde. Die Signal-Intensitäten der 16 bit .tiff-Dateien wurde mit Hilfe der Feature Extraction Software (FE Vers. 9.5, Agilent Technologies, USA) berechnet. Die initiale Daten-Analyse wurde per GeneSpring GX Software (Vers. 11.0, Agilent Technologies, USA) durchgeführt. Hierbei wurden die Signalintensität der Sonden auf die Konditionen BT-20 bzw. MDA-MB 231 normalisiert, um so Interarray-Variabilität zu minimieren[13]. Nach der Gruppierung der Replikate müssen die Transkripte in mindestens drei der vier Durchführungen in einem der beiden oder in beiden Konditionen über dem Background exprimiert vorliegen. Nur dann erfolgt ein paarweiser Vergleich der Konditionen. Die statistische Auswertung wird unter 2.21.5 beschrieben. Der komplette Datensatz wurde auf der NCBI -GEO Datenbank hinterlegt (Accession-Number GSE53566, Stand 23. Februar 2016)

## 2.17 Whole Genome Amplification (WGA)

Voraussetzung für alle weiterführenden genetischen Analysen (aCGH, Sequenzierung) ist die Amplifikation des Genoms einzelner Zellen. Das WGA-Verfahren basiert auf einer Ligation-vermittelten PCR, gefolgt von spezifischem DNA-Verdau mittels Restriktionsenzym. Das Ampli1-WGA Kit (silicon biosystems, Italien) wurde für die Amplifikation des gesamten Zellgenoms (WGA) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Das Ampli1-Kit inkludiert die 4 Schritte der Zellyse, DNA Verdau und Preannealing, der Ligation und der primären PCR. Das gesamte verwendete (Plastik-)Material war DNA- und DNase-frei. Bei jeder Amplifikation wurden Positiv- (aufgereinigte Zelllinien DNA) und Negativ-Kontrollen (PCR kompatibles Wasser) mitgeführt. Für die Qualitätskontrolle wurden 2  $\mu$ l des WGA-Produktes mittels Ampli1-QC Kit (silicon biosystems, Italien) analysiert. Wobei dieses Verfahren auf einer multiplex PCR von vier Markern basiert. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von Zelllinien verwendet. Für die Analyse wurden die QC-PCR Produkte per Gelelektrophorese (1,5% Agarose, AppliChem) aufgetrennt. Für den Lauf: 100 V für 30 min.

Nach der Analyse der Gelelektrophorese, wird das Bandenmuster der Proben begutachtet und so die Qualität der DNA bestimmt. Von einer optimalen DNA Qualität kann ausgegangen werden, wenn 4 Banden erkennbar sind. Drei Banden gelten als suboptimal oder verwendbar für NGS-Analysen. Bei einer Bandenanzahl von 2 oder weniger wird von einer schlechten DNA-Qualität der (WGA-) Proben ausgegangen.

## 2.18 Sequenzierung

Die Panel-Sequenzierung erfolgte mit der IonTorrent-Technologie in Kooperation mit der AG Wilko Weichert (Uniklinikum Heidelberg). Es wurden nur solche WGA-Produkte zur Analyse eingereicht, wenn in der QC (siehe 2.17) ein Bandenmuster von 4 Fragmenten erkennbar war. Die erhaltenen Daten wurden nach den Parametern Coverage ( $\geq 100$ ), Quality ( $\geq 100$ ) und Frequency ( $35 \geq$ ) gefiltert. Das Panel deckte die Sequenzen folgender Gene ab: *abl1*, *akt1*, *alk*, *apc*, *atm*, *braf*, *cdh1*, *cdkn2a*, *csf1r*, *ctnmb1*, *egfr*, *erbb2*, *erbb4*, *ezh2*, *fbxh7*, *fgfr1*, *fgfr2*, *fgfr3*, *flt3*, *gna11*, *gnas*, *hnf1a*, *hras*, *idh1*, *idh2*, *jak3*, *kdr*, *kit*, *kras*, *met*, *mlh1*, *mpl*, *notch1*, *nras*, *pdgfra*, *pik3ca*, *pten*, *ptpn11*, *rb1*, *ret*, *smad4*, *smarcb1*, *smo*, *src*, *stk11*, *tp53*, *vhl*.

## 2.19 Quantifizierung, Anreicherung und Isolation von zirkulierenden Tumorzellen

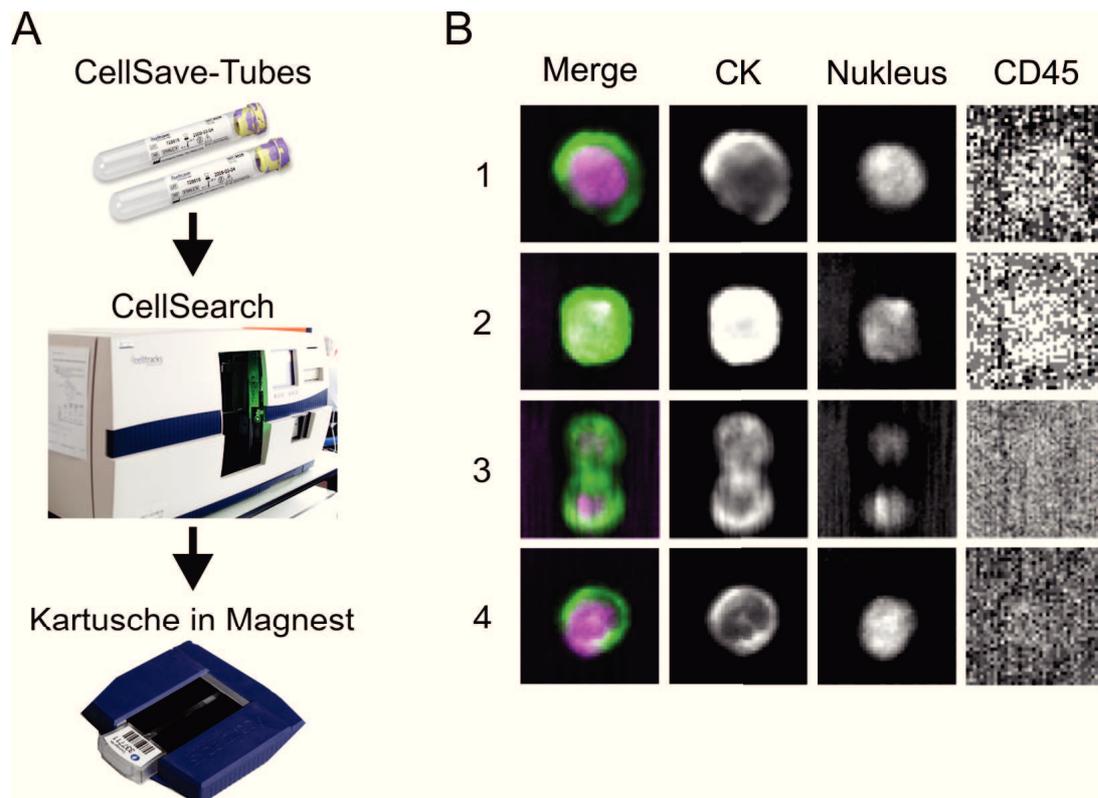
### 2.19.1 Anreicherung mittels AdnaTest Breast Cancer Select/Detect

Zur Anreicherung von mehreren zirkulierenden Tumorzellen aus einer Blutprobe wurde hier ein immunomagnetisches Verfahren verwendet, um anschließend die mRNA zu ex-

trahieren. Dadurch kann Aufschluss über die Gen-Expression in diesem Pool an Zellen erfolgen. Hierbei wurde der AdnaTest Breast Cancer Detect und AdnaTest Breast Cancer Select verwendet (QIAGEN, Deutschland). Die CTC<sup>pos</sup>-Proben sowie die Assays, die damit verbundene Aufreinigung der mRNA und anschließende Konvertierung in cDNA wurde von der AG Prof. Dr. Sabine Kasimir-Bauer (Uniklinikum Essen) bereitgestellt bzw. durchgeführt.

### **2.19.2 Anreicherung und Quantifikation von EpCAM<sup>pos</sup> Einzelzellen**

Mit Hilfe des CellSearch-Systems erfolgte die Anreicherung von EpCAM<sup>pos</sup> zirkulierenden Tumorzellen (CTCs, Abbildung 5A). Das System beruht auf der immunomagnetischen Separation und Anreicherung von Einzelzellen, welche einen entsprechenden Oberflächenmarker exponieren. Der verwendete Marker ist das sogenannte Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). Ein gegen humanes EpCAM gerichteter Antikörper wird auf kleinsten paramagnetischen Beads, das Ferrofluid, gekoppelt. Das EpCAM-Ferrofluid dient somit der selektiven Anreicherung und wird während des CellSearch-Prozesses in die CellSave-fixierte Vollblutprobe hinzugefügt. Der immunologische Bindungseffekt wird durch bestimmte Reaktionsabläufe (Avidin und Streptavidin sind an diesen Prozessen beteiligt) verstärkt und erlaubt auch bei nachfolgenden Waschschritten eine stabile Antigen-Antikörper Bindung. Die Ferrofluid-Zell-Komplexe werden durch Anlegen eines Magnetfeldes immobilisiert und nicht gebundene Zellen und Zelltrümmer können weitestgehend ausgewaschen werden. Innerhalb des Prozesses werden die mit dem Ferrofluid assoziierten Zellen immunologisch markiert, d. h. Zellpermeabilisation, Inkubation mit den primären Fluoreszenz-markierten Antikörper und Waschschritten (ähnliches Prinzip wie unter 2.9 auf Seite 19). Die Färbung erfolgte nur bei Benutzung des CTC-Kits (Janssen Diagnostics, USA). Anschließend wird die aufgearbeitete Probe in eine Kartusche eingeführt, in einen speziellen Magnetadapter (Magnest) platziert und Fluoreszenzmikroskopie-gestützt gescannt. Hierbei wird die gesamte Glasfront der Kartusche, an der sich die Zellen auf Grund der Ferrofluid-Interaktion und dem Magnetfeld befinden, visualisiert und die Zellen können quantifiziert werden. Bei der Analyse und Quantifikation wird von exakten Definitionen und Qualitätskriterien Gebrauch gemacht. Wie schon in der Einleitung unter 1.7 auf Seite 8 erläutert, werden CTCs als Cytokeratin positiv, CD45 negativ und mit intaktem Zellkern (DAPI positiv) definiert. Weiterhin gilt, dass sich die Signal-Strukturen unterscheiden und somit das Cytokeratin-Signal (PE) nicht mit dem Kernsignal (DAPI) oder mit Signalen in den anderen Kanälen identisch ist. Die nukleäre Färbung sollte zudem mindestens 50% der gesamten Zelle ausmachen und keine Fragmentierung aufweisen. Belichtungszeiten und ein Beispiel sind in Abbildung 5B angegeben.



**Abb. 5: CellSearch-Ablauf und Darstellungsbeispiel. A)** Gezeigt ist die vereinfachte Darstellung der Aufarbeitung von Blutproben über das CellSearch-System. Es werden 7,5 ml Blut in den CellSave-Tubes vom CellSearch prozessiert, wodurch EpCAM<sup>pos</sup>-Zellen über das Anti-EpCAM-gekoppelte paramagnetische Ferrofluid angereichert werden. Durch Waschschritte wird die Zahl der weißen Blutkörperchen (WBC) minimiert und anschließend die Zellen Immunfluoreszenz-gefärbt. Die mit Ferrofluid behafteten EpCAM-angereicherten Zellen werden in PBS-haltigem Puffer in eine Kartusche injiziert. Für die Detektion und Quantifizierung der Zellen wird die Kartusche in einen Magnethalter (Magnet) platziert. Hierdurch werden die Zellen aufgrund der Bindung zum Ferrofluid und der Einwirkung des Magnetfeldes an die Glasfläche der Kartusche gezwungen. Anschließend wird diese Glasfläche und damit die Probe mit einem Fluoreszenzmikroskop (CellTracks-Analyzer, nicht gezeigt) gescannt. Weiterführende Informationen und Einzelbildernachweis unter[48]. **B)** Die Abbildung stellt vier Sk-Br-3 Zellen dar, wie sie nach dem CellSearch-Prozess und CellTracks-Analyzer-Scan visualisiert werden. Deutlich erkennbar ist der mit DAPI gefärbte Nukleus (lila). Der Zellkern wird vom grün kolorierten cytoplasmatischen Cytokeratin (CK) umgeben, wobei der gegen CK gerichtete Antikörper mit PE gekoppelt ist. Da die Tumorzelllinie erwartungsgemäß kein CD45 (Anti-CD45-Cy5/APC) exprimiert, erscheint im Cy5/APC-Kanal nur Hintergrundrauschen. Die Belichtungszeiten sind nicht veränderbar und vom Hersteller standardisiert (CK-PE: 200 ms, Nukleus-DAPI: 30 ms, CD45-APC: 600 ms, Her2-DiOC: 800 ms).

Die Blutabnahmen erfolgten im Rahmen der jeweiligen Studien und wurden von zertifiziertem und qualifiziertem Personal durchgeführt (siehe 2.1.1 auf Seite 13). Alle Blutproben (7,5 ml) wurden in CellSave-Tubes aufgenommen und vom CellSearch unter Verwendung des CTC-Kits innerhalb von 96 h aufgearbeitet. Die Quantifizierung der zirkulierenden Tumorzellen wurde von geschultem Personal durchgeführt und von einer zweiten Person kontrolliert. Die nach der CellSearch-Prozedur erhaltene Probe wurde im Dunkeln bei 4°C gelagert und innerhalb 1 Woche aufgearbeitet. Auf Grund der zeitlich begrenzten Stabilität der CD45-Färbung mussten die Proben ab 3 Tage nach CellSearch-Lauf mit einem CD45-Antikörper (Antikörper-Details sind unter 2.10 auf Seite 21 aufgelistet) erneut

gefärbt werden.

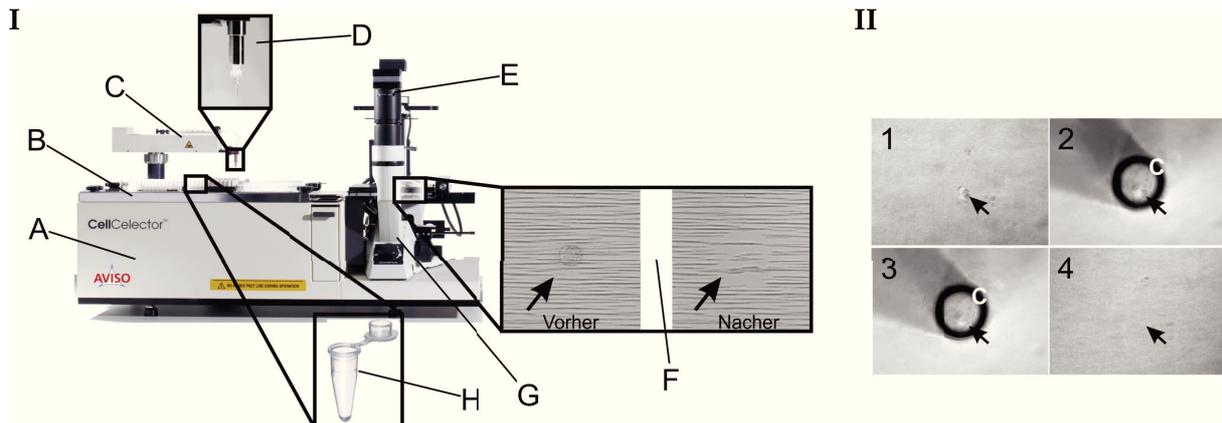
### 2.19.3 Isolation mittels automatischer Mikromanipulation

Mit Hilfe des CellCelectors (automatische Mikromanipulation, Erklärung des CellCelectors in Abbildung 6 und weitere Bilddarstellungen im Anhang auf Seite 106) erfolgte die Isolation von einzelnen Zellen durch Volumen-Aspiration (=Aspirationsvolumen) von 20 - 100 nl. Die Zellen werden durch Mikropipettieren mit einer Glaskapillare ( $d = 30 \mu\text{m}$ ) aus der Probe in ein Zielgefäß (PCR-Tube, n-Wellplatten, Glasobjektträger, etc.) transferiert und können in weiteren Analysen (WGA, Immunfluoreszenz) prozessiert werden. Für den Erntevorgang einzelner Zellen wird die Probe auf einen Glasobjektträger pipettiert, welcher an den Rändern eine Teflon-Beschichtung aufweist und somit ein Ausbrechen der Flüssigkeit verhindert. Die Zelldichte betrug im Durchschnitt 28 Zellen/  $80 \text{ mm}^2$ . Innerhalb des Erntevorgangs wird die Probe zunächst im 40x-Objektiv (Olympus CKX 41; Kamerasystem: CCD-Kamera XM10-IR, Olympus, Deutschland; ALS CellCelector-Software 3.0, ALS, Deutschland) gescannt. Hierbei kommen sowohl Durchlichtaufnahmen als auch die entsprechenden Fluoreszenzkanäle zum Einsatz. Für CellSearch-Proben waren die Fluoreszenzkanäle: DAPI (Nukleus), TRITC (CK), Cy5 (CD45), während für andere Blut- oder Zellkulturproben folgende Kanäle verwendet wurden: DAPI (Nukleus), FITC (CK), Cy5 (CD45). Der standardisierte Scan und damit die Aufnahme der einzelnen Events im 40x-Objektiv, ermöglicht im Vergleich zum 10x oder 20x-Objektiv ein optimales Zeit/Auflösungs-Verhältnis. Weiterhin werden die Bilder der als Zellen klassifizierten Events für spätere Nachweise archiviert. Nach dem Scan wird eine Liste mit möglichen Kandidaten mit Hilfe der Software analysiert. Die Selektion der Events erfolgt nach: DAPI positiv, FITC/TRITC positiv, CD45 negativ, Durchmesser zwischen 5 - 40  $\mu\text{m}$ , FITC/TRITC Grey-Value-Mean-Wert von  $\geq 2000$ . Die so stark eingegrenzte Liste an Events wird manuell ausgewertet und schließlich die als Zellen klassifizierten und den Qualitätskriterien entsprechenden Events für den Isolationsvorgang markiert. Für die eigentliche Isolation wird zunächst die Glaskapillare kalibriert, wobei die Aspirationshöhe zwischen 15 - 25  $\mu\text{m}$  über der Objektträgeroberfläche und die Abgabehöhe für die Zell-Ablage in PCR-Tubes auf 100 mm über dem Tube-Boden liegt. Für den eigentlichen Zellisoliationsprozess wird in die Kapillare 9  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer aufgenommen (vorgelegt) und anschließend die Zelle aspiriert (20 - 100 nl). Bei der Ablage spülen nun diese 9  $\mu\text{l}$  Puffer die Zelle in der Kapillarspitze aus und tropfen/mikropipettieren diese in das Zielgefäß. Um das Volumen für Downstream-Prozesse zu reduzieren wurden die PCR-Tubes mit abgelegten Einzelzellen für 5 min bei 1000 rpm in einer Mikrotischzentrifuge (Biozym, Deutschland) pelletiert und der Überstand bis auf 1  $\mu\text{l}$  Restvolumen abgenommen. Die Zellen wurden anschließend sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und bis zu weiteren Analysen gelagert.

Alle Fluoreszenzkanäle wurden unter Verwendung des 8x High Sensivity Mode (techni-

sche Verstärkung des Signals durch die Software) und bei 100% Intensity geführt. Die Belichtungszeiten waren für DAPI 100 ms, FITC/TRITC 300 ms und Cy5 500 ms.

Um CapG auf CTCs nachzuweisen, wurde ein zweiter Schritt integriert. Statt 9  $\mu$ l Puffer wurde 1  $\mu$ l Puffer vor dem Isolationsvorgang in die Kapillare aufgenommen. Anschließend erfolgte die Isolation der einzelnen Zellen, welche auf einen Glasobjektträger abgelegt wurde. Nach einem Trocknungsschritt (ü.N.) erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung des CapG-Proteins und die Auswertung am Mikroskop (Olympus CKX 41, Deutschland).



**Abb. 6: Beschreibung des CellSelectors.** Der CellSelector besteht aus zwei Komponenten: dem automatischen Mikromanipulator (A-C) und dem optischen System (D und G). Auf der Basiseinheit des CellSelectors (A) liegt das sogenannte Decktray (B). Auf dem Decktray sind alle Ablagepositionen sowie die Puffer- und Sterilisationsreservoirs lokalisiert (B). Die Ablagepositionen umfassen 96-PCR-Tube Positionen (H), 3 Glasobjektträger Positionen sowie eine Position für n-Wellplattenformate. Das mobile Erntewerkzeug (C) besteht aus dem fahrbaren Roboterarm, einer 25  $\mu$ l Hamilton-Spritze und dem Kapillarhalter. Die Hamilton-Spritze ist über ein Verschlauchungssystem mit der Kapillare (E) im Kapillarhalter verbunden und die Volumenaufnahme wird hydraulisch mittels Mineralöl übertragen. Das optische System besteht neben dem Mikroskop (Olympus-CKX41, G) aus der monochromen CCD-Kamera (D) und dem Kreuztisch auf dem die Probe lokalisiert ist und unter optischer Kontrolle einzelne Zellen isoliert werden können (F). Unter F ist die Isolation einer CellSearch-Kontrollzelle im Durchlicht gezeigt. Die horizontalen Streifen sind Ferrofluid, welches sich im Magnetfeld ausgerichtet hat.

## 2.20 Gene Ontology

Zur Interpretation der Microarray-Daten mittels *Gene Ontology*-Analyse wurde Das Web-Tool DAVID[43] (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, Version 6.7) verwendet. Das Web-basierte Analyseprogramm identifiziert und systematisiert die biologischen Termini und Ontologien der jeweiligen Transkripte einer Microarray-Messung. Es ist somit möglich die Transkripte innerhalb von biologischen Funktionen, molekularen Prozessen und/oder (extra-)zellulären Komponenten einzuordnen und zu strukturieren. Dadurch wird eine funktionale Übersicht der Microarray-Messung ermöglicht, insbesondere für große Transkript-Listen. Für die funktionale Annotation wurde ein EASE-Score von  $\leq 0,05$  (modifizierter Fishers Exakter Test) und ein Similarity-Threshold von 1,00 gewählt (höchste Stringenz zur Klassifizierung). Für die Pathway-Analyse wurden die statischen Datenbanken BBID, BIOCARTA und KEGG verwendet. Annotationen nach

funktionalen Kategorien implementierten SP-PIR-KEYWORDS, UP-SEQ-FEATURE und COG-ONTOLOGY, während für die Gene Ontology-Kategorisierung die GO-FAT Terme verwendet wurden. Die aus der DAVID-Analyse erhaltenen GO-Terme wurden mittels REVIGO Web-Tools[110] weiter zusammengefasst und Redundanzen entfernt. Die Zusammenfassung basiert auf der Beziehung zwischen den GO-Termen nach dem simRel-Score[97]. Die statistische Signifikanz der GO-Terme wird in  $\log_{10}$  p-Werten angegeben. Die GO-Terme werden nach ihrer semantischen Beziehung, d.h. nach der Distanz ihrer Verwandtschaft, sortiert. Die Größe der gefüllten Kreisdarstellungen repräsentiert die Häufigkeit der GO-Terme, je größer desto allgemeiner der Term bzw. je kleiner desto spezifischer. Für die Protein-Ontologie wurden die offiziellen Gensymbole verwendet und mit dem Web-Tool DAVID der Funktionalität nach zugeordnet. Für die Ontologien wurde auf die GO-FAT Datenbanken zurückgegriffen. Für die funktionale Annotation wurde ebenfalls eine hohe Stringenz verwendet (siehe oben).

Es wurde auf multiples Testen korrigiert (Benjamini-Hochberg *false discovery rate* von  $p \leq 0,05$ [11]).

## 2.21 Statistik

### 2.21.1 Statistik mit R

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die statistische Auswertung mit der Programmiersprache R für statistisches Rechnen und statistische Visualisierung[82]. Statistische Signifikanz wurde mit  $p \leq 0,05$  angegeben. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte nach  $n \geq 3$  und unabhängig voneinander.

### 2.21.2 Statistik mit SPSS

Statistische Signifikanz der klinischen Daten wurde über den  $\chi^2$ -Test beziehungsweise *fisher's exact test* berechnet mit  $p \leq 0,05$ . Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte nach  $n \geq 3$  und unabhängig voneinander. Für die statistische Auswertung der klinischen Daten wurde die Statistiksoftware SPSS v21 (IBM Corp., USA) verwendet.

### 2.21.3 *Cut-Off*-Definition der CapG-Expression in den Tumorproben

Die *cut-offs* wurden definiert als

$$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} = \bar{x} \pm sd \quad (4)$$

wobei  $\bar{x}$  der Mittelwert ausgehend von den Tumorproben und  $sd$  die Standardabweichung ist. Die *cut-offs* waren demnach 0,85 (unterer *cut-off*) und 1,70 (oberer *cut-off*).

#### 2.21.4 ROC-Analyse

Die statistische Methode der Grenzwertoptimierung (*Receiver Operating Characteristic*, ROC) erlaubt die Gegenüberstellung der Richtig-Positiv- gegen die Falsch-Positiv-Rate. Es stellt einen Kompromiss zwischen richtiger, positiver Klassifizierung und falscher, positiver Klassifizierung dar. Somit kann der bestmögliche Schwellwert eines Parameters zur Vorhersage eines Zustandes ermittelt werden. Um einen solchen *threshold* der CapG-Expression für die klinischen Parameter (Metastasierungs-Status, M-Status sowie Östrogen-rezeptor-Status, ER-Status) zu definieren wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Hierbei gilt, dass ein perfekter Klassifikator einen Punkt in der linken oberen Ecke des Diagramms erzeugt und dies entspräche einer Trefferquote von 100% (alle positiven Ereignisse werden als solche erkannt) und einer Fehlerrate von 0% (kein negatives Ereignis wird als positiv erkannt). Die AUC (*area under the ROC curve*) ist die Fläche unterhalb der ROC-Kurve und gilt als Maß für die Qualität des Klassifikators. Je besser die Klassifizierungsfähigkeit des Klassifikators desto höher ist der AUC-Wert mit einem maximal Wert von 1. Die Auswertung und Durchführung der ROC-Analyse erfolgte mit dem R-Paket *ROCR-Package*[104].

#### 2.21.5 Statistik-Microarray

Differentielle Gen-Expression wurde mittels Welch-Ungepaarten T-Test statistisch bestimmt. Erhaltene p-Werte wurden mittels Benjamini-Hochberg FDR auf Multiples-Testen korrigiert. Als statistisch signifikant galt ein Grenzwert von  $p_{(corr)} = 0,05$ .

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientendaten und klinisch-pathologische Parameter

Die klinische Relevanz von CapG im Zusammenhang mit Metastasierung beim Mammakarzinom konnte zunächst anhand eines Tumorprobensets nachgewiesen werden. Hierfür wurden 78 Proben des Tumorgewebes und 32 Proben des angrenzenden Normalgewebes mittels qRT-PCR auf die CapG-Expression hin untersucht<sup>4</sup>. Hierbei waren 32 Tumorgewebeproben mit den 32 Proben des Normalgewebes “*matched samples*”, d.h. es handelt sich hierbei um Tumor- und Normalgewebe aus der gleichen Patientin.

Von den 78 Patientinnen waren 23 jünger als 50 Jahre (29,49%) und 65 Patientinnen wiesen ein Tumorstaging nach UICC-Klassifikation<sup>5</sup> von T2 oder weniger auf (83,34%). Infiltration der Lymphknoten ( $\geq N1$ ) wurde in 38 (48,7%) und Fernmetastasen (M1) in 12 (15,4%) der Fälle nachgewiesen. Es wiesen 42 (53%) der Tumoren ein G2-Grading auf, wobei ein Grading von  $\leq G1$  in 14 (17,95%) Fällen vorlag. In den meisten Tumorproben wurde ein positiver Hormonrezeptor-Status (Östrogenrezeptor pos.: 57,69%, n=45; Progesteronrezeptor pos.: 62,82%, n=49) nachgewiesen. Die restlichen Proben wiesen einen negativen Hormonrezeptor-Status (Östrogenrezeptor neg.: 21,79%, n=17; Progesteronrezeptor neg.: 20,51%, n=16) oder einen undefinierbaren Status (Östrogenrezeptor unb.: 20,51%, n=16; Progesteronrezeptor unb.: 16,67%, n=13) auf. Die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

---

<sup>4</sup>Die aufgereinigte mRNA aus diesen Proben wurde von der AG Dr. Dieter Niederacher, Forschungslabor der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf bereitgestellt unter Beachtung des Ethikvotums verwendet

<sup>5</sup>Die 1933, mit Sitz in Genf, gegründete Non-Profit-Organisation *Union Internationale Contre le Cancer* widmet sich der Erforschung und Entwicklung von Präventionsstrategien und Behandlung von Krebserkrankungen. Die UICC erstellt und gibt die TNM-Klassifikation nach Vorgaben heraus.

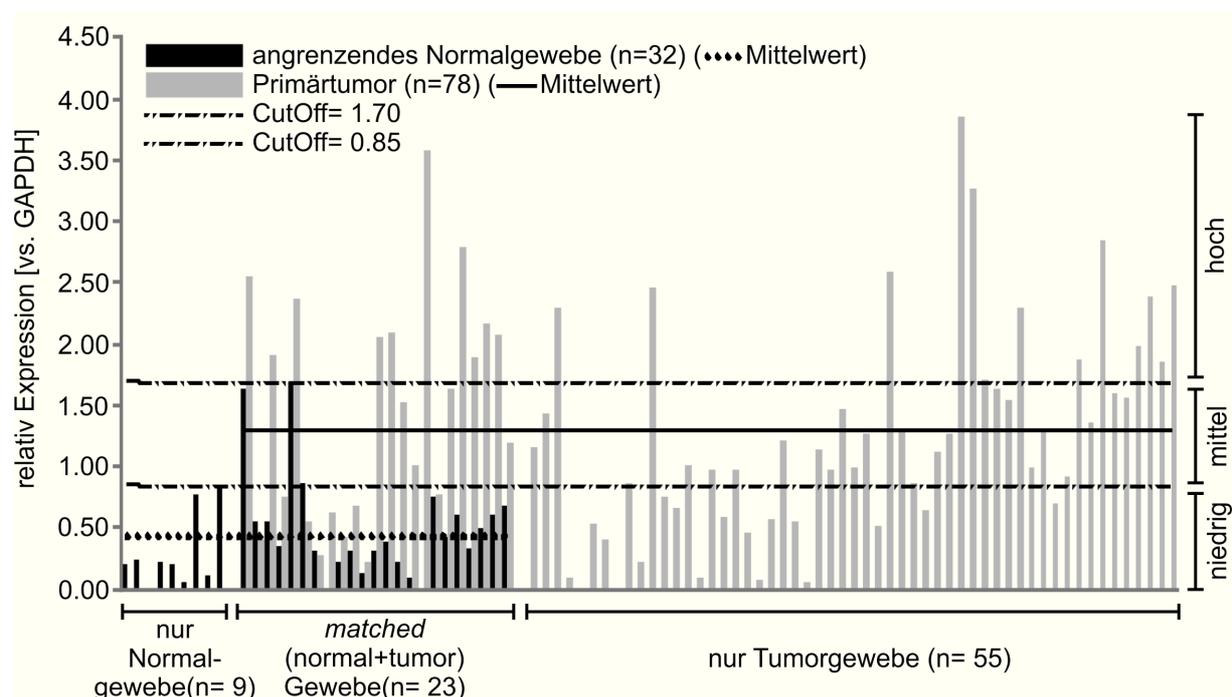
**Tabelle 3:** Klinische und histopathologische Daten des Patientenkollektivs

Variable	N	%
Alter bei Erkrankung		
<50 Jahre	23	29,49
>50 Jahre	55	70,51
Tumorstaging		
≤T1	28	35,90
T2	37	47,44
≥T3	10	12,82
Tx	1	1,28
Unbekannt	2	2,56
Lymphknoten-Status		
N0	29	37,20
≥N1	38	48,70
Nx	6	7,70
Unbekannt	5	6,40
Metastasen-Status		
M0	36	46,20
M1	12	15,40
Mx	23	29,50
Unbekannt	75	9,0
Grading		
≤G1	14	17,95
G2	42	53,85
G3	16	20,51
Gx	1	1,28
Unbekannt	5	6,41
Histopathologie		
Duktal	45	57,69
Lobula	13	16,67
Andere	15	19,23
Unbekannt	5	6,41
Östrogenrezeptor (ER)-Status		
Negativ	17	21,79
Positiv	45	57,69
Unbekannt	16	20,51
Progesteronrezeptor (PgR)-Status		
Negativ	16	20,51
Positiv	49	62,82
Unbekannt	13	16,67

Das Expressionslevel von CapG in den Tumorproben kann mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der Patientinnen korreliert werden. Im Durchschnitt lag die relative CapG-Expression im Normalgewebe bei 0,44 und im Tumorgewebe 3-fach höher mit 1,30 (1.30 vs 0.44;  $p < 0.05$  über *student's t-test*, Abb. 7). Die CapG-Expression der Proben wurden in zwei *cut-offs* unterteilt: der untere *cut-off* betrug 0,85 und der obere *cut-off* 1,70.

Unterhalb des *cut-offs* von  $\leq 0,85$  lag eine normale CapG-Expression. Der erste *cut-off* von  $0,85-1,70$  definiert eine mittlere CapG-Expression und ein *cut-off* von  $\geq 1,70$  bezeichnete eine hohe (Über-) Expression von CapG.

In Abbildung 7 sind die *cut-offs* als gestrichelte mit Punkten unterbrochene Linien dargestellt und unterteilen die drei CapG-Expressionsgruppen graphisch. In 34% der Tumorproben ( $n=27$ ) lag eine normale CapG-Expression vor, 37% ( $n=27$ ) wiesen eine mittlere CapG-Expression auf und in 28% der Tumorproben ( $n=22$ ) lag eine hohe CapG-Expression vor.



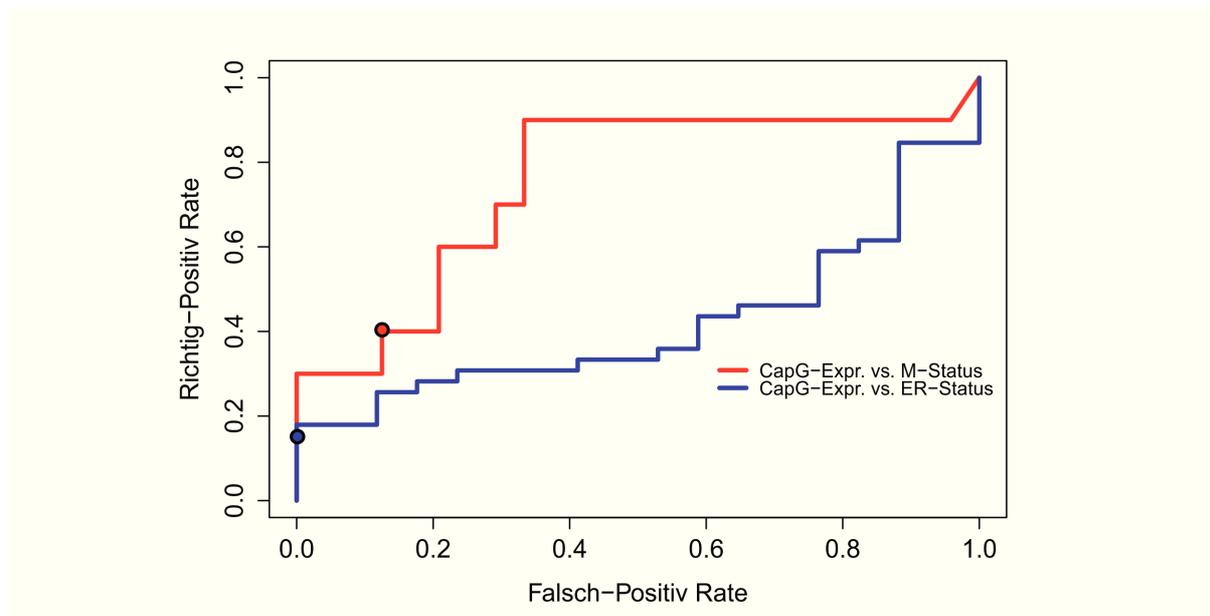
**Abb. 7: CapG-Expression in Tumorproben. A)** Die CapG-Expression relativ zum *housekeeping gene* GAPDH der 78 Tumorproben ist in grau und die Proben des Normalgewebes ( $n=32$ ) in schwarz dargestellt. *Matched* Probenpaar sind im überlappenden Bereich angesiedelt. Der CapG-Expressionsmittelwert des Normalgewebes ist als gepunktete Linie und des Tumorgewebes als durchgängige Linie angezeigt. Die beiden *cut-offs*, welche die Tumorgewebeproben mit normaler, mittlerer oder hoher CapG-Expression unterteilen, sind als gestrichelte mit Punkten unterbrochene Linie dargestellt. Die *cut-offs* sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der CapG-Expression in den Tumorproben definiert. Oberer *cut-off*: 1,70, unterer *cut-off* 0,85.

Alle drei CapG-Expressionsgruppen wurden mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert (Tabelle 4), wobei die Tumorproben mit hoher CapG-Expression statistisch signifikant (*fisher's exact test*,  $p \leq 0,05$ ) mit positivem Metastasen-Status (M1) und negativem Östrogenrezeptor-Status ( $ER^{neg}$ ) korrelierten. Einen Zusammenhang zwischen der CapG-Expression und den anderen klinisch-relevanten Parametern konnte nicht hergestellt werden.

**Tabelle 4:** Assoziation der klinisch-pathologischen Parameter und der CapG Expression

Variable <sup>6</sup>	N <sub>total</sub>	normale Expr. (<0,85)		mittlere Expr. (0,85-1,70)		p-Wert (vs. Normal)	hohe Expr. (>1,70)		
		N=27	%	N=29	%		N=22	%	p-Wert (vs. Normal)
<b>Alter</b>									
<50 Jahre	23	5	6,41	10	12,82	0,233	8	10,26	0,202
>50 Jahre	55	22	28,21	19	24,36		14	17,95	
<b>Tumorstaging</b>									
T1	28	11	14,10	10	12,82	0,067	7	8,97	0,649
T2	37	10	12,82	17	21,79		10	12,82	
≥T3	10	6	7,69	1	1,28		3	3,85	
<b>Lymphknoten-Status</b>									
N0	29	12	15,38	13	16,67	0,782	4	5,13	0,206
≥N1	38	14	17,95	12	15,38		12	15,38	
<b>Metastasen-Status</b>									
M0	36	18	23,08	14	17,95	0,682	4	5,13	<b>0,032</b>
M1	12	3	3,85	4	5,13		5	6,41	
<b>Grading</b>									
G1	14	6	7,69	6	7,69	0,715	2	2,56	0,306
G2	42	17	21,79	14	17,95		11	14,10	
G3	16	4	5,13	6	7,69		6	7,69	
<b>Östrogenrezeptor (ER)-Status</b>									
Negativ	17	2	2,56	7	8,97	0,064	8	10,26	<b>0,012</b>
Positiv	45	21	26,92	14	17,95		10	12,82	
<b>Progesteronrezeptor (PgR)-Status</b>									
Negativ	16	4	5,13	4	5,13	>0,99	8	10,26	0,102
Positiv	49	20	25,64	17	21,79		12	15,38	

Es wurde eine ROC-Analyse durchgeführt, um CapG als möglichen Klassifikator<sup>7</sup> im Kontext von Metastasierungs-Status (M-Status) und Östrogenrezeptor-Status (ER-Status) zu identifizieren (Abb. 8). Der CapG-Expressions-*cut-off* von 1,70 erlaubt im Falle des M-Status in 40% eine Richtig-Positiv-Klassifizierung bei gleichzeitiger Fehlerquote von 16% (roter Punkt in Abb. 8) mit einer AUC<sup>8</sup> von 0,752. Für den ER-Status liegt bei dem *threshold* von 1,70 eine 10% Trefferquote vor und 0% Falsch-Positiv-Klassifizierung (blauer Punkt in Abb. 8) mit einer AUC von 0,578.



**Abb. 8: CapG ROC-Analyse.** Der *cut-off* von 1,70 erlaubt in Bezug auf den M-Status in 40% eine Richtig-Positiv-Klassifizierung bei gleichzeitiger Fehlerquote von 16%. AUC beträgt 0,752. Bezugnehmend auf den ER-Status liegt bei dem *threshold* von 1,70 eine 10% Trefferquote und 0% Falsch-Positiv-Klassifizierung vor. Die AUC beträgt 0,578.

### 3.2 CapG Expression in Brustkrebszelllinien

Der Zusammenhang der CapG-Expression mit der Metastasierung erlaubt die Frage nach den Mechanismen, die unter CapG-Beteiligung zur Infiltration und Dissemination von Tumorzellen führte. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde zunächst ein passendes Zellkulturmodell etabliert. Hierfür wurde nach den Zelllinien mit der größten Divergenz in der CapG-Expression gesucht. Dazu wurden 8 Zelllinien mittels qRT-PCR auf deren CapG-Expression hin getestet und auf die Zelllinie MCF12A - aus ursprünglichem Brustnormalgewebe generiert - normalisiert. Wird nun das nachgewiesene CapG-Expressions-

<sup>7</sup>Ein perfekter Klassifikator erzeugt einen Punkt in der linken oberen Ecke des Diagramms und entspricht einer Trefferquote von 100% (alle positiven Ereignisse werden als solche erkannt) und einer Fehlerrate von 0% (kein negatives Ereignis wird als positiv erkannt).

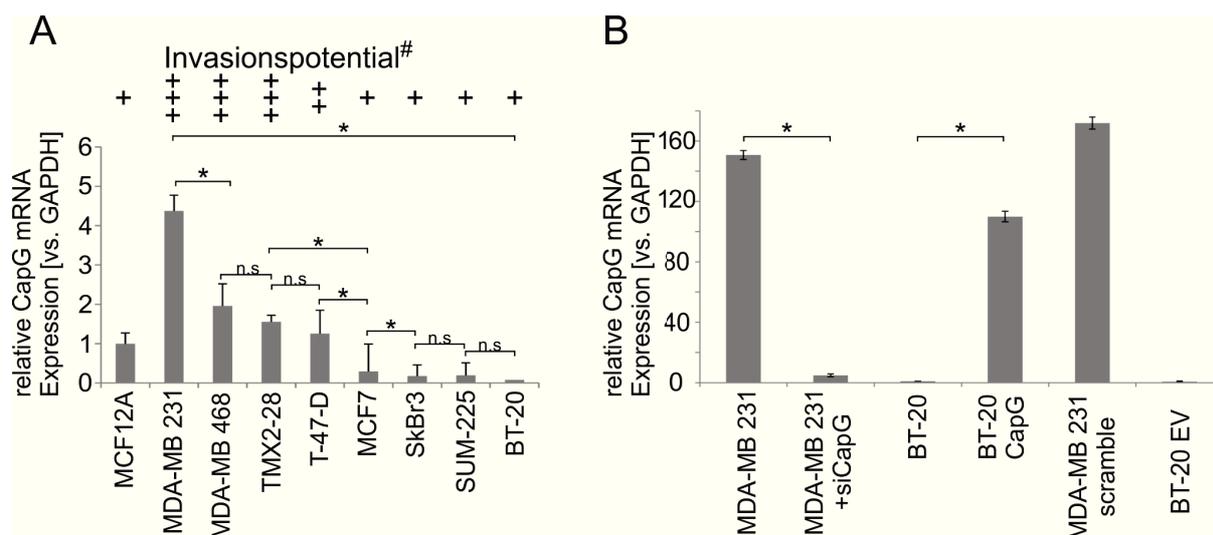
<sup>8</sup>AUC (*area under the ROC curve*), die Fläche unterhalb der ROC-Kurve gilt als Maß für die Qualität des Klassifikators. Je besser die Klassifizierungsfähigkeit des Klassifikators desto höher ist der AUC-Wert mit einem maximal Wert von 1.

niveau (relativ zu GAPDH) in den verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien mit deren Invasionspotential (aus der Literatur[105][38][68][39]) korreliert, wird der Zusammenhang zwischen ansteigender CapG-Expression und erhöhtem Invasionspotential deutlich (Abb. 9 A).

Die Korrelation von erhöhter CapG-Expression und Invasivität in den Zelllinien und insbesondere in den MDA-MB 231 Zellen bzw. BT-20 Zellen scheint die Beobachtung in den Daten aus den Tumorproben zu bestätigen. Somit ist ein Abfall der CapG-Expression parallel zum Abfall des Invasionspotentials erkennbar. Die hoch invasiven MDA-MB 231 Zellen und die niedrig invasiven BT-20 erwiesen sich als jene Zelllinien mit der größten Differenz in der CapG-Expression. MDA-MB 231 hatten eine im Vergleich zum internen Standard (*housekeeping gene* GAPDH) relative CapG-Expression von 4,38. Die BT-20 Zellen wiesen eine relative CapG-Expression von 0,08 auf. Die durchschnittliche CapG-Expression aller getesteten Zelllinien (exklusive MCF-12A) war 1,34 und der Median betrug 1,13. Auf Grund dieser deutlichen Divergenz wurden die Zelllinien MDA-MB 231 und BT-20 als Zellkulturmodell ausgewählt, um der Frage nach den Mechanismen, die unter CapG-Beteiligung zur Infiltration und Dissemination von Tumorzellen führt, zu klären. Erwartungsgemäß wurde in der Östrogenrezeptor-negativen, hoch invasiven Zelllinie TMX2-28 eine deutlich höhere CapG-Expression nachgewiesen, im Vergleich zu deren Östrogenrezeptor-positive, niedrig invasiven parentalen Zelllinie MCF7. Die Zelllinie TMX2-28 wurde aus der MCF-7 Brustkrebszelllinie nach mehrfacher Kultivierung unter Zugabe des Anti-Östrogens Tamoxifen generiert und TMX2-28 besitzen zudem ein Invasionspotential ähnlich zu dem von MDA-MB 231[39]. Bei den Patientenproben, korrelierte eine erhöhte CapG-Expression mit einem negativen Östrogenrezeptor-Status (siehe Tabelle 4 auf Seite 37).

Frühere Daten konnten anhand von Invasionsassays (siehe Seite 8 und [100]) beweisen, dass nach dem CapG-Knock-Down das Invasionspotential in den MDA-MB 231 Zellen (als MDA-MB 231/siCapG bezeichnet) abfiel, wobei durch CapG-Überexpression in den BT-20 Zellen (als BT-20/CapG bezeichnet) ein deutlicher Anstieg des Invasionspotentials zu verzeichnen war.

Anhand dieses Ergebnisses wurden die Zelllinien MDA-MB 231 und BT-20 hinsichtlich deren CapG-Expression (als Zellkulturmodell) für die folgenden Versuche verwendet und deren CapG-Expression per qRT-PCR gemessen (Abb. 9 B). Als Kontrolle für nachfolgende Versuche wurden *scrambled* siRNA in MDA-MB 231 Zellen (MDA-MB 231 *scrambled*) und mit Leervektor transfizierte BT-20 Zellen (BT-20 EV) verwendet. Erwartungsgemäß führte die nonsens siRNA (*scrambled*) zu keiner verminderten Expression, während die Transfektion des Leervektors in BT-20 Zellen zu keiner verstärkten Expression führte.



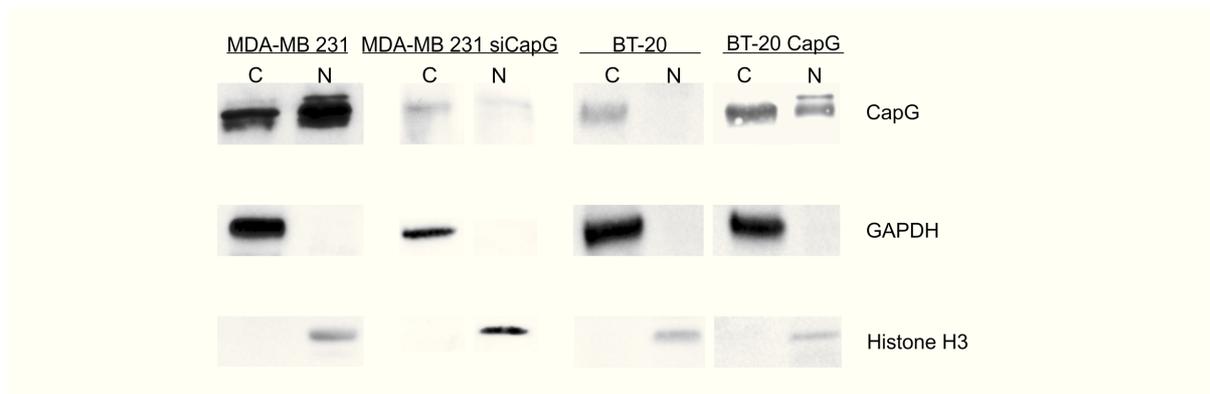
**Abb. 9: Invasionspotential von CapG in Zelllinien.** **A)** CapG-Expression von (Brustkrebs-) Zelllinien (n=9) per qRT-PCR nachgewiesen und nach Invasionspotential sortiert. MDA-MB 231 Zellen hatten höchste (4,38) bzw. BT-20 Zellen die geringste (0,08) CapG-Expression. MCF-12A Zellen dienten als Referenz (1,00). CapG Level (relativ zu GAPDH) korrelierte mit Invasionspotential (#aus der Literatur[105][38][68][39]). **B)** Zur Etablierung des Zellkulturmodells wurden MDA-MB 231 und BT-20 sowie die CapG-Knock-Down Variante in MDA-MB 231 (MDA-MB 231/siCapG) oder CapG-Überexpression in BT-20 (BT-20/CapG) auf CapG-Expression getestet. In den MDA-MB 231/siCapG wurde eine 12-fach geringere, in den BT-20/CapG eine 8-fach größere CapG-Expression nachgewiesen. Kontrollen: siRNA *scrambled* bzw. Levektor (*empty vector*=EV). \* $p \leq 0,05$ ; n.s.= nicht signifikant. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

### 3.3 Subzelluläre Verteilung von CapG

Die Charakterisierung aus immunologischen Färbungen des Zellkulturmodells erwies, dass CapG sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern und im Nucleolus lokalisiert war.

Zunächst konnte die Lokalisation von CapG im Nucleus (Abb. 10) in einer Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden, wobei in den MDA-MB 231 Zellen nach einem - nicht vollständigen - Knock-Down CapG im Nucleus nicht mehr nachweisbar war. Bei den CapG Färbungen und der subzellulären Fraktionierung der Zellen des Zellkulturmodells fiel auf, dass die subzelluläre Verteilung von CapG im Zellkulturmodell unterschiedlich und von der Manipulation (gemeint ist siRNA Knock-Down oder Überexpression) auf translationaler Ebene betroffen war. So war die Lokalisation von CapG in den hoch invasiven MDA-MB 231 Zellen sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus vorhanden und in den MDA-MB 231/siCapG konnte kaum CapG im Cytoplasma und gar kein CapG im Nucleus nachgewiesen werden. In den mit geringem Invasionspotential beschriebenen BT-20 Zellen lag CapG im Cytoplasma vor, jedoch nicht im Zellkern. Nach Überexpression war in den BT-20/CapG Zellen CapG ebenfalls im Zellkern nachweisbar.

Es konnten unterschiedliche Bandenmuster im Immunoblot abhängig vom zellulären Kompartiment visualisiert werden. Als Kontrollen der erfolgreichen subzellulären Fraktionierung wurden die Marker GAPDH (Cytoplasma) und Histon H3 (Nucleus) verwendet.



**Abb. 10: Subzelluläre Lokalisation von CapG.** CapG in den MDA-MB 231 im Cytoplasma (C) und Zellkern (N), wobei in MDA-MB 231/siCapG CapG in beiden Fraktionen kaum nachweisbar war. CapG war in den BT-20 im Cytoplasma, jedoch nicht im Zellkern. Überexpression (BT-20/CapG) von CapG führte zu Signalen in beiden Fraktionen. Als Marker dienten GAPDH (Cytoplasma) und Histone H3 (Zellkern) verwendet. \* $p \leq 0,05$ ; n.s.= nicht signifikant. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

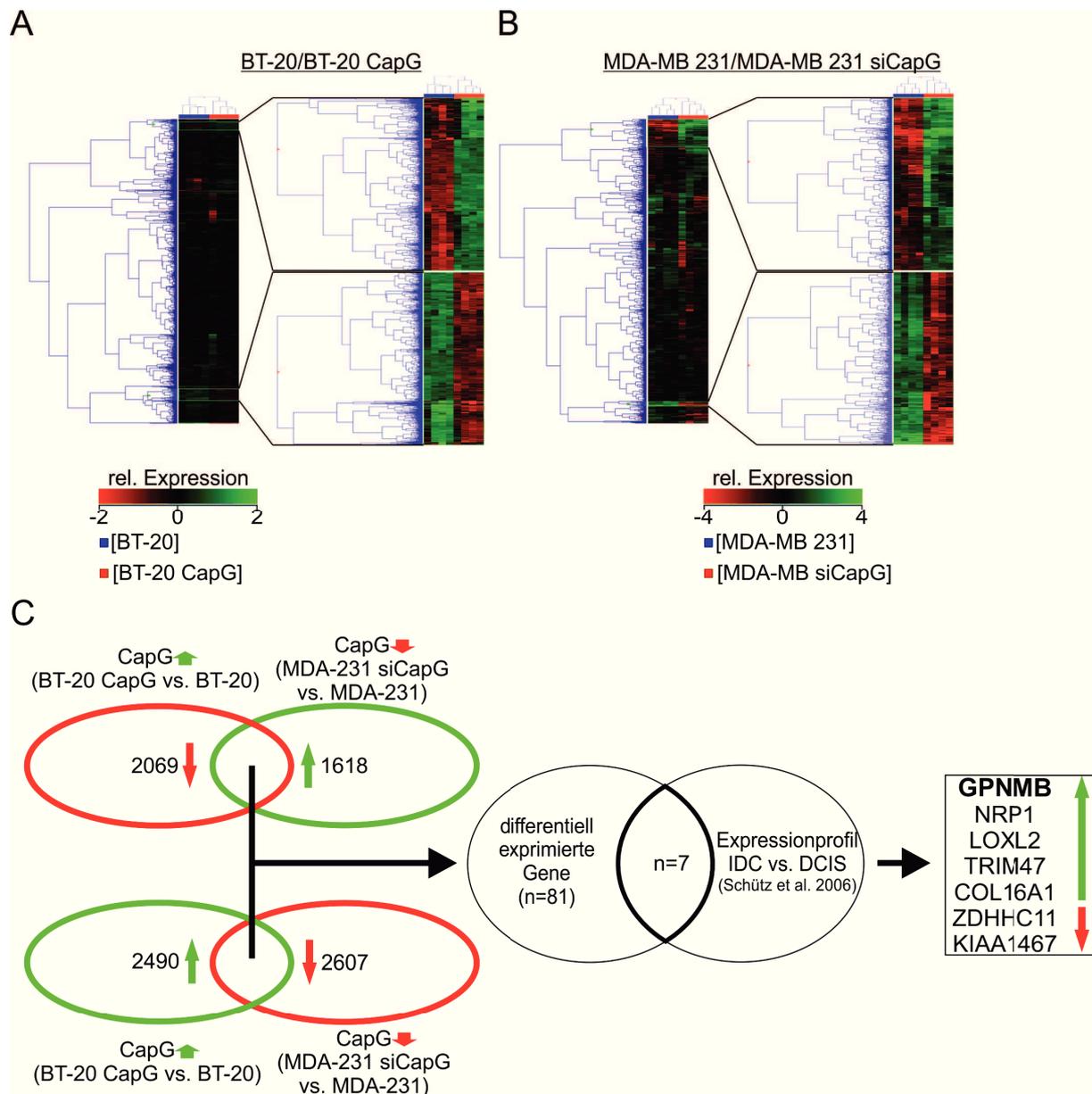
### 3.4 Microarray basierte Transkriptomanalyse des Zellkulturmodells zeigt ein CapG-abhängiges Expressionsprofil

Die Zellkern-Lokalisation von CapG könnte ein Hinweis auf eine direkte oder indirekte CapG-abhängige Modulation der Genexpression sein, wie auch bei De Corte und Gettemans vermutet[27][35]. Um dieser Vermutung nachzugehen und potentielle CapG-abhängige *target*-Gene zu identifizieren, wurden Microarray-Experimente durchgeführt. Unter Verwendung der Microarray-Technologie können im Zellkulturmodell die Auswirkungen einer CapG-Überexpression (BT-20 vs. BT-20/CapG) und eines CapG Knock-Downs (MDA-MB 231 vs. MDA-MB 231/siCapG) auf Genexpressions-Ebene dargestellt werden. Die Microarraystudie wurde wie folgt aufgebaut, um mögliche CapG-abhängig regulierte *target*-Gene zu identifizieren: für jede Zelllinie, d.h. BT-20 bzw. MDA-MB 231, CapG Überexpression in BT-20/CapG und CapG Knock-Down in MDA-MB 231/siCapG, wurden 4 Microarray-Replikate durchgeführt und vermessen. Es wurden nur solche detektierten Transkripte verwendet, welche in mindestens 3 der 4 Replikate und in mindestens einem Zelllinien-Expressionsprofil gemessen wurden. Anschließend wurden zwei Konditionen gebildet: Kondition 1 stellt die Transkripte von BT-20 denen von BT-20/CapG gegenüber und Kondition 2 stellt die Transkripte von MDA-MB 231 denen von MDA-MB 231/siCapG gegenüber. Dieser Abgleich wurde danach, zur Erstellung der unterschiedlichen Expressionsprofile, einem hierarchischen *clustering* unterzogen. Näheres zur Statistik ist unter 2.21.5 auf Seite 33 beschrieben.

Es wurden für die 1. Kondition (BT-20 vs. BT-20/CapG) 26830 Transkripte (linke Seite, Abb. 11 A) detektiert. Das *subclustering* erfolgte unter Beachtung des korrigierten p-Wertes von  $\leq 0,05$  und resultierte in zwei geclusterten Gruppen (rechte Seite, Abb. 11 A) von hoch-regulierten bzw. supprimierten Genen und in Bezug auf die CapG-Überexpression in BT-20/CapG verglichen zur BT-20 Kontrolle (n=4559). Die 2. Kondi-

tion (MDA-MB 231 vs. MDA-MB 231/siCapG) ergab nach dem hierarchischen *clustering* 29217 Transkripte (linke Seite, Abb. 11 B) und nach dem *subclustering* 4225 (rechte Seite, Abb. 11 B). Zum Vergleich wurden die nativen Zelllinien als Kontrollen (BT-20 bzw. MDA-MB 231 in blau, Abb. 11 A und B) herangezogen. In Rot sind die CapG-modulierten Zelllinien (BT-20/CapG bzw. MDA-MB 231/siCapG) dargestellt. Anschließend wurde ein Vergleich der beiden Konditionen durchgeführt (Abb. 11 C). Es resultierten zwei Gruppierungen: die erste bestand aus solchen Transkripten, die bei CapG-Überexpression einen Abfall verzeichneten und bei CapG-Knock-Down einen Anstieg in der eigenen Expression aufwiesen. Die zweite Gruppe bestand aus solchen Transkripten, die bei CapG-Überexpression einen Anstieg und bei CapG-Knock-Down einen Abfall in der eigenen Expression verzeichneten. Demzufolge wurden in der ersten Gruppierung 2069 runterregulierte Gen-Transkripte bei gleichzeitiger CapG-Überexpression (BT-20 vs. BT-20/CapG) mit 1618 hochregulierten Gen-Transkripten bei gleichzeitigem CapG Knock-Down (MDA-MB 231 vs. MDA-MB 231/siCapG) überlagert. In der zweiten Gruppierung wurden 2490 Transkripte mit einem Anstieg bei gleichzeitiger CapG-Überexpression (BT-20 vs. BT-20/CapG) den 2607 Transkripten, welche einen Abfall bei gleichzeitiger Minderung im CapG-Expression Level verzeichneten (MDA-MB 231 vs. MDA-MB 231/siCapG), gegenüber gestellt. Folglich stellt die 1. Gruppierung solche Transkripte dar, welche gegensätzlich zu CapG reguliert sind, während die 2. Gruppierung die co-regulierten Transkripte beinhaltet. Wird in diesen beiden Gruppierungen deren Schnittmenge dargestellt, erhält man 20 konträr- und 61 co-regulierte Genprodukte ( $n_{total}=81$ ). Die Liste der nach  $\Delta FC$  sortierten, differentiell exprimierten Gene liegt als Tabelle 5 auf Seite 45 vor. Wobei  $\Delta FC$  ( $FC=fold-change$ ) die Differenz der Genexpressionswerte zwischen den Konditionen angibt. Demnach die Differenz zwischen Überexpression in der einen Kondition (BT-20/CapG oder MDA-MB.231/siCapG) und dem Abfall im Expressionsniveau in der anderen Kondition (BT-20/CapG oder MDA-MB 231/siCapG). Die Änderung der Genexpression ausgehend vom Referenzwert wird im *fold-change* (Ratio) angegeben und liegt im Vergleich zur Kontrolle x-fach hoch ( $FC_{hoch}$ ) bzw. runter ( $FC_{runter}$ ) reguliert vor. Somit wies das mit CapG co-regulierte Gen *gpnmb* eine 2,47-fache Überexpression in den BT-20/CapG auf, während es in den MDA-MB 231/siCapG eine 4,57-fach verringert vorlag. Demnach lag ein  $\Delta FC$ -Wert von 7,04 vor. Bei den konträr zu CapG regulierten Genen war in den BT-20/CapG Zellen eine 3,89-fache Minderung gemessen worden, während in den MDA-MB 231/siCapG ein 1,56-facher Anstieg von ZDHHC11-mRNA vorlag. Die im Zellkulturmodell identifizierten 81 mit der CapG-Expression assoziierten Kandidatengene wurden anschließend mit einem Datensatz von Schütz et al.[99] verglichen. Bei diesem Datensatz wurden die Gen-Expressionsprofile von IDC- und DCIS-Proben verglichen und folglich Kandidaten-Gene offen gelegt, die im invasiven Tumor (IDC) erhöht oder vermindert exprimiert wurden. CapG war in invasiven Tumoren dieses Datensatzes ebenfalls überexprimiert. Es wurde die Schnittmenge vom Set mit den 81 differentiell

exprimierten Gene mit den Transkripten des Sets aus dem IDC/DCIS-Expressionsprofil (n=546) bestimmt. Daraus resultierten 7 potentiell CapG-abhängig regulierte Kandidaten. Diese waren 5 im IDC hochregulierte: *GPNMB*, *NRP1*, *LOXL2*, *TRIM47*, *COL16A1* und 2, ebenfalls im IDC, runterregulierte: *ZDHHC11*, *KIAA1467*. In Tabelle 5 (Seite 45) sind diese Kandidaten gelb unterlegt.



**Abb. 11: CapG-abhängiges Genexpressionsprofil mittels Microarray.** **A)** Hierarchisches *clustering* von Kondition 1 (BT-20 vs. BT-20/CapG) lieferte 26830 Transkripten (linke Seite) und nach dem *subclustering* 4559 Transkripte (rechte Seite). **B)** Hierarchisches *clustering* von Kondition 2 (MDA-MB 231 vs. MDA-MB 231/siCapG) resultierten in 29217 Transkripte (linke Seite) und 4225 (rechte Seite) nach *subclustering*. Kontrollen (BT-20 bzw. MDA-MB 231) sind in Blau und CapG-Modulationen (BT-20/CapG bzw. MDA-MB 231/siCapG) in Rot. **C)** Konditionen 1 und 2 wurden verglichen. Hierbei bestand eine Transkript-Gruppierung aus solchen, die bei CapG-Überexpression einen Anstieg und bei CapG-Knock-Down einen Abfall in ihrer eigenen Expression verzeichneten. Die andere Transkript-Gruppierung bestand aus solchen, die einen Abfall bei CapG-Überexpression und einen Anstieg bei CapG-Knock-Down aufwiesen. Werden diese zwei Gruppen verglichen, resultiert daraus ein Set von 81 differentiell exprimierten Genen. Dieses Set wurde mit den Transkripten des Expressionsprofils (n=546) aus einer IDC/DCIS-Studie von Schütz et al.[99] überlagert und ergab 7 potentiell CapG-abhängig regulierte Kandidaten. Hochreguliert: *GPNMB*, *NRP1*, *LOXL2*, *TRIM47*, *COL16A1*; Runterreguliert: *ZDHHC11*, *KIAA1467*. MDA-MB 231 Zellen werden hier als MDA-231 bezeichnet. Für nähere Erläuterungen siehe Text. Statistik ist unter 2.21.5 auf Seite 33 beschrieben.

Tabelle 5: Signifikant differentiell exprimierte Gene vom Microarray

CapG co-regulierte Gene (n=61)				
Uniprot ID	Gen-Symbol	$FC_{hoch}$	$FC_{runter}$	$\Delta FC$
Q15743	GPR68	2,18	8,01	10,18
O75712	GJB3	1,54	8,05	9,60
Q96D03	DDIT4L	2,11	7,46	9,57
P35070	BTC	2,06	7,50	9,56
Q9H6B4	CLMP	1,89	7,55	9,44
Q6ZSS2	FLJ45248	1,54	7,31	8,85
P60022	DEFB1	1,89	6,88	8,77
P61812	TGFB2	3,05	5,43	8,48
Q8IYY4	DZIP1L	1,96	6,34	8,30
Q03135	CAV1	1,60	6,09	7,68
O60423	ATP8B3	1,75	5,56	7,32
Q13972	RASGRF1	1,67	5,59	7,26
Q14956	GPNMB	2,47	4,57	7,04
A6NHC0	CAPN8	3,40	3,42	6,83
	LOC28164	4,05	2,41	6,46
O95994	AGR2	2,18	3,98	6,16
O76076	WISP2	1,68	4,33	6,01
Q96B21	TMEM45B	1,65	4,28	5,93
Q8N428	GALNTL1	1,71	4,17	5,89
Q8N2G4	LYPD1	1,55	4,28	5,82
P78363	ABCA4	1,88	3,87	5,75
Q6KB66	KRT80	1,75	4,00	5,75
	LOC388242	1,95	3,73	5,67
B3EWG3	FAM25A	2,04	3,40	5,44
Q9BR39	JPH2	2,00	3,34	5,34
Q12955	ANK3	1,65	3,70	5,34
Q12642	FHL1	2,54	2,75	5,30
Q15198	PDGFRL	1,65	3,45	5,10
Q07092	COL16A1	1,64	3,39	5,02
O14789	NRP1	2,17	2,82	4,99
Q9Y4K0	LOXL2	1,83	3,06	4,89
Q8NES3	LFNG	1,55	3,26	4,82

...

**Tabelle 5:** Signifikant differentiell exprimierte Gene vom Microarray (*Fortsetzung*)

Uniprot ID	Gen-Symbol	$FC_{hoch}$	$FC_{runter}$	$\Delta FC$
Q7Z7L8	C11orf96	1,88	2,72	4,59
O43561	LAT	1,53	3,04	4,57
Q8NG50	RDM1	2,00	2,56	4,56
Q14050	COL9A3	2,36	2,18	4,55
A4FU49	SH3D21	1,64	2,91	4,55
Q86VZ5	SGMS1	1,57	2,96	4,53
Q6ZMC9	SIGLEC15	1,67	2,79	4,46
O95407	TNFRSF6B	1,52	2,94	4,46
O75095	MEGF6	1,56	2,88	4,44
P56705	WNT4	1,51	2,82	4,33
	NCRNA	1,66	2,65	4,30
Q93099	HGD	2,25	1,96	4,22
Q9NR12	PDLIM7	1,66	2,57	4,22
Q14765	STAT4	1,51	2,71	4,22
Q14511	NEDD9	1,66	2,52	4,18
P43121	MCAM	1,83	2,31	4,15
Q5T013	HYI	1,58	2,55	4,13
Q8NF64	ZMIZ2	1,83	2,29	4,12
Q12791	KCNMA1	1,55	2,49	4,04
Q96LD4	TRIM47	1,67	2,34	4,01
	LOC401431	1,89	2,09	3,98
Q99715	COL12A1	1,76	2,06	3,83
O75343	GUCY1B2	1,62	2,09	3,70
O14967	CLGN	2,09	1,55	3,64
Q15884	FAM189A2	1,74	1,72	3,46
Q86YV5	SGK223	1,70	1,72	3,43
Q9UII6	DUSP13	1,70	1,68	3,38
Q9H8W5	TRIM45	1,50	1,89	3,38
Q496Y0	LONRF3	1,79	1,55	3,35

---

**CapG konträr regulierte Gene (n=20)**

---

Uniprot ID	Gen-Symbol	$FC_{hoch}$	$FC_{runter}$	$\Delta FC$
P01344	IGF2	10,34	1,92	12,26
Q9BY60	GABARAPL3	2,16	4,91	7,07
Q5I0G3	MDH1B	5,29	1,66	6,95

...

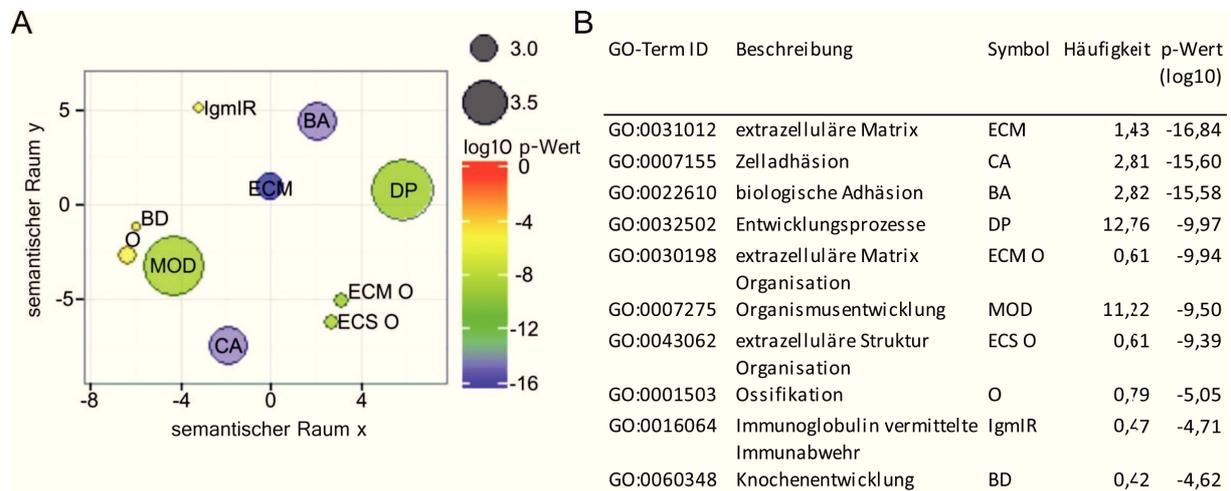
**Tabelle 5:** Signifikant differentiell exprimierte Gene vom Microarray (*Fortsetzung*)

Uniprot ID	Gen-Symbol	FC <sub>hoch</sub>	FC <sub>runter</sub>	$\Delta$ FC
Q9NZR2	LRP1B	3,81	1,82	5,63
Q9H0R8	GABARAPL1	2,11	3,49	5,60
Q9HB03	ELOVL3	3,73	1,80	5,53
Q9H8X9	ZDHHC11	3,89	1,56	5,46
P09972	ALDOC	3,21	1,92	5,14
P23763	VAMP1	3,01	1,72	4,74
A2RU67	KIAA1467	3,11	1,62	4,73
Q13007	IL24	2,33	1,89	4,22
	LOC29794	2,68	1,50	4,18
P49281	SLC11A2	2,62	1,56	4,17
P26373	RPL13	2,58	1,50	4,08
P10768	ESD	2,07	1,69	3,76
Q0VAQ4	SMAGP	1,64	1,96	3,60
A5PL33	KRBA1	1,94	1,53	3,47
Q9BXT2	CACNG6	1,57	1,71	3,29
Q96EK7	PPARG	1,65	1,51	3,16
Q7Z5G4	GOLGA7	1,55	1,56	3,11

### 3.5 Gene Ontology-Analyse der Microarray-Ergebnisse

Um den Effekt der CapG-abhängigen Modulation der Genexpression in Bezug auf Zellfunktionen und -prozessen zu erfassen, wurde der Microarray-Datensatz mit den 81 Kandidatengenen bioinformatisch analysiert. Hierfür wurde eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse zur Einordnung der identifizierten Gene in funktionelle Gruppen, basierend auf GO-Termen (molekulare Funktion, zelluläres Kompartiment und biochemischer Prozess) durchgeführt. Abschließend wurden die daraus resultierenden GO-Terme mit Hilfe des REVIGO-Tools [110] zusammengefasst. Folglich liegt eine konzentrierte Liste von GO-Termen vor, welche die am meisten angereicherten Annotationen (Genfunktionen) zusammenfasst. Das Resultat lässt durch die Modulation der CapG-Expression Auswirkungen in den Bereichen der extrazellulären Matrix (ECM), ECM Organisation (ECM O), extrazelluläre Struktur Organisation (ECS O), Zell- und biologische Adhäsion (CA bzw. BA), Knochenentwicklung (BD) und Ossifikation (O), Immunoglobulin vermittelte Immunabwehr (IgmIR) und Organismuserwicklung (MOD) sowie Entwicklungsprozesse (DP) erkennen. Wobei die GO-Terme der Zelladhäsion und der biologischen Adhäsion ( $p\text{-Wert}_{\log_{10}} \leq -15,60$ ) und ECM ( $p\text{-Wert}_{\log_{10}} \leq -16,84$ ) die deutlichste Signifikanz vorwiesen. Weiterhin lagen mit 1,43 (ECM), 2,81 (CA) bzw. 2,82 (BA) die spezifischen Häufigkeiten nach DP und MOD an zweithöchster Stelle. In Abbildung 12 wird die GO-Analyse zusammengefasst. Die

statistische Signifikanz wird hier im  $\log_{10}$  p-Wert angegeben. Auf der X- bzw. Y-Achse wird die semantische Beziehung der GO-Termini wiedergegeben, d.h. GO-Terme werden auf Grund ihres Verwandtschaftsgrades zusammengelegt. Die Spot-Größe verdeutlicht die Frequenz der unter einem Begriff auftretenden GO-Termini, je größer desto allgemeiner, je kleiner desto spezifischer.



**Abb. 12: Gene Ontology-Analyse der Microarray-Daten.** GO-Analyse der Microarray-Daten erfolgte zunächst über den Anreicherungs-Algorithmus des Web-Tools DAVID (EASE-Score=0,01, Benjamini-Hochberg FDR=0,01)[43]. Anschließend wurden die erhaltenen GO-Termini über das simRel-Score Verfahren[97] mit dem Web-Tool REVIGO[110] verdichtet. Statistische Signifikanz wird als  $\log_{10}$  p-Wert angegeben. X- bzw. Y-Achse repräsentieren die semantische Beziehung der GO-Termini, d.h. GO-Terme werden auf Grund ihres Verwandtschaftsgrades verdichtet. Die Kreis-Größe verdeutlicht die Häufigkeit der unter einem Begriff auftretenden GO-Termini, je größer desto allgemeiner, je kleiner desto spezifischer. **A)** Graphische Darstellung der GO-Termini und deren Lage zueinander, sowie deren räumliche Größe. ECM, CA und BA sind mit p-Werten  $\leq -16,84$  bzw.  $-15,60$  die am stärksten angereicherten GO-Annotationen und beschreiben die zweit spezifischsten Häufigkeiten (1,43; 2,81 und 2,82). **B)** Detailangaben zu **A** mit Erläuterung der Abkürzungen, Häufigkeiten und p-Werten

### 3.6 CapG- und GPNMB-Expression ist assoziiert mit der Progression vom duktalem Karzinom *in situ* zum invasiven duktalem Karzinom

Die Progression vom DCIS zum IDC ist, insbesondere in Bezug auf das Invasionspotential, mit Veränderungen in der Genexpression assoziiert. Um die Rolle von CapG bei dieser Tumorprogression, folglich auch der Invasion und späteren Metastasierung, schrittweise zu verstehen, wurden zunächst DCIS- und IDC-Proben auf CapG-Expression mittels qRT-PCR hin untersucht. Anschließend erfolgten weitergehende Validierungen der Microarray-Analysen anhand dieser Proben<sup>9</sup>.

Es erfolgte die Durchführung der qRT-PCR an zwei Proben-Sets, welche beide aus Laser-Captured-Microdissection (LCM) isolierte *matched* FFPE (Formalin-fixiert in Paraffin eingebettete) DCIS und IDC-Proben bestanden. Das erste Set mit 16 *matched* Brustkrebsproben ist dasselbe, welches zuvor auch in der Arbeit von Schütz et al. verwendet wurde[99] und wird als Test-Set bezeichnet (Abb. 13). Das zweite Set wird als Validierungs-Set bezeichnet und besteht aus 14 FFPE-*matched* DCIS- und IDC- Proben.

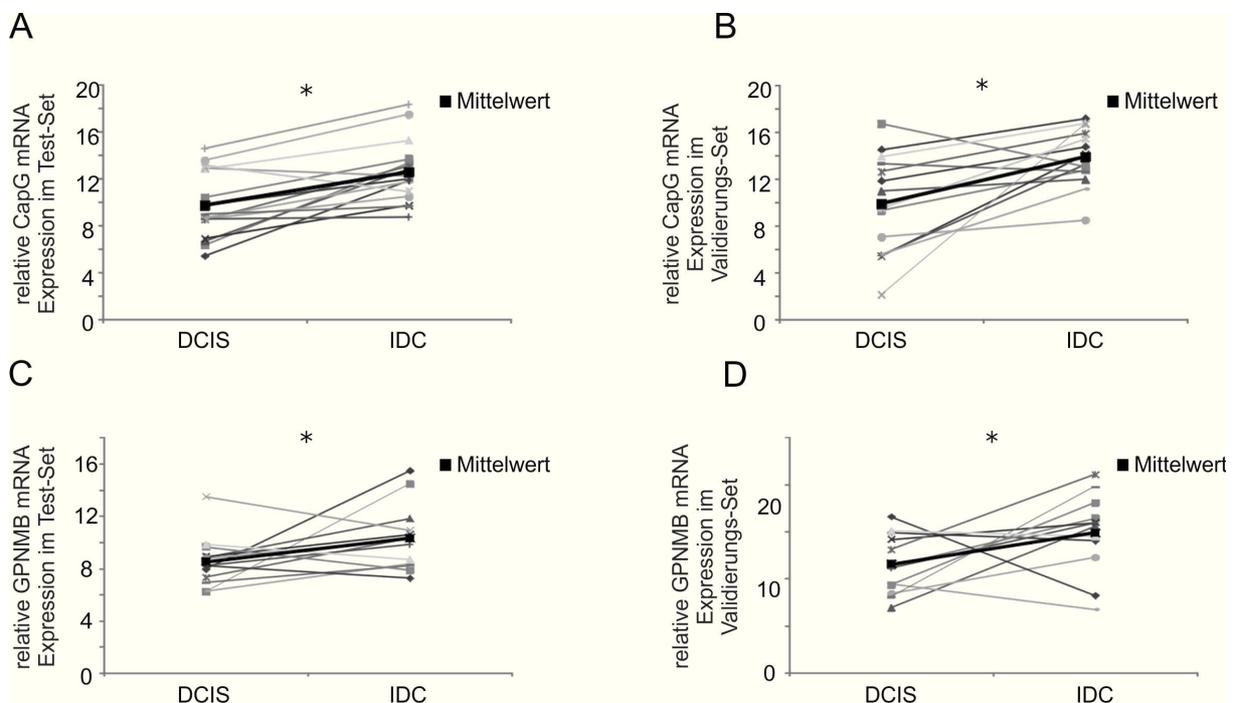
Die durchschnittliche rel. CapG-Expression im Test-Set im DCIS lag bei 9,76 und im IDC bei 12,60. Im Validierungs-Set wurde ein Durchschnitt der rel. CapG-Expression für das DCIS von 9,91 und im IDC von 13,90 errechnet. In beiden Probenkontingenten, sowohl dem Test- als auch dem Validierungs-Set, konnte ein signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Anstieg in der CapG-Expression verzeichnet werden (Abb. 13 A und B). In wenigen IDC-Proben ( $n=3$ ) wurde eine Minderung in der CapG-Expression nachgewiesen. Der höchste relative CapG-Expressionswert in den DCIS-Proben, über beide Probenkontingente hinweg, lag bei 16,75 und der niedrigste Wert bei 2,13. Dem gegenüber, bei den IDC-Proben beider Probenkontingente, wurde eine relative CapG-Expression von 18,36 als Maximum und ein Minimum von 8,51 errechnet.

Das transmembrane *glycoprotein non-metastatic melanoma B* (GPNMB) wurde im Gen-Expressions-Profil des Zellkulturmodells mittels Microarray als potentiell CapG-abhängig reguliert gemessen. Nach der Überlagerung der Daten (Microarray vs. Schütz et al.-Datensatz) konnte es unter den 7 identifizierten Kandidatengen als dasjenige Gen identifiziert werden, welches den höchsten  $\Delta FC$ -Wert (7,04; 5 auf Seite 45) vorwies und somit am stärksten auf die induzierten Änderungen der CapG-Expression reagierte.

Deshalb wurde GPNMB als der potenteste CapG-abhängig regulierte Kandidat betrachtet und die GPNMB-Expression ebenfalls im Test-Set und Validierungs-Set gemessen (Abb. 13 C und D).

<sup>9</sup>Die DCIS- und IDC-Proben entstammten aus Paraffinblöcken von 30 primären Brustkrebsbiopsien mit DCIS- und IDC-Arealen. Zur Separation der IDC-Anteile vom DCIS und der anschließenden Isolation des epithelialen Tumorgewebes wurde das FFPE-Gewebe mittels Laser-Capture-Microdissection (LCM) gewonnen. Diese Arbeit mit anschließender RNA-Isolation aus diesen Proben wurde von Frau Dr. Silke Schultz in Tübingen durchgeführt.

Im Test-Set lag der durchschnittliche rel. GPNMB-Expressionswert in den DCIS-Proben bei 8,53 und im IDC bei 10,33. Im Validierungs-Set wurde der durchschnittliche GPNMB-Expressionswert im DCIS auf 11,56 und im IDC auf 14,88 bestimmt. Sowohl im Test- als auch im Validierungs-Set konnte ein signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Anstieg in der GPNMB-Expression verzeichnet werden (Abb. 13 C und D). Solchen Proben ( $n=6$ ), welche einen Abfall in der GPNMB-mRNA verzeichneten, waren nicht identisch mit solchen, die auch einen Abfall in der CapG-mRNA vorwiesen. Der höchste relative GPNMB-Expressionswert in den DCIS-Proben, über beide Probenkontingente hinweg, lag bei 16,61 und der niedrigste bei 6,23. Dem gegenüber, bei den IDC-Proben beider Probenkontingente, wurde eine relative GPNMB-Expression von 21,08 als Maximum und ein Minimum von 6,77 errechnet.

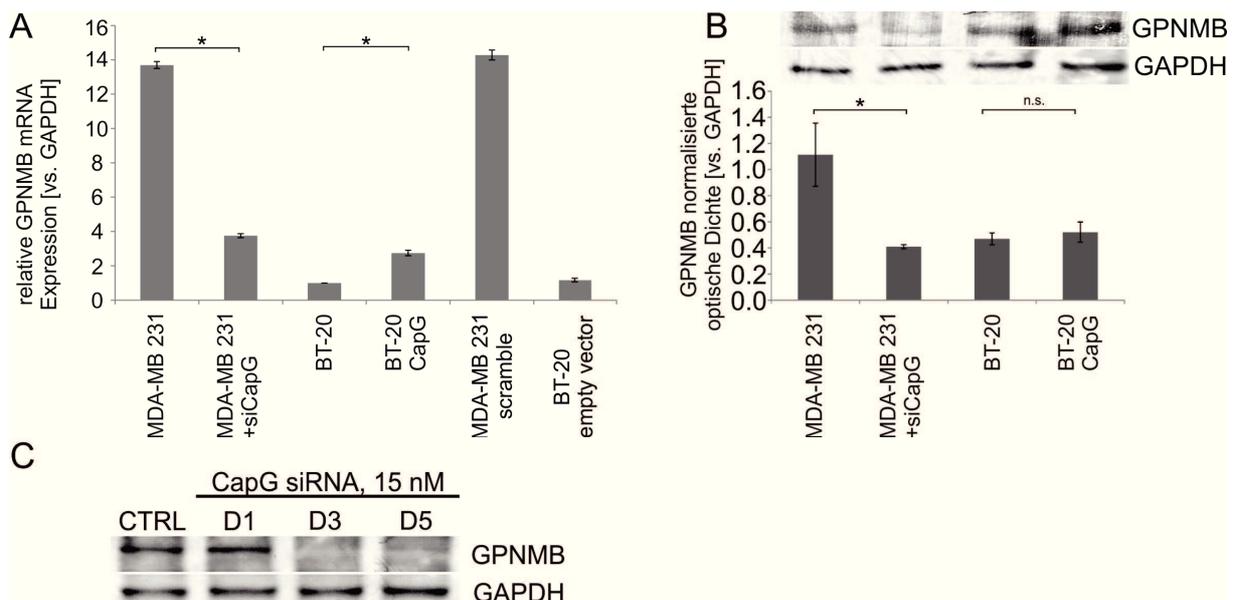


**Abb. 13: Erhöhte CapG- und GPNMB-Expression im invasiven duktalem Karzinom. A+B)** Signifikanter Anstieg der CapG-Expression in IDC- gegenüber DCIS-Proben. **C+D)** Signifikanter Anstieg der GPNMB-Expression in IDC- gegenüber DCIS-Proben. **A-D)** Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen und der Übersicht halber wird auf die Standardabweichung verzichtet. ■ Mittelwert aller Proben (Herkunft und Gewinnung der DCIS- und IDC-Proben siehe Text). Für nähere Informationen siehe Text.

### 3.7 GPNMB-Expression in Abhängigkeit zur CapG-Expression im Zellkulturmodell

Ob diese Beobachtung der CapG-abhängigen GPNMB-Expression auch im Experiment nachzustellen sind, wurde anhand des Zellkulturmodells getestet. Zunächst wurde die mRNA-Menge von GPNMB bestimmt, hierbei wiesen die MDA-MB 231 Zellen erwar-

tungsgemäß eine hohe GPNMB-Expression auf, welche in den MDA-MB 231/siCapG stark abfiel ( $p \leq 0,05$ , Abb. 14 A). Die niedrigste GPNMB-Expression lag in den BT-20 Zellen vor, wobei nach CapG-Überexpression in den BT-20/CapG Zellen die Expression von GPNMB sich verdreifachte. In den Kontrollen (MDA-MB 231/scramble und BT-20 Leervektor) war keine Veränderung der GPNMB-Expression nachweisbar. Auf Protein-Ebene konnte ebenfalls eine Reduktion, zum Teil unter die Nachweisgrenze des Immunoblot-Verfahrens, von GPNMB gemessen werden (Abb. 14 B). Die Proteinmenge in Immunoblots ist semi-quantitativ mit Hilfe der optischen Dichte (Pixel-Dichte) über eine geeignete Software (hier ImageJ) messbar, damit wurde bei der Immunoblot-Auswertung eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Abnahme im GPNMB-Protein Level, durch den Knock-Down von CapG, nachgewiesen (MDA-MB 231/siCapG). Weiterhin waren bis zu 5 Tage nach CapG-Knock-Down Proteinsignale von GPNMB kaum bis gar nicht detektierbar (D5, Abb. 14 C). Dem gegenüber konnte nach CapG-Überexpression keine signifikante ( $p > 0,05$ ) Erhöhung der Proteinmenge von GPNMB gemessen werden (BT-20/CapG). Als Referenz wurde sowohl für die mRNA-Messungen als auch für die Protein-Quantifizierung das *housekeeping* Gen GAPDH als interner Standard verwendet.



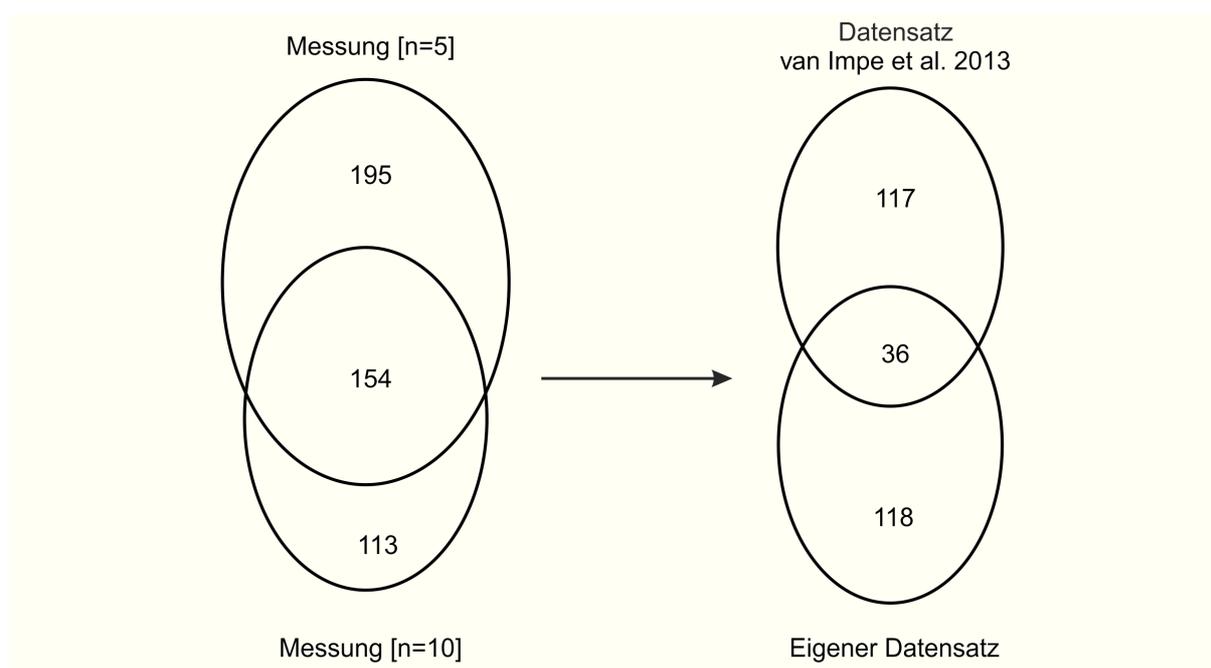
**Abb. 14: GPNMB-Expression im Zellkulturmodell.** A) GPNMB-Expression im Zellkulturmodell mit entsprechenden Kontrollen. MDA-MB 231 weisen hohe, MDA-MB 231/siCapG stark verminderte GPNMB-Expression auf. GPNMB-Expression in BT-20/CapG deutlich erhöht im Vergleich zu BT-20. B) GPNMB-Protein-Level war nach CapG-Knock-Down kaum bis gar nicht detektierbar, ebenso lag nach bis zu 5 Tagen (D5) keine messbare Proteinmenge vor. Die GPNMB-Proteinmenge nach CapG-Überexpression nahm geringfügig zu, allerdings statistisch nicht signifikant. Alle Experimente wurden 3-mal unabhängig voneinander wiederholt. Für nähere Informationen siehe Text.

### 3.8 Untersuchung des CapG-Interaktoms

Eine Untersuchung des CapG-Interaktoms<sup>10</sup> ermöglicht anhand der potentiellen Interaktionspartner die Funktion des CapG-Proteins sowohl im physiologischen als auch im tumorbiologischen Kontext zu begreifen. Dieser Ansatz wurde für CapG bisher nur einmal angewendet, wobei dies mit einer anderen Intention durchgeführt wurde[121].

Über zwei Messungen, mit insgesamt 15 Ansätze, wurden die Proteine im Eluate einer gegen CapG gerichteten Co-Immunopräzipitation per Massenspektrometrie gemessen. Die Ergebnisse aus diesen zwei Messungen (1. Messung, n=5, mit 5 Kontrollen sowie die 2. Messung, n=10, mit 10 Kontrollen) generierten eine Liste potentieller Interaktionspartner (Tabelle 10, im Anhang auf Seite 99).

In der ersten Messung konnten 349 und in der zweiten Messung 267 Proteine identifiziert werden und waren gegenüber den Kontrollen signifikant angereichert. Unter der Liste neuer potentieller Interaktionspartner sind auch bekannten Interaktionspartner: ACTC1 (Uniprot. Acc. Nr.: P68032)[102] und Bestandteile der Microtubuli[45]. Der Vergleich dieser beiden Messungen mit nun insgesamt 15 Ansätzen lieferte 154 potentielle Interaktionspartner (Abb. 15 und im Anhang Tabelle 10 auf Seite 99).



**Abb. 15: Venn Diagramm der Anzahl potentieller CapG-Interaktionspartner. Linke Seite)** Schnittmenge der beiden Messungen ergibt mit 154 potentielle Interaktionspartner den "Eigener Datensatz". **Rechte Seite)** Der Vergleich dieser 154 potentiellen Interaktionspartner mit dem Datensatz der CapG-Interaktom Studie[121] von van Impe et al. ergab 36 potentielle Interaktions-Kandidaten (Tabelle 6).

Der Ansatz zum Nachweis von Interaktionspartner wurden in einem anderen Zusammenhang von van Impe et al.[121] mit Hilfe von Nanobodies in MDA-MB 231 Zellen durchgeführt. Bei diesem Datensatz zur CapG-Interaktom Untersuchung, wurden 153 potenti-

<sup>10</sup>Das Wort Interaktom (*interactome*) wurde von omics entlehnt und reiht sich ein, in Begriffe wie Genom/ Genomik oder Transkriptom/ Transkriptomik. Die erste Nennung des Wortes ist nicht bekannt.

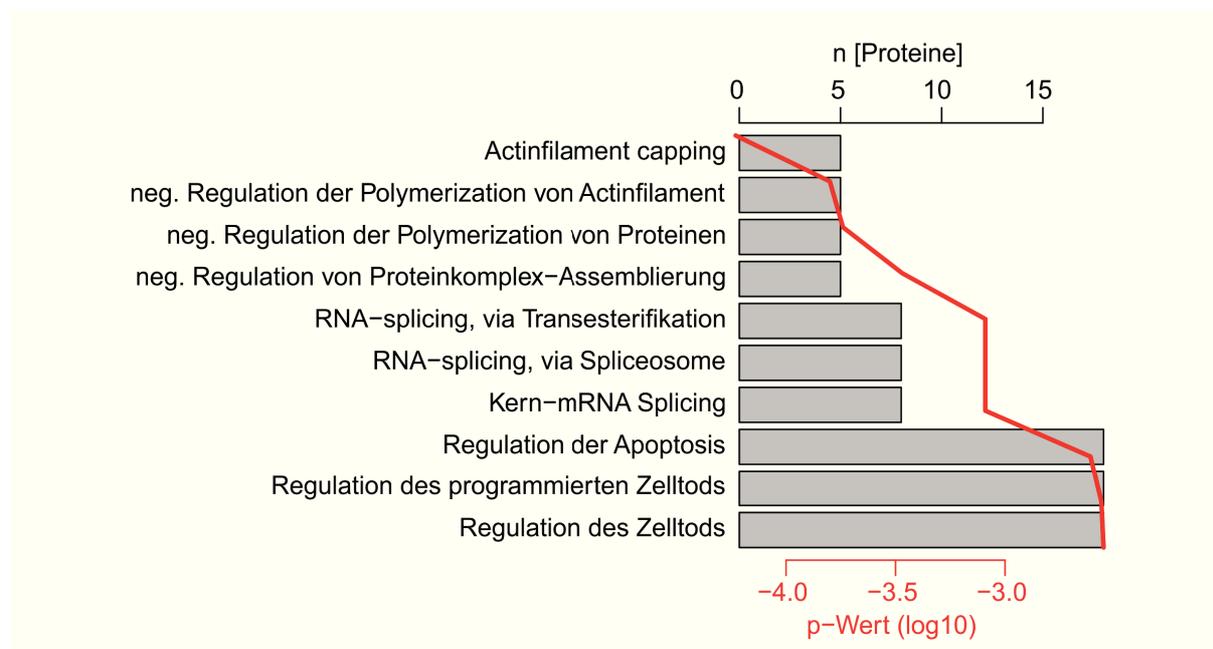
elle Kandidaten detektiert. Um nun die potentiellen Interaktionspartner näher einzugrenzen, wurden die 154 identifizierten Kandidaten mit dem CapG-Interaktom-Datensatz[121] von van Impe et al. verglichen (Abb. 15, rechts). Das Resultat waren 36 Kandidaten (Tabelle 6):

**Tabelle 6:** Hervorgehobene CapG-Interaktionspartner

Nr.	Genname	Uniprot-Acc.	Beschreibung
0	CapG	P40121	Macrophage-capping protein
1	RPS3	P23396	40S ribosomal protein S3
2	GNB2L1	P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
3	TUBB	P07437	Tubulin beta chain
4	TUBB4B	P68371	Tubulin beta-4B chain
5	RPL22	P35268	60S ribosomal protein L22
6	RPL12	P30050	60S ribosomal protein L12
7	ILF2	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2
8	HIST1H4A	P62805	Histone H4
9	PTBP1	P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1
10	RPL11	P62913	60S ribosomal protein L11
11	DDX5	P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
12	RPS5	P46782	40S ribosomal protein S5
13	DDX3X	O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
14	RPS7	P62081	40S ribosomal protein S7
15	RPS16	P62249	40S ribosomal protein S16
16	EIF2S2	P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2
17	NCL	P19338	Nucleolin
18	RPS11	P62280	40S ribosomal protein S11
19	RBM14	Q96PK6	RNA-binding protein 14
20	HNRNPA2B1	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
21	HNRNPU	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
22	RPS9	P46781	40S ribosomal protein S9
23	PPP1R12A	O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A
24	RPS2	P15880	40S ribosomal protein S2
25	RPL6	Q02878	60S ribosomal protein L6
26	HNRNPH3	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
27	HSP90AA1	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha
28	RPL18	Q07020	60S ribosomal protein L18
29	HIST1H1C	P16403	Histone H1.2
30	NPM1	P06748	Nucleophosmin
31	RPL13	P26373	60S ribosomal protein L13
32	FXR1	P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
33	RPS8	P62241	40S ribosomal protein S8
34	HNRNPM	P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
35	IMPDH2	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
36	TRIM21	P19474	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21

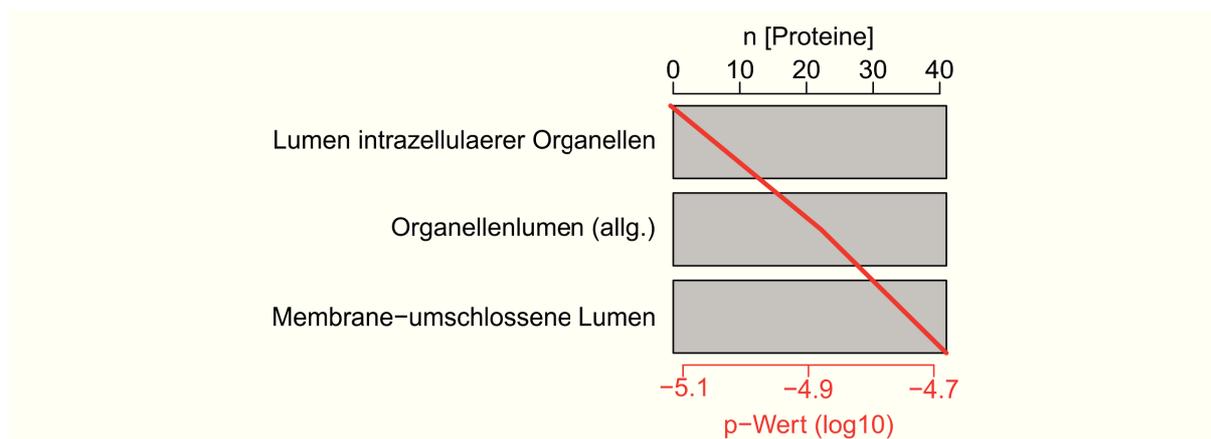
Die potentiellen Interaktionspartner wurde mittels *Gene Ontology* anhand deren entsprechenden GO-Termini (Annotationen) zugeordnet. Dadurch ist es möglich festzustellen, in welchem/r biologischen Prozess, zellulären Komponente oder molekularen Funktion CapG durch dessen potentielle Interaktionspartner involviert ist. Dies zeigte, dass CapG

im Funktionskontext der 153 potentiellen Interaktionspartner aus den direkten Messungen (zunächst nicht im Vergleich zum Datensatz von van Impe et al.[121]) signifikant ( $\log_{10}$  p-Wert von maximal 3,75; rote Linie bzw. Achse) an der Actin-Regulation, wie zum Beispiel dem Actinfilament-capping, der Actinfilament-Polymerisation oder Proteinkomplex-Assemblierung beteiligt ist (Abb. 16). Weiterhin konnte CapG in die biologischen Funktionen des RNA-splicings (z.B. RNA-splicing, via Transesterifikation oder via Spliceosome) und in der Regulation der Apoptose kategorisiert werden.



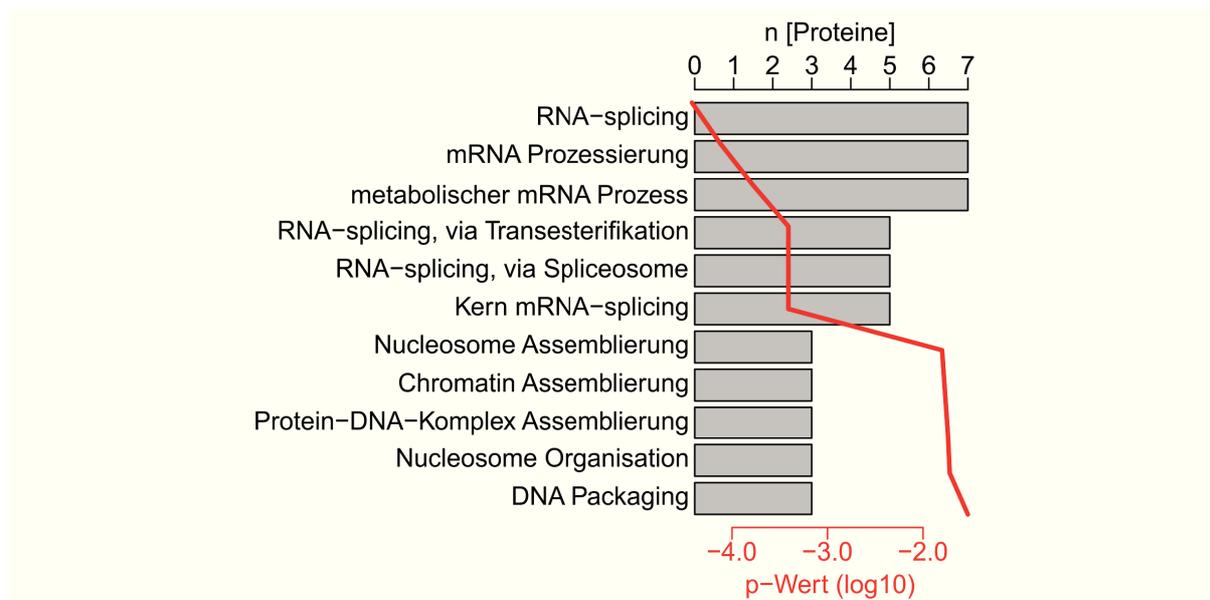
**Abb. 16: CapG-Interaktionspartner im Kontext der biologischen Funktion** CapG wurde im Funktionskontext (*biological function*) der 153 potentiellen Interaktionspartner signifikant ( $\log_{10}$  p-Wert von maximal -2,5; rote Linie bzw. Achse) mit Actin-Regulation, RNA-splicings und Regulation der Apoptose in Zusammenhang gebracht.

Zudem konnten die lokale Beteiligung an Prozessen von CapG über die Interaktionspartner klassifiziert werden. Demnach agiert CapG in Membran-umschlossenen Lumen und Lumen von Organellen (Abb. 17).

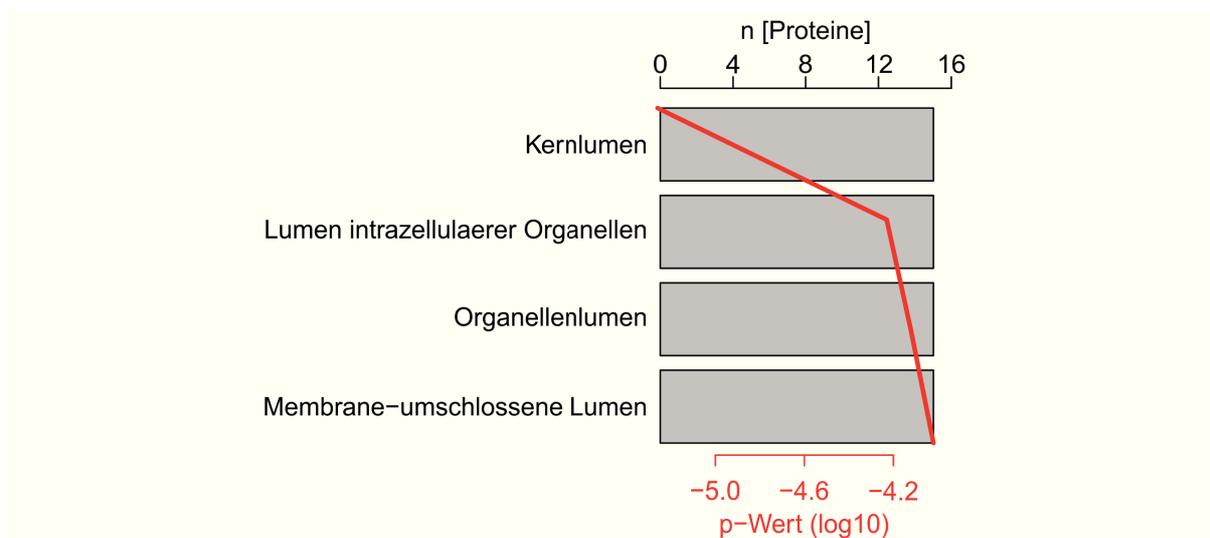


**Abb. 17: CapG-Interaktionspartner im Kontext der zellulären Komponente.** Die lokale (*cellular compartment*) Beteiligung an Prozessen konnte über die 153 potentiellen Interaktionspartner und deren GO-Annotation für CapG signifikant ( $\log_{10}$  p-Wert von maximal -4,65; rote Linie bzw. Achse) mit Organell-Lumen oder Membran-umschlossenen Lumen in Verbindung gebracht werden.

Der direkte Vergleich mit einem weiteren Datensatz[121], welcher mittels einer vollständig anderen Methodik generiert und der Literatur entnommen ist, erlaubt die kritische Prüfung der erzeugten Daten. Weiterhin können hiermit die erzeugten Daten in ihrer Aussage gestärkt werden. Die 36 Kandidatenproteine aus der Überschneidung der Datensätze (“Eigener Datensatz” und “van Impe et al. 2013”) wurden ebenfalls mittels *Gene Ontology* analysiert. Hinsichtlich der biologischen Funktion wiesen die Interaktionen zwischen CapG und Proteinpartnern deutlich auf eine Beteiligung an der Transkription (Abb. 18) sowie Assemblierung von Kernstrukturen und DNA-Interaktionen hin (maximaler  $\log_{10}$  p-Wert von -2,5). Die Lokalisation von CapG liegt in diesem Zusammenhang mit einem starken Fokus auf Lumen von Kern und Organellen (maximaler  $\log_{10}$  p-Wert von -4,0; Abb. 19).



**Abb. 18: GO-Analysen zur CapG-Funktion verglichen zu bekannten Interaktionspartnern.** Die GO-Analysen im Kontext der biologischen Funktion konnten die CapG-Funktion mit Hilfe des van Impe-Datensatzes[121] bestätigen. Somit liegt eine deutliche Funktionsweise in der Transkription sowie Assemblierung von Kernstrukturen und DNA-Interaktionen vor ((maximaler log10 p-Wert von -4,0; rote Achse).



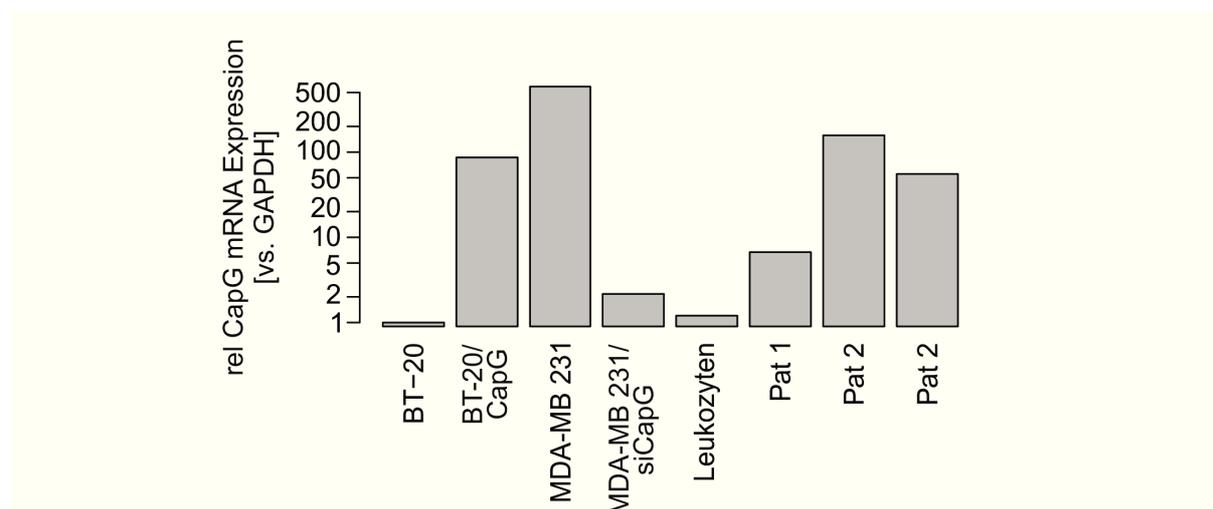
**Abb. 19: GO-Analysen der CapG-Interaktionspartner im Kontext der zellulären Komponente.** Die GO-Analysen und damit die lokale (*cellular compartment*) Beteiligung an Prozessen von CapG, konnte ebenfalls mit Hilfe des van Impe-Datensatzes[121] bestätigt werden. Es lag eine deutliche zelluläre Lokalisation im Kernlumen und Lumen von Organellen sowie Membran-umschlossene Lumen vor (maximaler log10 p-Wert von maximal -4,0; rote Achse).

### 3.9 CapG in zirkulierenden Tumorzellen (CTC)

Die Untersuchung von CapG auf zirkulierenden Tumorzellen ist aufgrund der Bedeutung von CapG bei der Invasion des Primärtumors nicht abwegig. Denn die Fernmetastasierung steht im Zusammenhang mit der Zirkulation von Tumorzellen. Die Progression vom

primären Tumor zur Fernmetastase inkludiert mehrere Schritte (siehe Abb. 3 auf Seite 9). Ein essentieller Schritt ist die Intravasation der invasiven Tumorzellen in die Blutbahn, dann Zirkulation und schließlich Extravasation in distales Gewebe. Für die erfolgreiche Migration bzw. Invasion wird demnach eine schnelle und flexible Re-Strukturierung des Cytoskeletts und gleichzeitig ein rigides und beständiges Cytoskelett, als Resistenz gegenüber Scherkräften, gefordert. In diesem Kontext und in Anbetracht der deutlichen Präsenz von CapG in invasiven Primärtumoren, ist dieses Actin-modulierende Protein für die Untersuchung auf CTCs interessant.

Ein deutlicher Hinweis wurde über das CTC-Nachweisverfahren AdnaTest geliefert. Hierbei konnte, nach Anreicherung von CTCs per AdnaTest (immunomagnetische Anreicherung von CTCs) in CTC positiven, unabhängigen Patientenproben (n= 3), die CapG-Expression über qRT-PCR ermittelt werden und lieferte ein Ergebnisse deutlich über der Leukozyten-Kontrolle (Abb. 20). Zusätzlich wurde zum Vergleich das Expressionslevel von CapG in BT-20 bzw. BT-20/CapG sowie MDA-MB 231 bzw. MDA-MB 231/siCapG gemessen. Die Expression wurde in Relation zu der CapG mRNA-Menge in BT-20 gesetzt (=1,00). Es ist erkennbar, dass die CapG-Expression in Leukozyten und die Expression in BT-20 und den MDA-MB 231/siCapG ähnlich ist. Das Ergebnis liefert den eindeutigen Hinweis einer höheren Expression von CapG auf CTCs im Vergleich zu Leukozyten. Um weitere immunologische oder genomische Analysen auf Einzelzellebene durchzuführen, musste zunächst eine geeignete Technologie und Methodik zur Identifikation und Isolation von CTCs etabliert werden.



**Abb. 20: CapG mRNA Nachweis in zirkulierenden Tumorzellen.** Aus 3 Patientenblutproben erfolgte die Anreicherung von CTCs mittels AdnaTest-Verfahren. Die daraus folgende cDNA wurde per qRT-PCR gemessen. Die CapG-Expression in den hoch invasiven Zelllinien BT-20/CapG und MDA-MB 231 sowie in den Patientenproben (Pat 1-3) ist deutlich über dem CapG-mRNA Level der Leukozytenprobe. Die Expression aller Proben wurde in Bezug zu der CapG-Expression der BT-20 gesetzt.

### 3.9.1 Technologie-Etablierung zur Isolation von CTCs

Als Technologie bot sich die automatische Mikromanipulation mittels CellCelector an. In Kombination mit dem CellSearch-System können EpCAM<sup>pos</sup> Tumorzellen zunächst angereichert und anschließend isoliert werden. Die Etablierung der CellSearch-CellCelector-Methode und das damit erarbeitete Ergebnis-Repertoire<sup>11</sup> ist in Zusammenarbeit mit Yvonne Decker<sup>12</sup> erfolgt.

Für die Etablierung wurden zunächst Testreihen durchgeführt, welche die Leistung des Gerätes zur Detektion einzelner Zellen innerhalb einer Probe determiniert. Geprüft wurde demnach die Leistung des Scans, wobei u.a. die Leistung der Mikroskopie-Einheit, Fluoreszenz-Quelle, Software (Scan-Einstellungen sowie Analysestrategie) getestet wurden. Anschließend wurde die Isolation per Mikromanipulation an den per Scan detektierten Zellen getestet. In Abb. 21 und 23 sind die Ergebnisse der Etablierungsversuche mit Sk-Br-3 Zellen dargestellt. Als Referenz zur Quantifizierung und der Bildgebung, wurde die Mikroskopie-Einheit des CellSearch Systems, der CellTracks-Analyzer, verwendet.

### 3.9.2 Optimierung der Isolationsparameter

Zunächst erfolgte die Optimierung der Isolationsparameter "Aspirationsvolumen"<sup>13</sup> und "Aspirationshöhe"<sup>14</sup>. Hierfür wurden unterschiedliche Volumina zur Aspiration getestet (10, 20, 50, 100 und 200 nl) und die Erfolgchance, eine einzelne Zelle zu isolieren, dokumentiert (Abb. 21 A). Zusätzlich wurde das Risiko weitere DAPI-positive Partikel aufzunehmen notiert. Aus dem Vergleich der Ergebnisse dieser Messreihe ergab sich zur Isolation einer einzelnen Zelle ein optimales Aspirationsvolumen von 50 nl mit einer 95%igen Erfolgsquote sowie eine maximale 9% Wahrscheinlichkeit unerwünschte DAPI-positive Partikel aufzunehmen. Die Zelldichte war bei allen Versuchen vergleichbar und betrug im Durchschnitt 28 Zellen/ 80 mm<sup>2</sup>.

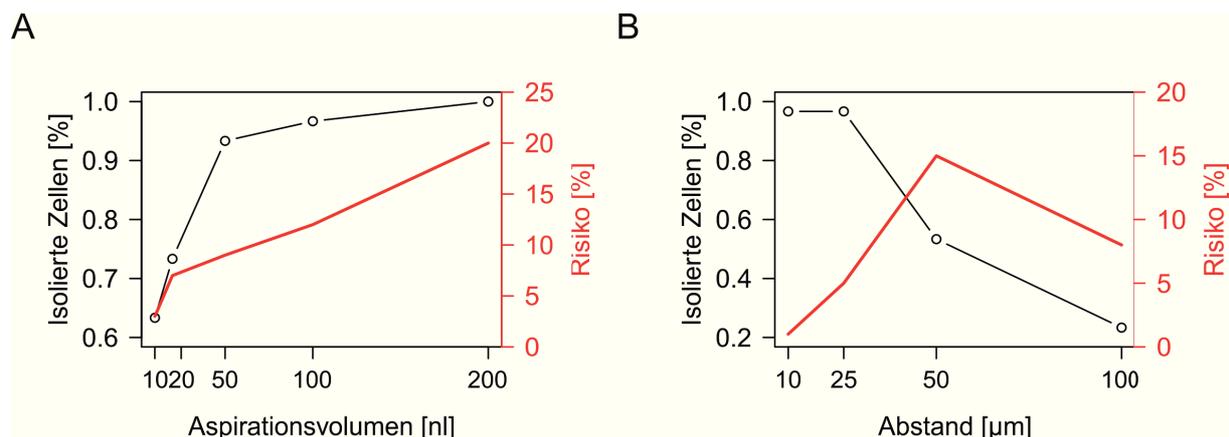
Zur Bestimmung des optimalen Abstandes zum Objektträgerboden (Abb. 21 B), erfolgte eine Testreihe (10, 25, 50, 100  $\mu$ ) mit unterschiedlichen Abständen zwischen Kapillarspitze und Objektträger. Der optimale Abstand lag bei 25  $\mu$ m. Hier konnte eine 98% Erfolgsquote zur Isolation einer einzelnen Zelle, bei maximal 5% Wahrscheinlichkeit unerwünschte DAPI-positive Partikel aufzunehmen, gemessen werden. Final lagen die optimal determinierten Parameter zur Isolation von einzelnen CTCs bei einem Aspirationsvolumen von 50 nl und einem Abstand von 25  $\mu$ m.

<sup>11</sup>Dies sind folgende Ergebnisse: Abbildungen 21, 22, 23, 24, 27

<sup>12</sup>medizinische Doktorandin, AG Prof. Dr. Hans Neubauer, Forschungslabore der Frauenklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

<sup>13</sup>Aspirationsvolumen ist das Volumen, welches zum Aspirieren der Zelle verwendet wird.

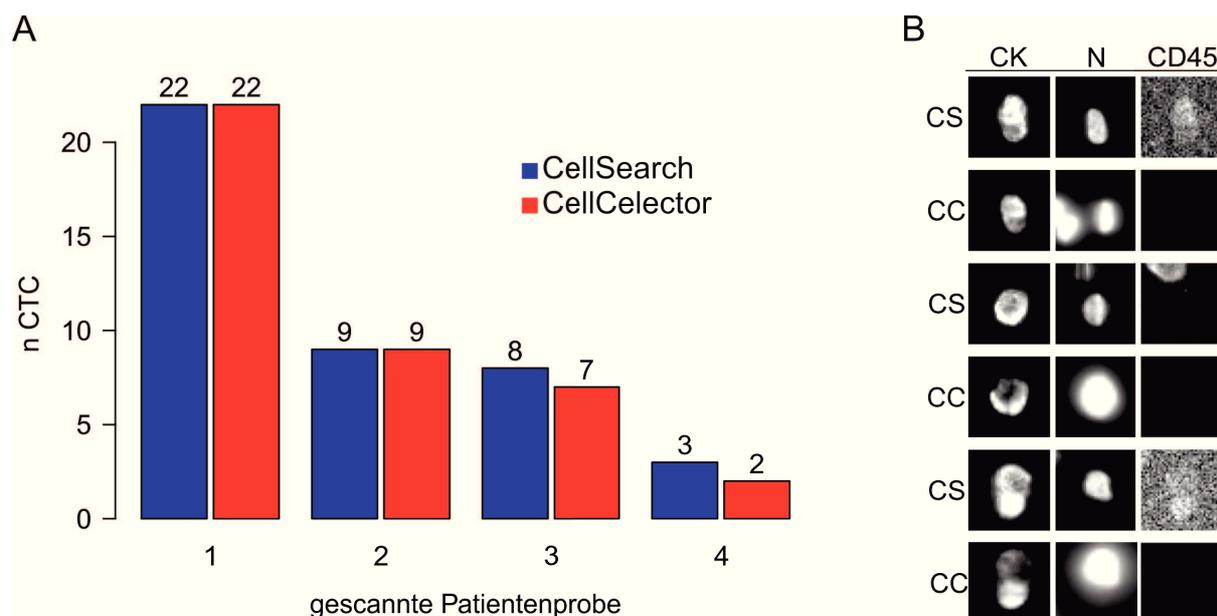
<sup>14</sup>Aspirationshöhe ist der Abstand zur Oberfläche, welche zum Aspirieren der Zelle verwendet wird.



**Abb. 21: Optimierung der Isolationsparameter - Aspirationsvolumen und -höhe.** **A)** Zur Bestimmung des optimalen Isolationsparameters “Aspirationsvolumen”, wurde eine Messreihe durchgeführt und die Wahrscheinlichkeiten von Erfolg (schwarz) und Risiko (rot) gemessen. Ein Volumen von 50 nl war das Optimum. **B)** Zur Bestimmung des optimalen Isolationsparameters “Aspirationshöhe”, wurde eine Messreihe durchgeführt und die Wahrscheinlichkeiten von Erfolg (schwarz) und Risiko (rot) gemessen. Das Risiko wurde bei einer durchschnittlichen Zelldichte von 28 Zellen/ 80 mm<sup>2</sup> berechnet. Ein Abstand von 25 µm war das Optimum.

### 3.9.3 Etablierung des Mikromanipulations-Systems CellCelector

Zur Etablierung des Systems wurde zunächst die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Bildgebung vom CellCelector getestet. Hierzu wurden Kartuschen des CellSearch-Systems zuerst vom CellSearch-System und anschließend vom CellCelector gescannt. Die Bildgebung von Patientenproben zwischen CellSearch und CellCelector ergab ein gut vergleichbares Bild: wie in Abbildung 22 A ersichtlich ist, wurden in 95% die vom CellSearch als CTCs klassifizierten Events vom CellCelector identifiziert. Weiterhin sind die CTCs in beiden Scans bezüglich Morphologie und Signalintensität vergleichbar (Abb. 22 B).



**Abb. 22: Prüfung der Bildgebung des CellCelectors. A+B)** Die Bildgebung konnte in Bezug auf die Aufnahmen der Einzelzellen (CTCs) und deren Signalintensität sowie Morphologie zwischen CellSearch und CellCelector als vergleichbar betrachtet werden. Beim Scannen der Proben vom CellCelector (d.h. Scan der Kartusche), wurden 95% der Zellen wieder gefunden.

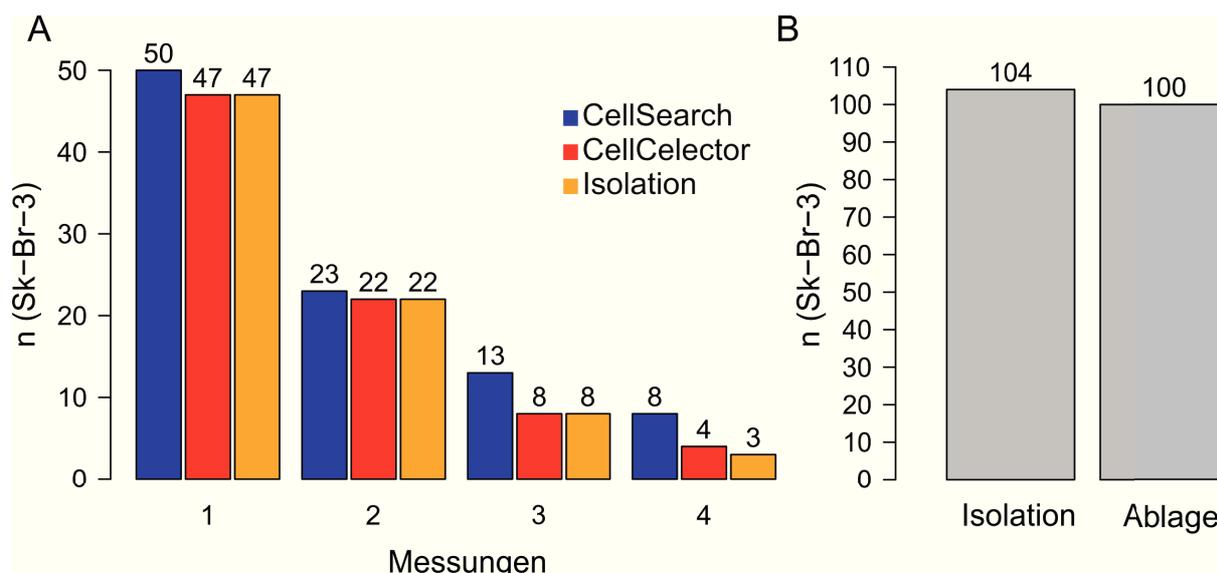
Zur weiteren Etablierung des Systems wurde auf die Leistungsfähigkeit getestet (Abb. 23): es konnte, relativ zum CellSearch und nach Transfer auf einen Glasobjektträger, insgesamt für alle Messungen eine Wiederfindungsrate der Sk-Br-3 Kontrollzellen von mind. 75% berechnet werden. Ein Pipettierverlust von bis zu 50% wurde bei kleinen Zellzahlen festgestellt.

Von den identifizierten Sk-Br-3 Zellen konnten 98% erfolgreich per Aspiration isoliert werden. Die Daten zur Berechnung der Wiederfindungsrate werden in Tabelle 7 und in Abbildung 23 A zusammengefasst.

**Tabelle 7: CellCelector-Etablierung**

n Detektionen [CellSearch]	n Detektionen [CellCelector]	[%]
50	47	94
23	22	95
13	8	61
8	4	50

Das Isolations-/ Ablage-Verhältnis lag bei 96% (Abb. 23 B). Das bedeutet, dass nach einer erfolgreichen Isolation der Sk-Br-3 Kontrollzellen in 96% auch eine erfolgreiche Ablage (Deposition) stattfand.



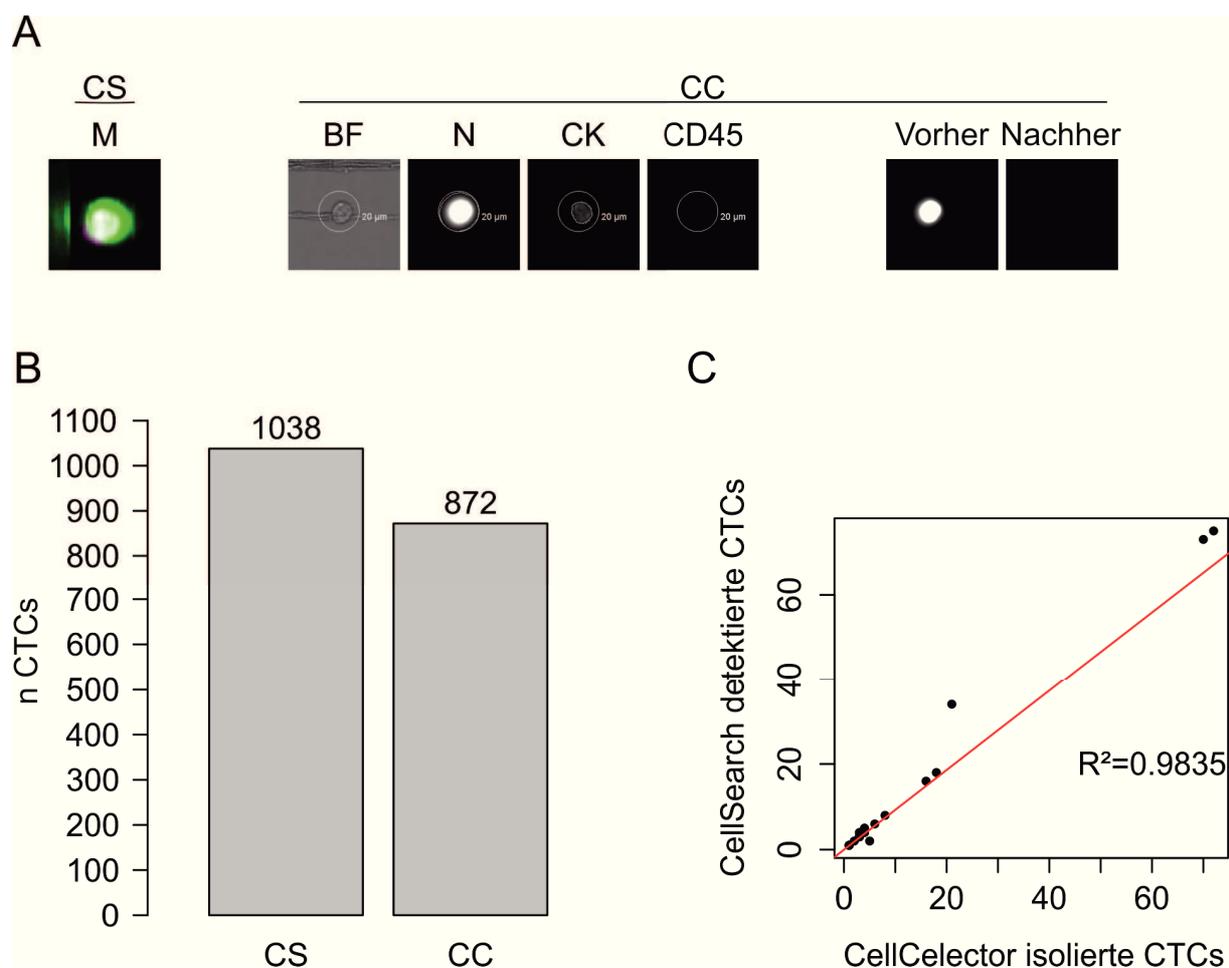
**Abb. 23: Prüfung der Leistungsfähigkeit des CellCelectors.** **A).** Sk-Br-3 Zellen wurden vom CellSearch gescannt und quantifiziert (blau), anschließend konnte insgesamt für alle Messungen eine Wiederfindungsrate (mittels CellCelector, rot) der Sk-Br-3 Kontrollzellen von mind. 75% berechnet werden, wobei ein Pipettierverlust von bis zu 50% bei kleinen Zellzahlen festgestellt wurde. In 98% konnten die Sk-Br-3 erfolgreich isoliert werden (Messungen: n=4). **B)** Das Verhältnis von erfolgreicher Isolation zur erfolgreichen Ablage lag bei 1,04 (96%).

Es konnte nun nach Etablierung und Prüfung des CellCelector-Systems die Isolation potentieller CTCs erfolgen (Abb. 24). Vor der Isolation wurden Bildaufnahmen in allen relevanten (Fluoreszenz)-Kanälen, d.h. Durchlicht (BF), DAPI (Nucleus= N), TRITC (Cytokeratin=CK) sowie Cy5 (CD45) durchgeführt. Dies ist in Abbildung 24 A zusammen mit dem entsprechenden *merged image* (M, Überlagerung der Fluoreszenzkanäle) des CellSearch-Systems (CS) repräsentativ für alle Mikromanipulationen dargestellt. Zusätzlich ist der Isolationsvorgang bildlich anhand der "Vorher/ Nachher"-Aufnahme im DAPI-Kanal dokumentiert (Abb. 24 A, ganz rechts).

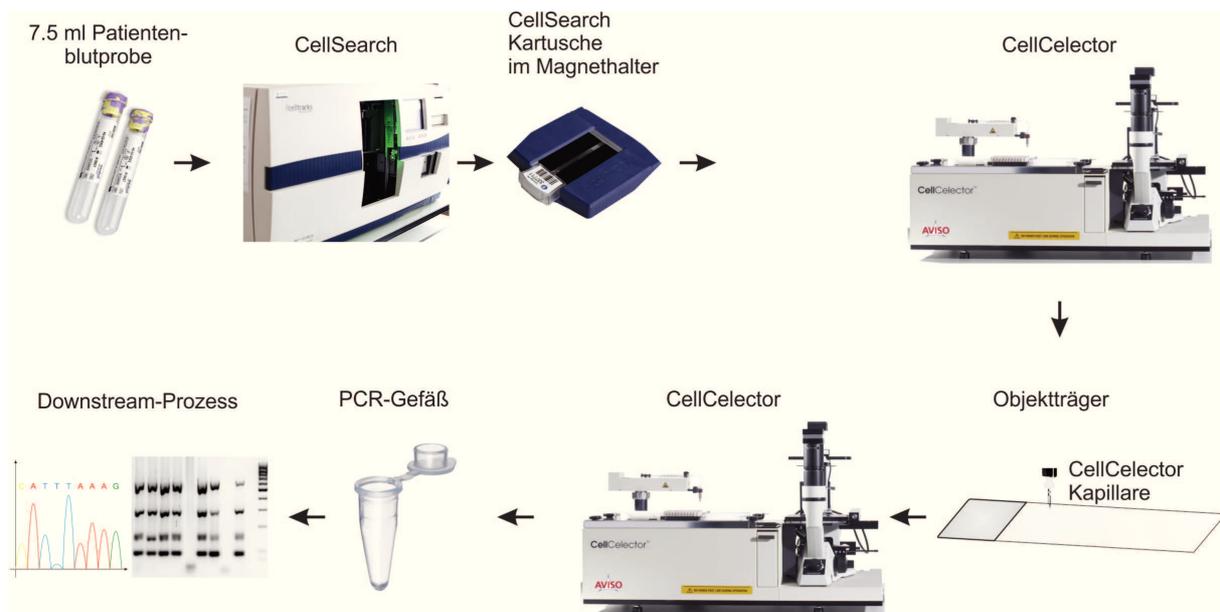
Insgesamt wurden 32 Patientenproben prozessiert, wobei von 1038 vom CellSearch detektierten und klassifizierten CTCs 874 vom CellCelector erfolgreich isoliert und abgelegt (Abb. 24 B) werden konnten (entspricht 84%). Der Verlust ist durch einen Pipettierverlust von max. 16% bestimmt. Zudem wurde anhand von 20 Patientenproben (metastasiertes Mammakarzinom) eine Regressionsanalyse<sup>15</sup> durchgeführt ( $R^2=0,98$ ) und ergab, dass die Detektion und Isolation von CTCs mittels CellCelector mit diesem  $R^2$ -Wert sehr hoch lag.

Mit der erfolgreichen Etablierung und Optimierung der Mikromanipulation mittels CellCelector, konnte insgesamt ein Arbeitsablauf etabliert werden, der die Isolation von Einzelzellen (CTCs) und deren weitere molekulare Analyse ("Downstream-Analysen") ermöglicht. Der Arbeitsablauf wird unter Abbildung 25 erläutert.

<sup>15</sup>Ein  $R^2=1,00$  gilt als optimal.



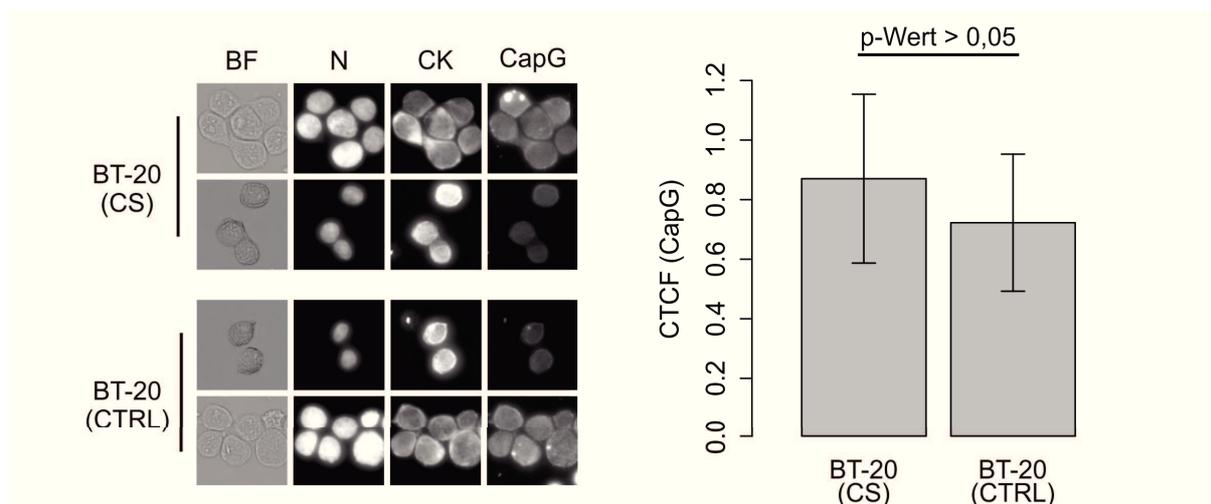
**Abb. 24: Post-CellSearch Isolation von CTCs mittels CellCelector-System.** **A)** Repräsentative Aufnahmen verdeutlichen die Bilddokumentation vor dem Isolationsprozess. Zusätzlich ist das *merged image* (Überlagerung der Fluoreszenzkanäle, M) aus dem CellSearch-Lauf (CS) abgebildet. Rechts ist der Isolationsvorgang anhand von “Vor der Isolation” und “Nach der Isolation (Vorher/ Nachher, in DAPI) dokumentiert. BF= Durchlicht, N= DAPI (Nucleus), CK= Cytokeratin (TRITC), CD45= Leukozytenmarker. CS= CellSearch, CC= CellCelector. **B)** Es wurden von 32 Patientenproben insgesamt 874 (von 1038, entspricht 84%) zirkulierende Tumorzellen (CTCs) isoliert, wobei ein Pipettierverlust von max. 16% bestimmt werden konnte. **C)** Regressionsanalyse anhand von Patientenproben (n=20) ergab einen  $R^2$ -Wert von 0,98 und belegt somit eine hohe Detektions- und Isolationsrate.



**Abb. 25: Arbeitsablauf der Probenprozessierung.** Das entnommene Blut wurde direkt in CellSave-Präservationsröhrchen überführt, wodurch das biologische Material fixiert und haltbar gemacht wurde. Innerhalb von 96 h wurde die Probe mittels CellSearch CTC-Kit aufgearbeitet und schließlich die potentiellen EpCAM<sup>pos</sup> CTCs in Kartuschen transferiert. In diesen Kartuschen lag ebenfalls eine Menge unspezifisch gebundener Weißer Blutkörperchen vor (CD45<sup>pos</sup>-Zellen). Anschließend wurde die Probe auf Glasobjektträger pipettiert, welche zuvor auf einem speziell entwickelten Magnetadapter platziert waren. Die magnetische Feldstärke entspricht jener in den Magnethaltern des CellSearch-Systems. Dadurch wurde die Probe relativ immobilisiert und vom CellCelector-Mikroskop gescannt und die Partikel-Liste nach bestimmten Kriterien gefiltert (DAPI<sup>+</sup>/CK<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, Nucleus 5-40 $\mu$ m, Zellmorphologie). Die potentiellen CTCs wurden isoliert und auf Haftobjektträger abgelegt, getrocknet und mit Anti-CapG (Detektion im Cy5-Kanal mittels Anti-Hase-Cy5) markiert. Hiernach wurden die Zellen erneut mittels CellCelector isoliert (durch Abschaben) und in PCR-Reaktionsgefäße abgelegt. Nachfolgend einer *Whole Genome Amplification* (WGA) und entsprechender Qualitätskontrolle wurden die Proben sequenziert.

### 3.9.4 CapG-Expression in zirkulierenden Tumorzellen

Bevor zur Determinierung der CapG-Expression in CTCs eine (semi)-quantifizierbare Aussage von Immunofluoreszenzaufnahmen durchgeführt werden konnte, musste zunächst eine Validierung erfolgen. Diese musste sicherstellen, dass durch den CellSearch-Prozess angereicherte CTCs keine falsch-positiven Fluoreszenzsignale in Kombination mit der CapG-Färbung auftraten. Dazu wurden BT-20 Zellen durch das CellSearch-System (CS) prozessiert und anschließend CapG Immunfluoreszenz-markiert. Parallel dazu wurden in BT-20 ohne CellSearch-Prozess (CTRL) das CapG-Protein Immunfluoreszenz-markiert (Abb. 26). Die Auswertung der CTCF-Werte der CapG Fluoreszenzintensitäten (der beiden BT-20 Populationen) führte zu keinem signifikanten Unterschied und damit zur Aussage, dass nachfolgende CapG Immunfluoreszenz-Färbung durch die Bedingungen der vorhergehenden CellSearch Analyse nicht beeinträchtigt werden



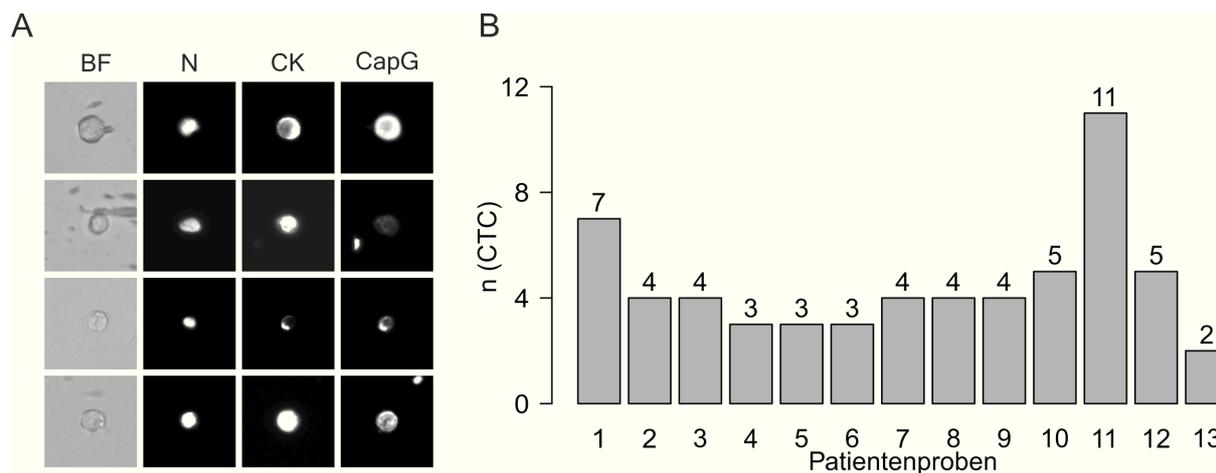
**Abb. 26: CellSearch-Prozess weist keinen Einfluss auf Downstream geführte Immunfluoreszenzfärbung auf. A)** Repräsentativ-Aufnahmen von BT-20 Zellen nach CellSearch- (CS) und ohne CellSearch-Prozessierung (CTRL). Als Cytospins auf Haftobjektträger und aufgenommen mit CKX 41, Olympus. BF= Durchlicht, N= Nucleus (DAPI), CK= Cytokeratin (TRITC) und CapG (Cy5). **B)** Gegenüberstellung der berechneten CTCF-Werte der jeweiligen Versuche ergab, dass kein signifikanter Unterschied ( $p\text{-Wert} \geq 0,05$ ) bezüglich der Immunfluoreszenzfärbung vorlag.

### 3.10 CapG Expressionsanalyse von CTCs von Mammakarzinom Patientinnen

Zur CapG Detektion von CTCs erfolgte zuerst die Isolation nach den Kriterien:  $\text{DAPI}^{\text{pos}} / \text{CK}^{\text{pos}} / \text{CD45}^{\text{neg}}$ -Zellen (potentielle  $\text{EpCAM}^{\text{pos}}$ -CTCs nach CellSearch) und deren Ablage auf Haftobjektträger. Zunächst wurden die CTCs auf Haftobjektträgern<sup>16</sup> abgelegt und für CapG gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

Anschließend wurden die CapG-positiven CTCs quantifiziert. In Abbildung 27 A sind repräsentativ  $\text{CapG}^{\text{pos}}$ -CTCs gezeigt, welche mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden. Durchlicht (BF), Zellkernfärbung (N, DAPI), Cytokeratin (CK, TRITC) und CapG (CapG, Cy5) sind dargestellt. Es wird auf die unterschiedlichen CapG-Fluoreszenzintensitäten hingedeutet. Insgesamt konnten 59 CTCs aus 13 Patientenproben hinsichtlich der CapG-Färbung analysiert werden (Abb. 27 B).

<sup>16</sup>aus der Histologie, spezielle elektrostatische Glasobjektträger mit stärkerer Affinität für Biomaterialien



**Abb. 27: CapG-Expression in CTCs - Quantifizierung der Immunfluoreszenzaufnahmen.** **A)** Repräsentativ-Aufnahmen von auf Haftobjektträger abgelegten CTCs. Aufgenommen mit CKX 41, Olympus. BF= Durchlicht, N= Nucleus (DAPI), CK= Cytokeratin (TRITC) und CapG (Cy5). **B)** Von 13 Patientenproben wurden 59 CTCs isoliert und mit CapG gefärbt.

Über die Immunfluoreszenz ist die Proteinmenge (semi-)quantifizierbar. Zur Auswertung der Fluoreszenzintensitäten und Definition der relativen Proteinmenge wurde der CTCF-Wert herangezogen (siehe 2.9.1). Der CTCF-Wert ist prinzipiell ein korrigierter Fluoreszenzintensitäts-Wert.

Die CTCF-Werte der CapG-Färbung in CTCs variierten zwischen den Patientenproben deutlich (Abb. 28). Als Vergleich wurden die CTCF-Werte von Leukozyten (WBC, *white blood cells*) und den Tumorzelllinien BT-20 und MDA-MB 231 ebenfalls aufgetragen. Eine Übersicht über Median sowie Durchschnitt der CTCF-Werte sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8: CapG-Expression in CTCs, WBCs und Zelllinien [CTCF-Werte]**

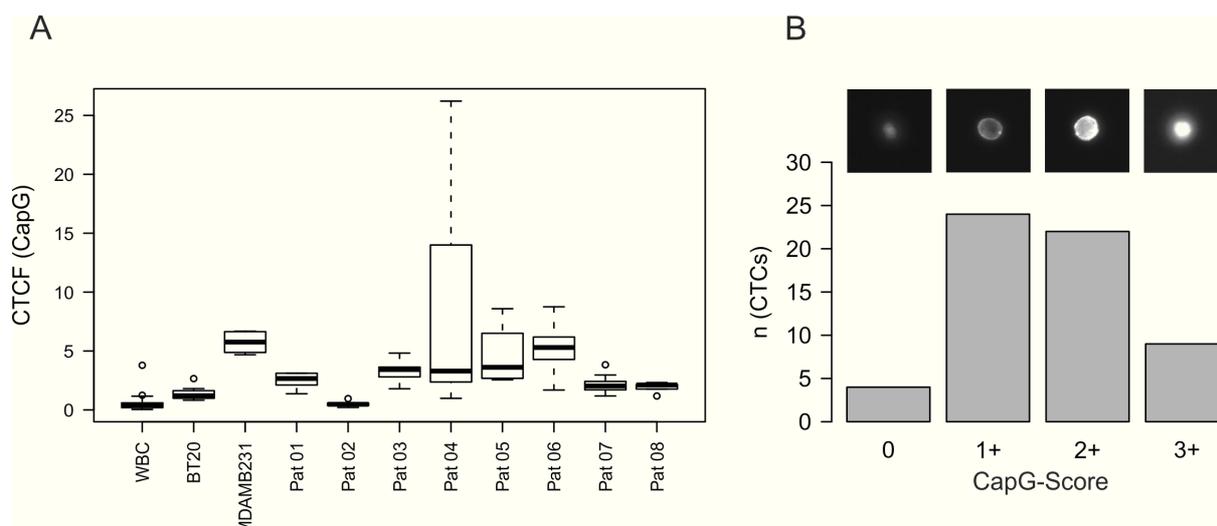
		CTCs	WBCs	BT-20	MDA
Median	=	2,52	0,40	1,20	5,75
Durchschnitt	=	3,63	0,50	1,39	5,73
25%-Quantil	=	1,73	0,19	1,03	5,06
50%-Quantil	=	2,51	0,40	1,20	5,75
75%-Quantil	=	3,74	0,59	1,62	6,45
Min.-Wert	=	0,21	0,04	0,82	4,68
Max.-Wert	=	26,21	3,78	2,65	6,68

MDA=MDA-MB 231

Abbildung 28 A gibt die Verteilung der CTCF-Werte aller einzelnen CTCs über alle Patientinnen, WBCs und den Brustkrebszelllinien BT-20 sowie MDA-MB 231 wieder. Die CapG-gefärbten CTCs der Patientenproben wiesen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten auf. Beispielsweise lag der Median der CTCF-Werte der CTCs innerhalb der Patientenprobe "Pat 04" bei 3,29 und es konnte ein maximaler CTCF-Wert von 26,21

gemessen werden (Abb. 28 A). Die Patientenprobe "Pat 02" war mit einem CTCF-Medianwert von 0,50 nur wenig höher als die WBC-Probe (Median von 0,40). Das Proteinniveau von CapG in WBCs wurde als Null-Niveau eingestuft, somit als Normal-Größe und Ausgangspunkt zur Berechnung eines Scores (Abb. 28 B). Um die CapG-Menge in CTCs zu klassifizieren wurde ein Scoring-System berechnet. Das Scoring basiert auf der Quantil-Einteilung des durchschnittlichen CTCF-Wertes jeder Probe. WBCs, BT-20 Zellen und MDA-MB 231 Zellen dienten als Referenzen für das Scoring, der CTCF-Wert der WBC-Probe als Normalwert, der der BT-20 Zellen als moderater Wert (auf Grund geringer bis moderater CapG-Expression) und der CTCF-Wert der MDA-MB 231 Zellen als hoher Wert (wegen einer hohen CapG-Expression).

Abbildung 28 B gibt das Scoring für CapG in CTCs wieder. Das CapG-Scoring über alle CTCs hinweg lässt annähernd eine Normalverteilung erkennen. In einen CapG-Score von 0 wurden 4 CTCs klassifiziert, während 24 CTCs die CapG-Fluoreszenzintensität von einem Score von 1+ aufwiesen. Einem Score von 2+ wurden 22 Zellen zugeordnet und 9 wiesen eine Score von 3+ auf (sehr starke CTCF-Werte). BT-20 Zellen lagen im Scorebereich 1+/2+ (Median 1,38; min. CTCF-Wert: 0,82; max. CTCF-Wert: 2,65) und MDA-MB 231 Zellen im Bereich zwischen 2+/3+ (Median 5,75; min. CTCF-Wert: 4,68; max. CTCF-Wert: 6,68). Für die Auswertung wurde jede CTCF-Messung pro Zelle dreimal wiederholt und der Mittelwert gebildet. In Abb. 28 B ist für jeden Score eine repräsentative Aufnahme der CapG-Färbung von einer CTC dargestellt.



**Abb. 28: CTC-Klassifizierung nach CapG-Status.** **A)** Verteilung der korrigierten Fluoreszenzwerte der CapG-Färbung (*corrected total cell fluorescence*, CTCF). WBC (Leukozyten, *white blood cells*, n=46) haben mit 0,40 den kleinsten CTCF-Median und dienen zusammen mit den Brustkrebszelllinien BT-20 (CTCF-Median von 1,39, n=20) und MDA-MB 231 (CTCF-Median von 5,73, n=12) als Referenz. Die Patientenprobe “Pat 02” hatte einen Median von 0,50. In Probe “Pat 04” lag die größte Messvarianz vor (Median 3,29, maximaler CTCF-Wert von 26,21). **B)** Annähernde Normalverteilung der CapG-Expression auf CTCs. Es wurden 4 Zellen einem Score von 0, 24 einem Score von 1+, 24 einem Score von 2+ und 9 einem Score von 3+ zugeordnet. BT-20 Zellen lagen im Score-Bereich 1+/2+ (Median 1,38; min. CTCF-Wert: 0,82; max. CTCF-Wert: 2,65) und MDA-MB 231 Zellen zwischen 2+/3+ (Median 5,75; min. CTCF-Wert: 4,68; max. CTCF-Wert: 6,68). WBC hatten einen Score zwischen 0 und 1+. Bilder über dem Graphen (**B**) zeigen Repräsentativ CapG-Färbungen von CTCs. Für weitere Details siehe Text.

### 3.11 Machbarkeitsnachweis: Sequenzierung isolierter EpCAM<sup>pos</sup> CTCs nach Immunfluoreszenzfärbung

Es sollte die Machbarkeit der weiteren Charakterisierung von CTCs, nach Mikromanipulation auf genomischer Ebene mittels Sequenzierung (NGS), erfolgen. Dieser Schritt erlaubt als Downstream-Analyse von CTCs deren Charakterisierung im Hinblick auf deren Genom mittels *Whole Genome Amplification* (WGA) und finaler Sequenzierung. Hierbei können Gemeinsamkeiten in der heterogenen Gruppe von CTCs identifiziert werden. Dem Arbeitsablauf (siehe Abb. 25, Seite 63) zur Isolierung von CTCs mit Ablage auf Haftobjektträgern und anschließender Färbung eines Markers (hier: CapG), wurde ein Schritt hinzugefügt: nach CapG-Färbung wurden die CTCs erneut isoliert und in PCR-Reaktionsgefäße überführt.

Es wurden nur CTCs isoliert und als solche klassifiziert, wenn diese den anerkannten Kriterien entsprachen (siehe 1.7 auf Seite 8) und die (Kontroll-)Färbungen als einwandfrei eingestuft werden konnten. Beispielsweise musste eine CD45-Markierung (an WBCs) demonstrierbar sein.

Zunächst wurden die Zelllinie MCF-7 und T47-D zu Testzwecken dem Isolationsprozess durch den CellCelector unterzogen und anschließend per WGA aufgearbeitet (siehe Abb.

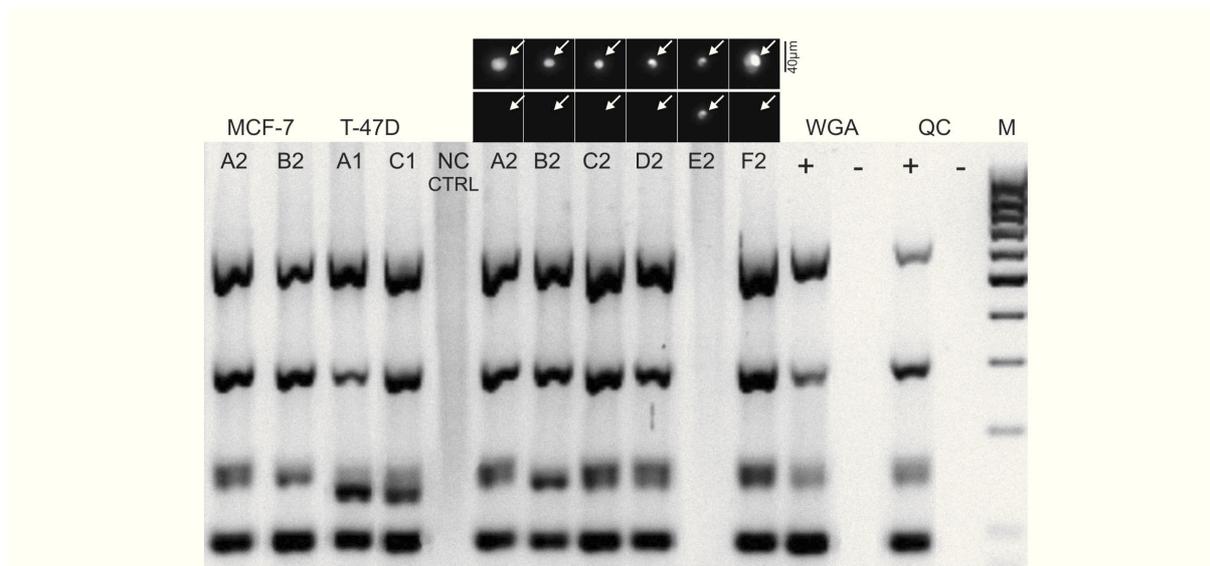
29). Dazu wurden MCF-7 und T47-D Zellen isoliert und in PCR-Tubes abgelegt, wobei ebenfalls eine NC-Kontrolle (NC CTRL, *no cell control*) aufgetragen wurde. Letzteres diente der Kontrolle, ob freie DNA oder Zellfragmente im Medium/Puffer, in dem sich die Zellen für den Isolationsprozess befinden, vorhanden ist und somit als Nachweis gilt, dass keine DNA-Verunreinigungen zu falschen Ergebnissen führt. Weiterhin wurde eine Positivkontrolle (genomische DNA) bzw. eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) in der WGA mitgeführt.

Die WGA-Produkte werden anschließend einer multiplex PCR zur Qualitätskontrolle (QC) unterzogen. In der Abbildung 29 sind 4 von 4 amplifizierte Genomabschnitte nach QC deutlich erkennbar. Die anschließende Analyse der QC per Agarose-Gelelektrophorese ist notwendig, um die Qualität der DNA, folglich auch die der Amplifikate nach der WGA, von isolierten Zellen zu beurteilen. Bei einer schlechten Ausgangsqualität nimmt die Zahl der Banden ab, wobei mit 3 Banden noch Downstream-Analysen möglich sind, jedoch ab 2 oder weniger Banden weitere Analysen eher abzulehnen sind (Beispiele sind nicht gezeigt).

Wie bereits beschrieben, wurden nach der (1.) Isolation die CTCs abgelegt, für einen bestimmten Marker Immunfluoreszenz-markiert (hier CapG), erneut (2.) isoliert und in PCR-Tubes überführt. Auf Grund des Nachteils, dass zur zweiten Isolation nur eine direkte Interaktion mit der Glaskapillare, sprich Abschaben, vonnöten war, wodurch dies den Isolationserfolg drastisch minimiert (wurde nicht gemessen, Annahmen können aber lediglich von 15-20%-Isolationserfolg ausgehen) sind 7/59 CapG-gefärbte CTCs für die Sequenzierung (NGS, *next generation sequencing*) verfügbar gewesen.

Mit Hilfe der NGS können mehrere Gensequenzen parallel analysiert werden und geben Hinweise auf z.B. SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Als zusätzliche Kontrollen wurden die Zelllinien MCF-7 und T47-D mitgeführt. Die WGA der MCF-7 bzw. T47-D Zellen als auch die der CTCs ist in Abbildung 29 abgebildet. Es werden nur die Zellen mit optimaler DNA-Qualität (nach QC, 4 Banden) gezeigt, da nur diese für weitere Analysen aufbereitet wurden. Zusätzlich sind zwei NC-Kontrollen aufgetragen (NC CTRL, E2), sowie die WGA- bzw. QC-Kontrollen (WGA +/- und QC +/-). Die Beschriftungen A2, B2 etc. sind die Positionen der PCR-Tubes in denen die Zellen abgelegt wurden, diese können redundant sein.

Anschließend wurden die Produkte per NGS sequenziert.

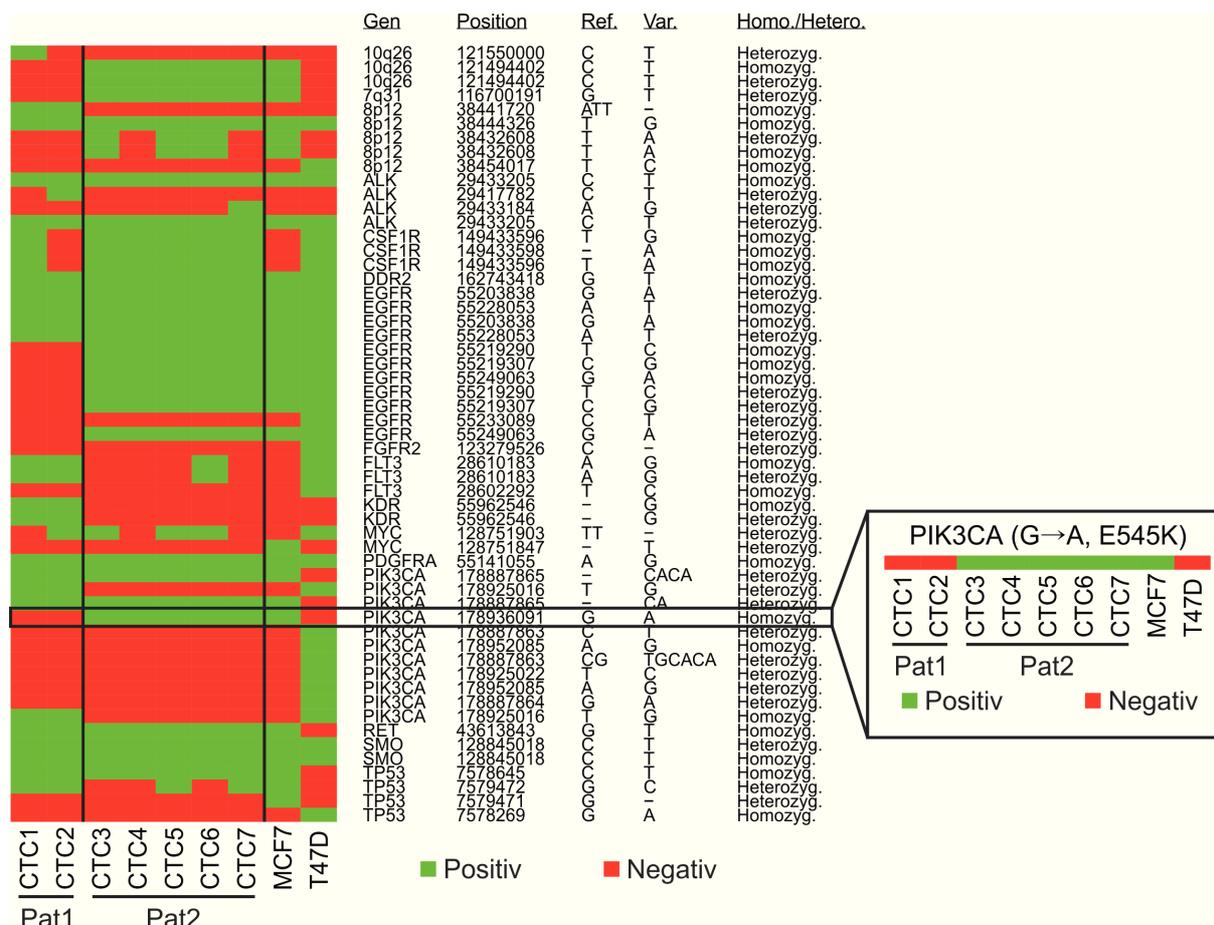


**Abb. 29: Whole Genome Amplification von CTCs.** A) Die Abbildung der Gelelektrophorese gibt die Qualitätskontrolle nach der WGA der isolierten Zellen wieder. Hier wurden zur Überprüfung des Ablaufs (*proof of principle*) zunächst MCF-7 und T47-D Zellen per CellCelector isoliert und für eine WGA mit anschließender QC prozessiert. Als Qualitätsmerkmal wurde eine Positiv-Kontrolle (gDNA) und eine Negativ-Kontrolle (PCR kompatibles H<sub>2</sub>O) mitgeführt. Dass die WGA/ QC ordnungsgemäß verlief und die DNA-Integrität und -Qualität der isolierten Zellen ausreichend war, ist an der maximalen Bandenanzahl erkennbar (4/4). Nicht gezeigt sind Zell-Isolationen mit geringerer DNA-Qualität (3 oder weniger Banden). Die Mitführung von Medium, in welchen die Zellen vorliegen, gibt Aufschluss über die Herkunft der amplifizierten DNA und schließt eine Kontamination von freier DNA aus (NC CTRL, *no cell control*). Zudem werden die isolierten CTCs (gezeigt sind 5/ 7) nach erfolgreicher WGA/ QC gezeigt. Alle erfolgreich isolierten CTCs wiesen ein optimales Bandenmuster aus und konnten zur Downstream-Analyse (NGS) verwendet werden.

Alle 7 CTCs wiesen konsistent SNPs (*single nucleotide polymorphism*) an unterschiedlichen Positionen in diversen Genen (z.B. *pdgfra*, *tp53*, *alk*) auf (Abb. 30). Die Abbildung gibt die Position, den Wildtyp (Ref., Referenz) und den SNP (Var., Varianz) zu dem jeweiligen Gen an. Es waren mehrere SNPs/ Gen detektiert worden, wobei Grün die Existenz des SNPs andeutet und Rot angibt, dass es sich um den Wildtyp handelt.

Alle SNPs hatten keine Auswirkung auf die spätere Proteinsequenz und nur eine Mutation, die PIK3CA Mutation (G→A, E545K, Abb. 30 Kasten), wurde detektiert. Diese Veränderung wurde in den CTCs der Patientin 1 (Pat1) nicht detektiert, während die CTCs der Patientin 2 (Pat2) diese Veränderung aufwies.

Es konnte erfolgreich demonstriert werden, dass der Nachweis von SNPs und möglicherweise auch von (weiteren) Punktmutationen mittels NGS nach Mikromanipulation auf Einzelzellen möglich ist.



**Abb. 30: Sequenzierung von CTCs und Zelllinien nach Mikromanipulation.** Vorhandene SNPs in den analysierten Genen werden grün und der Wildtyp in rot dargestellt. Detektion mehrere SNPs in einem Gen, werden durch Mehrfachnennung des Gennamens angegeben sowie der entsprechenden Position. Alle 7 CTCs wiesen SNPs auf. Angegeben sind neben Gen-Namen, die Position, der Wildtyp (Ref.) und der SNP (Var.). Es traten zwischen den CTCs SNP-Varianzen auf. In den CTCs 1 und 2 konnte keine PIK3CA Mutation (G→A, E545K, Kasten) detektiert werden.

## 4 Diskussion

Das Verständnis der Mechanismen zur Metastasierung und der Subpopulation von Tumorzellen, welche erfolgreich vom Primärtumor dissoziiert sind und im Blutstrom zirkulieren, ist essentiell für die Entwicklung neuer Therapien bei malignen Neoplasien. Ein wichtiger Aspekt der Metastasierung ist die Fähigkeit zur Migration und Invasion, wodurch Tumorzellen in benachbartes Gewebe eindringen und auch in Lymphbahnen oder Blutgefäße eindringen können[20]. Tumorzellinvasion und -Migration ist unumgänglich mit einer Regulation des Actin-Cytoskeletts assoziiert. Viele Actin-assoziierte Proteine führen am Ende eines Signalwegs ihre Funktionen aus, unter anderem im Zusammenhang mit Enzymen wie GTPasen der Rho-Familie [40]. Komponenten des Cytoskeletts, Actin-regulierende Proteine eingeschlossen, sind als neue Zielproteine für die Krebstherapie denkbar[109][70][118]. In der Vergangenheit konnte ein Bild bedeutender Cytoskelett-Modulatoren im Kontext der Tumorbiologie gezeichnet werden (Review [19]).

## 4.1 CapG-Expression in Brustkrebsproben und Zelllinien

Die Expression des Cytoskelett-Modulators *macrophage capping protein* (CapG) lag in invasiven Tumorzellen im Vergleich zur allgemeinen Population von Tumorzellen im Primärtumor durchschnittlich 2,5-fach erhöht (Tabelle 3 des Reviews [19]). Dahl et al.[24] wiesen in 31% der untersuchten Brusttumor-Proben eine Überexpression von CapG nach und die Analyse der Tumorproben (28% CapG-Überexpression) der vorliegenden Arbeit bestätigen dieses Ergebnis. Für die Auswertung dieser Daten wurde zunächst zur Einteilung der CapG-Expression ein *cut-off* definiert. Dieser gibt an, ab welchem Expressionslevel eine Überexpression vorliegt. Es ist anzunehmen, dass bei der Tumorprogression die CapG-Expression unterschiedlich ausfallen wird und sich zwischen Individuen unterscheidet. Deshalb wurden zur Definition einer CapG-Überexpression zwei *cut-offs* gesetzt (CapG-Expression von 0,85 und 1,70).

Durch diese Einteilung konnte in 22 von 78 (28%) Brustkrebs-Gewebeproben mindestens eine 1,7-fache CapG-Expression im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe gemessen werden. In den Tumorproben lag die durchschnittliche CapG-Überexpression ebenfalls wie im Review von Condeelis et al.[19] bei 2,5.

Interessanterweise war neben dem Zusammenhang der erhöhten CapG-Expression und einem positiven Metastasen-Status eine signifikante Korrelation mit einem negativen ER-Rezeptor-Status deutlich geworden. Dieses Ergebnis ist bisher nicht beschrieben worden. Ob CapG damit auch im Zusammenhang mit den zur Zeit schwer therapierbaren *triple negative breast cancer* (TNBC) steht, ist an dieser Stelle noch unklar. Allerdings konnte keine Assoziation mit dem zweiten Hormonrezeptor (Progesteron-Rezeptor, PgR) gezogen werden, wodurch ein direkter Zusammenhang mit TNBC unwahrscheinlich wird.

In der ROC-Analyse liegen die determinierten Richtig-Positiv-Raten relativ niedrig, demnach scheint CapG als Prädiktor für M1 und ER<sup>neg</sup> Status ungeeignet. Dies liegt aber wahrscheinlich eher an den sehr geringen Fallzahlen (8 Proben mit vorhandenem M-Status und 18 Proben mit ER-Status) als am Potential des Prädiktors selbst. Auch im Falle des relativ geringen AUC-Wertes (dadurch geringe Aussagekraft der ROC-Analyse) ist eine geringe Fallzahl verantwortlich. Weiterführende Analysen an größeren Probenzahlen sind notwendig um diese Frage beantworten zu können. Dass CapG eine Bedeutung für den Tumorprogress im Ovarialkarzinom hat, konnte auch in einer Studie von J. Glaser et al. gezeigt werden: hier wurde eine Überexpressions-Rate von CapG (38%, n=47) in Ovarialkarzinom-Proben detektiert[37].

CapG wurde auch als potentieller Tumormarker von Kang und Kollegen vorgeschlagen[51]. Hierbei detektierten die Wissenschaftler in einer Proteom-Studie in Brustkrebsproben, dass CapG auch auf Protein-Niveau im Tumorgewebe verglichen zu benachbartem Nor-

malgewebe erhöht war. In anderen Tumorentitäten, wie dem hepatozellulären Karzinom (vaskulär infiltriert)[56] oder dem Pankreaskarzinom[113], konnte eine CapG-Überexpression nachgewiesen werden. Dadurch liegt in CapG, im Zusammenhang mit der Invasivität und über diversen Tumorentitäten hinweg, eine bedeutsame Rolle als möglicher Migrations- und/ oder Invasionsmarker begründet. Wird der Prozess vom zunächst nicht invasivem Tumor, dem duktalem Karzinom *in situ* (DCIS), zum invasivem Tumor, dem invasiven duktalem Karzinom (IDC), eingehender analysiert, offenbart sich ein Anstieg der CapG-Expression (CapG-Expression im DCIS < IDC,  $p \leq 0,05$ ). Eine mögliche Begründung lieferte De Corte et al., als sie nach CapG Überexpression, und dem dadurch folgenden Anstieg im Invasionspotential, in MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-Zellen einen Kern-Import beobachteten und die Invasivität in Abhängigkeit zur Kern-Lokalisation von CapG stellten[27]. Auch in Arbeiten mit der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 konnte, unabhängig von De Corte et al., eine CapG Translokation zum Nucleus und das davon abhängige Invasionspotential beschrieben werden[86].

## 4.2 CapG-Lokalisation im Nucleus

Diese Daten führen zur Überlegung, ob CapG wohlmöglich eine bestimmte Rolle im Zellkern ausführt (z.B. in der Gen-Expression). Um die Hypothese zu überprüfen, ob die CapG-Überexpression und Lokalisation im Tumorzellkern zu einer gesteigerten Invasivität führt und ob dadurch eine Modifikation der Gen-Expression verursacht wird, wurde ein Zellkulturmodell etabliert (Nicole Seier, [100]). In diesem Modell wurde die CapG-Expression im Sinne von Überexpression bzw. Knock-Down verändert. Das Zellkulturmodell (Vorarbeit von Frau Dr. Nicole Seier[100]) umfasst MDA-MB 231 Zellen und MDA-MB 231 Zellen mit CapG siRNA (CapG Knock-Down), folglich MDA-MB 231/siCapG genannt, sowie BT-20 und BT-20 mit CapG-Überexpression (BT-20/CapG).

Betrachtet man nun auch die nicht veröffentlichten Daten aus den Invasionsassays mit dem Zellkulturmodell [100] (siehe Seite 8), so ergab sich erwartungsgemäß eine starke Korrelation zwischen CapG-Expression und Invasivität. Eine Kernlokalisierung war nach Knock-Down kaum nachweisbar und die Invasivität sank auf das Niveau der gering invasiven Zelllinie BT-20. Im Falle der BT-20/CapG-Zellen lag eine Kernlokalisierung von CapG vor und das Invasionspotential stieg auf ein ähnliches Potential wie jenes der MDA-MB 231 Zellen.

Allerdings war das Verhältnis Kern-CapG/Cytoplasma-CapG in MDA-MB 231 Zellen größer als in BT-20/CapG Zellen und ein Unterschied im CapG-Expressionslevel konnte nicht festgestellt werden. Das führt zur Annahme, dass das Invasionspotential nicht alleine von einer höheren CapG-Menge abhängig ist, sondern scheint durch die subzelluläre Verteilung beeinflusst zu sein. Diese Aussage wurde auch von De Corte et al. getroffen[27].

### 4.3 CapG übt Einfluss auf die Gen-Expression aus

Eine erhöhte CapG-Expression alleine scheint allerdings nicht die einzige Begründung für ein gesteigertes Invasionspotential zu sein: während die Pankreaskarzinom-Zelllinie Suit-1 nach CapG-Knock-Down (siRNA vermittelt) noch deutliche Defizite in Invasions- und Wund-Heilungsassays aufwies, waren die Zelllinien der gleichen Tumorentität Panc-1 und MiaPaCa-2 nicht eingeschränkt[113]. Dies führt zur Annahme, dass CapG wohl an der Regulation der Motilität (und der Invasivität) in verschiedenen Zelllinien auf unterschiedliche Weise beteiligt ist, ebenso in verschiedenen Tumorentitäten. Möglicherweise liegt eine deutlich komplexere Situation vor. Es kann angenommen werden, dass CapG auf Grund der Lokalisation im Nucleus Einfluss auf die Gen-Expression ausübt oder zumindest an diesem Prozess beteiligt ist. Es wurde auch von Tonack et al. vermutet, dass CapG Effekte und Änderungen auf Protein-Ebene mancher Proteine hatte[115]. Möglich wäre an dieser Stelle ein Effekt auf die RNA-Synthese, da die Nucleolus-Lokalisation von CapG in einer RNA Pol I-Abhängigkeit vorliegt[44].

Ob eine erhöhte CapG-Expression und -Lokalisation im Zellkern von CapG mögliche Auswirkungen auf die Gen-Expression hat, wurde durch ein Gen-Expressionsprofiling mittels Microarray untersucht. Hierfür wurde das Zellkulturmodell verwendet, um die (unterschiedlichen) Profile zwischen Überexpression (BT-20 vs. BT-20/CapG, Kondition 1) und Knock-Down (MDA-MDA 231 vs. MDA-MB 231/siCapG, Kondition 2) zu untersuchen. Die Daten aus dem Microarray wurden in dieser Arbeit neu betrachtet und bioinformatisch ausgewertet. Aus dem Vergleich zwischen den beiden Konditionen 1 und 2 wurden 81 differentiell exprimierte Gene identifiziert (61↑ und 20↓). Für die Microarraystudie wurde das Zellkulturmodell verwendend, um nun den experimentellen Zellkultur-Hintergrund zu minimieren und die Ergebnisse (die Gen-Kandidaten) in Patientenmaterial zu validieren, wurde dieses Microarray-Profil mit einem Datensatz verglichen, welcher aus einem Vergleich der Gen-Expression zwischen DCIS und IDC herrührte[99]. Hier wurden Microarrayanalysen von *matched-pair* duktalem Karzinom *in situ* (DCIS) und invasivem duktalem Karzinom (IDC) Proben durchgeführt. Das Ziel dieser Studie war die Identifikation neuer molekularer Marker, um die Transition von DCIS zum IDC zu charakterisieren. Anschließend wurden die Kandidaten in dieser Studie per qRT-PCR validiert. In der Studie sind CapG und GPNMB beide in den IDC-Proben signifikant stärker als in den DCIS-Proben exprimiert.

Der Vergleich mit den Tumorproben erlaubte die Aufwertung der (Zellkulturmodell-) Microarray-Ergebnisse, denn dadurch konnte zum einen durch Selektion die Anzahl der Kandidaten verringert und, durch den Vergleich mit klinischen Proben, die Relevanz gesteigert werden. Es folgten daraus 7 potentielle CapG-abhängig regulierte Gene: GPNMB, NRP1, LOXL2, TRIM47 und COL16A1 waren hoch-reguliert (im IDC hochreguliert), während ZDHHC11 und KIAA1467 (im IDC runterreguliert) vermindert exprimiert wa-

ren.

Die Analyse mittels *Gene Ontology* der durch die Microarray-Studie erhaltenen Gen-Expressionsprofile erlaubt eine Darstellung des funktionalen Zusammenhangs der CapG-abhängig regulierten Kandidaten. Die GO-Analyse eignet sich zur unterstützenden Auswertung von Transkriptom-Daten (z.B. hinsichtlich der Hervorhebung bestimmter Funktionen oder Gene/Gengruppen), es sollten allerdings Validierungen dieser Hinweise angeschlossen werden. Dennoch lassen die Interpretation der GO-Analyse den Schluss zu, dass die meisten CapG-abhängig regulierten Gene Funktionen der extrazellulären Matrix und der Adhäsion (Zelladhäsion und biologische Adhäsion) wahrnehmen. Es ist bekannt, dass die meisten Zell-Matrix Interaktionen durch Integrine vermittelt werden, welche die ECM mit dem Cytoskelett verbinden. Darüber hinaus führt die ECM-Remodulation und eine größere Menge bestimmter Collagene zu einem größeren Invasionspotential beim Mammakarzinom[80]. ECM-Komponenten ermöglichen die Induktion von Zellreaktionen wie Zelladhäsion, Migration oder sogar Genexpression[46]. Zum Beispiel kann eine CapG-Expression durch Integrine induziert werden[18]. Weiterhin können Tumorzellen ihre Mikroumgebung durch manipulieren die extrazelluläre Matrix ändern, wodurch klar wird, dass die ECM nicht nur Stütz- und Strukturgeber für das Gewebe, sondern auch fähig ist, das Zellverhalten zu regulieren. Zum Beispiel die Proliferation, Cytoskelett-Organisation, Zelldifferenzierung und Rezeptor-Signalgebung[73][53].

So ist das FACIT (*Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices*) Collagen COL16A1 neben anderen Mitgliedern der FACIT-Collagen-Familie (COL12A1, COL9A3) ebenfalls in Tumoren überexprimiert und mit Invasivität assoziiert. COL16A1 liegt im Gliom überexprimiert vor und korreliert mit einem invasiven Phänotyp[9]. Auch COL16A1 interagiert mit  $\alpha1\beta1$ - und  $\alpha2\beta1$ - Integrinen über dessen C-Terminus[29] (wie CapG). Es wurde bekannt, dass COL16A1 Zell-ECM Interaktionen ermöglicht und als erster Adhäsionskontakt von Tumorzellen während der Migration dient, sowie Lockstoff-ähnliche (*attractants*) Eigenschaften für die Migration aufweist[9].

FACIT-Collagene, z.B. hier COL12A1, nehmen ebenso eine wichtige Rolle bei der desmoplastischen<sup>17</sup> Invasionsfront und der Interaktion zwischen Tumor-assoziierten Fibroblasten und (Colorektal-) Karzinomzellen ein. So wurde für COL12A1 in Colorektalkarzinom-Proben eine Überexpression nachgewiesen[52]. FACIT Collagene werden während der Migration der Tumorzellen sezerniert und dienen als Ankerpunkte ([47] und Zitationen darin) sowie der Re-Strukturierung der ECM, während gleichzeitig im Invasionsprozess die Basalmembran - mit samt enthaltenen FACIT Collagenen - fragmentiert wird[5][84][9]. Möglicherweise werden diese Prozesse, neben anderen Faktoren, von CapG beeinflusst. Es wäre denkbar, dass durch die verstärkte (CapG-abhängige) Expression der FACIT Collagene die Migration erleichtert wird, wobei parallel eine hohe cytoplasmatische CapG-

---

<sup>17</sup>Eine desmoplastische Reaktion ist die induzierte Bildung von kollagenreichem Bindegewebe. Hervorgerufen durch das Tumorwachstum oder die mit ihm verbundenen immunologischen Prozesse.

Menge für diese Migration nötige Actin-Cytoskelett Dynamik gewährleistet. Allerdings müsste diese Hypothese eingehender untersucht werden.

#### 4.4 Einfluss auf die Gen-Expression des Transmembran-Glykoproteins GPNMB durch CapG

Der Fokus wurde auf das Transmembran-Glykoprotein GPNMB gelegt, auf Grund der starken Expressionsänderungen im Zellkulturmodell und der bedeutsamen Rolle als Tumor-assoziiertes Gen in der Literatur. GPNMB wurde im hoch aggressivem Melanom[116], Gliom[59] und Mammakarzinom[92] mit erhöhter Expression nachgewiesen und die durch die proteolytische Aktivität von ADAM10 hervorgerufene, lösliche GPNMB-Form wies angiogene Eigenschaft auf[90]. Brustkrebs geht häufig mit einer ossären Metastasierung einher[123], wobei auch GPNMB mit ossären Metastasen assoziiert und die Expression gehäuft vorkommt[92][91]. Interessant ist, dass in der GO-Analyse der Microarray-Studie deutlich wird, dass Ossifikation und Knochenentwicklung als hoch signifikante GO-Termini bestimmt werden konnten.

GPNMB zählt derzeit als neuartiges therapeutisches Zielprotein des monoklonalen Antikörpers Glematumumab (Klon CR011)[91]. Der Antikörper ist mit Monomethyl auristatin E (MMAE, Vedotin) konjugiert[67] und wird derzeit in einer klinischen Studie der Phase II gegen die Tumorentitäten Melanom[81] und Mammakarzinom[54] getestet. GPNMB wurde als der potenteste CapG-abhängig regulierte Kandidat bestimmt und schließlich zur Validierung ausgewählt. Interessant ist zudem, dass die GPNMB-Expression signifikant höher in ER<sup>neg</sup>-Mammakarzinom-Proben ist, als in ER<sup>pos</sup>-Proben[92], da auch CapG in den analysierten Tumorproben der vorliegenden Arbeit mit einem negativen Östrogen-Rezeptor Status assoziiert ist. Allerdings muss eine Korrelation mit weiteren Daten geklärt werden und ist auf der aktuellen Daten-Grundlage nur als Hinweis ausreichend.

Ein Zusammenhang könnte auch in einem anderen Bereich bestehen: die CapG-Expression nimmt während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu (bis zu einer Proteinmenge von 0,9% des Gesamtproteinlysates)[23], genauso wie GPNMB. Die GPNMB-Expression steigt ebenso während der Makrophagen-Entwicklung an und kann sogar durch IFN- $\gamma$  und Lipopolysaccharide (LPS) induziert werden[88]. Eine Behandlung von Mammakarzinom-Zelllinien mit z.B. IFN- $\gamma$  wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, es bleibt somit zu prüfen, ob dies Einfluss auf die CapG-Expression haben könnte. GPNMB (auch Osteoactivin genannt) ist physiologisch auf Melanozyten, Osteoclasten, Osteoblasten und dendritischen Zellen exprimiert und in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert. Es fungiert als Positiv-Regulator von Osteoblasten während der späteren Stadien der Matrix-Maturation und Mineralisation[1] (vgl. GO-Analyse des

CapG-Microarrays, wo GO-Termini wie Ossifikation oder Knochenentwicklung als signifikant errechnet wurden; Abb. 12 auf Seite 48), wobei dies teilweise in Kombination mit BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) geschieht. Es induziert Knorpel- und Knochenformierung und wird in SMAD1-abhängiger (*mothers against decapentaplegic homolog 1*) Manier kontrolliert[1]. Im Ratten-Modell verstärkt GPNMB die Reparatur von Knochenfrakturen aufgrund erhöhter Expression[2]. Wie bereits erwähnt, hat eine erhöhte GPNMB-Expression in Brustkrebs eine progressive Wirkung der Zellmigration, Invasion und Metastasierung, sowohl *in vitro* wie *in vivo*[92][90][91]. Die Analysen der IDC/DCIS-Patientenproben bestätigen diesen Zusammenhang und weisen auf einen Einfluss von CapG hin. Denn es konnte auf mRNA-Ebene deutlich gemacht werden, dass abhängig von der CapG-Expression eine synchrone GPNMB-Expressionsänderung vorlag. Allerdings wurde auf Protein-Niveau zwar nach CapG Knock-Down eine drastische Minderung von GPNMB messbar, jedoch nahm die GPNMB-Protein Menge mit CapG-Überexpression nicht signifikant zu. Eine mögliche Erklärung wäre, dass CapG im Nucleus nicht direkt an der Transkription von GPNMB beteiligt ist und auch nicht direkt an den GPNMB-Promotor bindet. Es könnte auch sein, dass ein weiterer Faktor fehlt. CapG besitzt zwar eine Helix-Loop-Helix-Domäne[85], die eine starke Ähnlichkeit aufweist, wie solche von Transkriptionsfaktoren, dennoch ist es eher unwahrscheinlich das CapG ein Transkriptionsfaktor ist (Versuche zur Chromatin-Immünpräzipitation blieben erfolglos, Daten wurden nicht gezeigt).

Es ist denkbar, dass CapG als Adapterprotein fungiert und den Transkriptionsfaktor-komplex, der für die GPNMB-Expression notwendig ist, stabilisiert. Denn die Expression von GPNMB ist abhängig vom MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*)[87]. Allerdings sind zusätzliche regulatorische Faktoren an der Interaktion mit dem GPNMB-Promotor beteiligt, da die Deletion des MITF-Bindungsmotiv, ein 89 bp langes Element (MCS3 genannt) im GPNMB-Promotor, *in vivo* im Zebrafischmodell keine Auswirkungen hatte[63]. Das Szenario könnte möglicherweise wie folgt sein: fällt CapG durch einen siRNA-vermittelten Knock-Down weg, so bricht der Komplex in der Tendenz eher zusammen. Ist CapG im Überschuss vorhanden, bildet sich der Komplex nicht signifikant häufiger aus, um eine GPNMB-Transkription einzuleiten (da weitere Faktoren nicht übermäßig vorhanden sind). Möglich wäre auch eine Regulation der Transkription ohne direkten Zusammenhang mit der DNA, da die *Gene Ontology*-Analysen mögliche CapG-Interaktionspartner im Kontext des RNA-Splittings identifiziert haben. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig.

Eine weitere Verbindung zwischen GPNMB und CapG könnte im Invasionspotential liegen: so erhöht GPNMB die MMP-3 Expression und restrukturiert die ECM[92]. Parallel dazu steigert CapG die Expression von FACIT-Collagenen, um FACs auszubilden und schließlich die Migration dadurch zu steigern. GPNMB ist zudem in ossären Metastasen

(u.a.) erhöht und ist verstärkt in Metastasierung und Invasivität involviert[92].

Die Verbindung zu CapG könnte möglicherweise in der Migration liegen: erfolgt eine ECM-Reorganisation und Degradation durch z.B. MMP-3, erfolgt anschließend die Cytoskelett-Reorganisation und die Tumorzelle kann migrieren.

CapG beeinflusst offensichtlich die Gen-Expression. Wie der Mechanismus funktioniert ist an dieser Stelle jedoch noch unklar. Es ist allerdings nicht unbedingt überraschend, dass CapG Einfluss auf die Genexpression ausübt, denn andere Mitglieder dieser Proteinfamilie, der CapG angehört (Gelsolin-ähnliche), wie Flightless-I[62] und Supervillin[75][126] sind ebenfalls im Nucleus vorhanden und nehmen Teil an Transkriptions-regulatorischen Prozessen[78][71]. Beispielsweise Flightless-I konnte als Co-Aktivatoren der Kernrezeptoren Östrogenrezeptor und Thyroid Hormon-Rezeptor identifiziert werden. Darüber hinaus interagiert Flightless-I mit dem SWI/SNF-Komplex[62][49]. Der SWI/SNF-Komplex ist ein ATP-abhängiger Chromatin-Remodulations-Komplex und dient der Transkriptionsregulation. Supervillin ist assoziiert mit dem Androgenrezeptor, wodurch ebenfalls eine Modulation der Transkriptionsaktivität ausgelöst wird.[94][114]. Darüber hinaus gibt es Berichte, dass CapG selbst an der Chromatin-Remodulation beteiligt ist, denn Kern-CapG interagiert nachweislich mit Kern-Actin und es gibt deutliche Hinweise, dass Kern-Actin eine Rolle in Kernprozessen wie die Chromatin-Remodulation[83][108] oder dem Kern-Export[42] einnimmt.

#### 4.5 Untersuchung des CapG-Interaktoms validiert CapG-Einfluss auf die Gen-Expression

Es wäre möglich durch die Identifikation von CapG-Interaktionspartnern im Zellkern (Kern-CapG-Interaktom) die Rolle von CapG besser zu verstehen. Eine solche Studie im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab einen deutlichen Hinweis, dass CapG durch Interaktionspartner Einfluss auf die Transkription und sogar auf Protein-DNA-Komplexbildung einnimmt. Es blieben allerdings Validierungsexperimente der Kandidaten ACOX3 und FKBP8 ohne Erfolg<sup>18</sup> (Daten wurden nicht gezeigt).

Dennoch ließ die funktionale Annotation mittels GO-Analyse aller potentiellen Interaktionspartner den Schluss zu, dass CapG im Rahmen der Actin-Modulation, der Transkription (mRNA-Prozessierung, Splicing, etc.) und der Regulation der Apoptose fungiert. Dies deutet darauf hin, dass CapG durch Interaktion mit anderen Proteinen deren funktionale Rolle, z.B. im DNA-Packaging oder in der mRNA-Prozessierung, beeinflusst. Dass CapG eine Regulation in der Apoptose ausübt ist ein Novum und bisher unbekannt.

<sup>18</sup>Es wurden die Proteine ACOX3 und FKBP8 mittels Co-Immunpräzipitation und nachfolgendem Immunoblot zum Nachweis von CapG und ACOX3 bzw. FKBP8 durchgeführt. Weiterhin sollten Immunfluoreszenzfärbungen durch den Nachweis einer Co-Lokalisationen von CapG und des jeweiligen Kandidaten die Interaktion bestätigen (durch *Confocale LASER Scanning Fluoreszenz-Microscopy*). Die Kandidaten wurden ausgewählt, aufgrund der höchsten Anreicherung in der Massenspektrometrie. Andere potentielle Interaktionspartner wurden nicht validiert und müssen als Interaktionspartner bestätigt werden.

Die CapG-Interaktion mit Proteinen findet entsprechend der GO-Analyse an Membransumgeschlossenen Lumen und Organellen statt. Interessant ist, dass GPNMB an der Endosomen-Formierung beteiligt ist[92] und daher könnte CapG zusammen mit GPNMB in solchen Prozessen verwickelt sein.

Die möglichen Interaktionspartner eines Proteins positionieren dieses innerhalb eines Signalweges oder einer Funktion. Für CapG bedeutet dies, dass in mehreren Ansätzen und im Vergleich zu einer unabhängigen Untersuchung (van Impe-Datensatz[121]), in der vorliegenden Arbeit ein CapG-Interaktom definiert werden konnte. Obwohl CapG demnach deutlich an Prozessen wie der mRNA-Prozessierung, DNA-Modulation, Apoptose sowie der bereits bekannten Regulation von Actinfilamenten beteiligt ist, musste festgestellt werden, dass das CapG-Interaktom nicht vollständig ist. Es wurden zwar die bekannten Interaktionspartner ACTC1[102] und Bestandteile der Microtubuli[45] nachgewiesen, es fehlen jedoch RanGTPase, NFT2, Nuc62[120], PIP<sub>2</sub>[50] und die PI3K-Untereinheit p85[64]. Woran dies liegt, bleibt spekulativ, allerdings ist es möglich, dass bestimmte experimentelle Bedingungen ursächlich sein könnten. Da bekannt ist, dass CapG einer Konformationsänderung bei An- oder Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> unterliegt, wäre eine unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, neben anderen Faktoren, für eine CapG-Protein-Interaktion ausschlaggebend. Eine Validierung der ermittelten und noch nicht geprüften potentiellen Interaktionspartner muss noch erfolgen. Nur dadurch kann die Funktion von CapG im Kontext des Interaktoms bestätigt werden.

#### 4.6 Mögliche Ursachen erhöhter CapG-induzierter Invasivität

Weiterhin stellte sich die Frage, wodurch eine CapG-Überexpression im Tumor bzw. einzelnen Tumorzellen entsteht. Eine Amplifikation wurde ausgeschlossen (unveröffentlichten Daten, Frau Dr. Betz, Forschungslabor der Frauenklinik, Uniklinikum Düsseldorf) und Daten bezüglich Hypermethylierungen des Promotors sind nicht bekannt. Ebenfalls wurden CapG-SNPs detektiert, diese konnten aber weder physiologische noch pathologische Funktionen zugeordnet werden[23].

Ein möglicher Signalweg, welcher Voraussetzung einer CapG vermittelten Invasivität sein könnte, ist der MAPK-Signalweg sein[27]. Es wurde die CapG-induzierte Invasivität durch dominant-negative Mitogen-aktivierende Protein-Kinase-Kinasen (MEK) sowie einem pharmakologischen Inhibitor von MEK (PD98059) blockiert. Dies bedeutet, dass CapG-vermittelte Invasivität eine Signalgebung über den MAPK-Signalweg benötigt[27]. Weiterhin führte eine dominant-negativ Expression von RhoA und Cdc42 zu einer Inhibition von CapG induzierter Invasion[27]. Nicht aber bei Co-Expression mit Rac1. MDCK-C Zellen zeigten eine Inhibition der Invasivität, wenn sie mit C3-Transferase, einem RhoA Inhibitor, inkubiert wurden. Zudem erfordert einer Collagen-abhängige Invasion neben CapG auch Ras Aktivität, denn RasGAP (GA=*GTPase activating protein*) aktiviert die

GTPase-Aktivität von Ras, wodurch Ras inaktiviert wird. Dadurch wird die Invasion inhibiert[27].

Eine Überexpression von CapG liegt ebenfalls in Stress-Faktoren begründet, die während der Progression einer Neoplasie nahezu immer auftreten: Hypoxie, Nährstoffmangel und mechanischer Druck sowie teilweise andere mechanische Belastungen (z.B. Scherkräfte). Diese extrazellulären Bedingungen beeinflussen die CapG-Expression, so herrscht in verdichteten Tumoren ein dramatischer Nährstoff- und Sauerstoffmangel (z.B. erkennbar an Nekrose im Tumorzentrum bei comedo DCIS-Proben). Bei Hypoxie wird ein HIF-1 $\alpha$ -abhängiger (*hypoxie-inducible factor 1*, HIF-1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor) Anstieg der CapG-Expression beobachtet[101]. HIF-1 $\alpha$ , und andere Faktoren wie Tyrosinkinasen (diese sind u.a.: BCR/ABL, PDGFRA, ALK und NPM[77] oder der Transkriptionsfaktor AP-1[7]) induzieren einen Anstieg der CapG-Expression, was teilweise zur Progression des hepatozellulären Karzinoms (HCC) beiträgt[56]. Mechanische Belastungen führen ebenfalls zu einem CapG-Anstieg. Die CapG-Menge im Cytoplasma verdoppelte sich nach 2 Stunden in Endothelzellen, welche unidirektionalen Scherkräften ausgesetzt waren, während sich die CapG-Menge im Zellkern nach 24 Stunden sogar vervierfachte[74]. Ein Anstieg der Migrations-Fähigkeit der Endothelzellen auf Grund der Scherkräfte konnte ebenfalls beobachtet werden.

Es ist denkbar, dass für eine erfolgreiche Tumorzell-Infiltration, neben vielen weiteren Faktoren, CapG eine sowohl funktionale (Cytoplasma) wie auch regulatorische (Nucleus) Aufgabe übernimmt. Zum einen die Modulation des Actin-Cytoskeletts, um die Motilität zu ermöglichen (funktional). Wobei hier eine hohe Menge an CapG erforderlich ist, um rasche und dynamische Veränderungen des (Actin-)Cytoskeletts zu gewährleisten. Zum anderen scheint CapG eine regulatorische Aufgabe in Bezug der Gen-Expression einzunehmen. Die CapG-abhängige Gen-Expression ermöglicht vielleicht auf externe und extreme Bedingungen wie Hypoxie oder mechanischen Stress zu reagieren.

## 4.7 CTC-Isolation

Zirkulierende Tumorzellen gelten als eine Form der *liquid biopsy* des Tumors[26][124]. Als solche erlauben sie eine Überwachung des Krankheitsverlaufs sowie Therapieerfolgs[22]. Um die biologische Bedeutung von CTCs besser zu verstehen und tatsächlich diese für die (personalisierte) Therapiewahl nutzbar zu machen, werden große Anstrengungen unternommen: die Untersuchungen von einzelnen CTCs und deren Genom, Transkriptom und/oder Proteom[95][122][30][55][57]. Bei diesen Untersuchungen werden unterschiedliche Methoden eingesetzt, derzeit hauptsächlich die Immunfluoreszenz (Protein-Information) sowie nachfolgend die Sequenzierung (Genom-Information).

Da CTCs in Bezug auf Invasion und Migration zu den wohl potentesten Subpopulationen an Tumorzellen zählen[8], sollte eine Untersuchung von CapG auf zirkulierenden

Tumorzellen im Kontext der CTC-Charakterisierung erfolgen. Es wurde folglich der Frage nachgegangen, ob und wie die Proteinexpression (Immunfluoreszenz) von CapG auf diesen hoch-invasiven Zellen, vorliegt.

Eine für die CTC Isolation geeignete Technologie musste zunächst etabliert werden. Die Einzelzell-Isolation ist notwendig, aufgrund des enormen Hintergrundes an Leukozyten in einer Blutprobe und um diese möglicherweise heterogene Gruppe auf Einzelzellniveau zu charakterisieren. Es existieren derzeit verschiedene Technologien (vgl. [111]) zur Anreicherung von CTCs (siehe Tabelle 9, kein Anspruch auf Vollständigkeit).

**Tabelle 9:** CTC-Technologien

<b>Tec.</b>	<b>En.</b>	<b>Iso.</b>	<b>Img.</b>	<b>D.-App.</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CellSearch</b>	EpCAM <sup>pos</sup>	Nein	Ja	nicht vorgesehen	Janssen Diagnostics, USA
<b>DepArray</b>	-	(z.Z.) EpCAM <sup>pos</sup>	Ja	G	Silicon Biosystems, USA
<b>Parsortix</b>	Größe	Nein	DS	G, T, IF, C	Angle PLC, UK
<b>CellCollector</b>	EpCAM <sup>pos</sup>	Nein	DS	IF	Gilupi, D
<b>ISET</b>	Größe	Nein	DS	IF	Rarecells SAS, USA
<b>FACS</b>	Ja	Ja	Nein	G, T, IF, C	diverse
<b>AdnaTest</b>	EpCAM <sup>pos</sup>	Nein	Nein	G, T	Qiagen, D
<b>CellCollector</b>	Ja	Ja	Ja	G, T, IF, C, P	ALS, D

Tec.= Technologie, En.= Anreicherung, Iso.= Einzelzell-Isolation, Img.= Bildgebung, D.-App.= Downstream-Applikation, DS= Downstream, G= Genomanalyse, T= Transkriptomanalyse, C= Kultivierung, IF= Immunfluoreszenz, P= Proteom-Profilierung

Die meisten Technologien erlauben jedoch entweder keine Charakterisierung von alternativen Tumormarkern wie CapG oder GPNMB, hinsichtlich der Kombination aus Proteinexpression und Genom-Analyse, oder können CTCs nur anreichern. Zudem sind die meisten Systeme nicht flexibel genug, um auf einen neuen *Workflow* umgestellt zu werden. Beispielsweise für die (Sub-) Kultivierung vitaler CTCs in x-Wellplatten oder die Isolation von auf Glasobjektträgern fixierte Zellen. Ebenfalls weisen andere Systeme hohe Kosten pro Probenprozessierung auf und/ oder benötigen hohe CTC-Zahlen für die Selektion sowie Isolation. Das CellCollector-System allerdings erlaubt in Relation zu anderen Systemen eine kostengünstige Probenprozessierung und Proben mit wenigen CTC-Zahlen ( $\leq 5$ ) sind ausreichend um daraus diese zu isolieren. Weiterhin gibt es Befürchtungen, über eine zu harsche Proben-Prozessierung (in Bezug zu Drücken und Scherkräften) bei anderen Systemen. Durch das CellCollector-System ist allerdings eine schonende Isolation gewährleistet. Zusätzlich ist eine für die Charakterisierung (Immunfluoreszenz) optimale Bildgebung vorhanden. Der CellCollector ermöglicht die anschließende *Downstream*-Applikation (z.B. Sequenzierung), als auch die nötige Flexibilität (CTC-Ablage in PCR-Tubes, auf Glasobjektträger oder x-Wellplatten). Das CellCollector-System benötigt allerdings, wie andere vergleichbare Systeme, eine Prä-Prozessierung der Blutproben um den hohen Leukozy-

tenhintergrund zu minimieren. Hierbei können Filtrationstechniken, Anreicherung von CTCs per immunomagnetischen Beads oder Leukozyten-Depletion (mittels immunomagnetischen Beads) verwendet werden. Deshalb wurde die CTC-Anreicherung durch das CellSearch-System vorgeschaltet.

Um das CellCelector-System zu etablieren wurden zunächst die CellCelector-Isolationsparameter getestet. Das CellCelector-System ermöglicht eine erfolgreiche Isolationsrate von 98%. Der Verlust von EpCAM<sup>pos</sup>-CTCs durch den Transfer der Proben aus der CellSearch-Kartusche lag bei max. 15-20%. Die erfolgreiche Ablage von CTCs lag bei 95%. Dadurch ist das CellCelector-System eine optimale technologische Grundlage zur Analyse von CTCs.

#### 4.8 CapG<sup>pos</sup>-CTCs

Mit Hilfe des CellCelector-Systems wurden die Zellen zunächst (Fluoreszenz-) Mikroskopiegestützt detektiert und anschließend mittels Aspiration über eine Glaskapillare aus dem fluiden Medium isoliert. Für die CapG-Färbung wurden die CTCs auf Haftobjektträger abgelegt. Es konnten von 13 Patienten insgesamt 59 CTCs isoliert und mit CapG Fluoreszenz-markiert werden, wobei eine Klassifikation nötig wurde. Folglich wurde anhand der Fluoreszenz-Intensität ein Scoring entwickelt, wobei die Basis (Score von 0) von CapG<sup>pos</sup>-Leukozyten ausging. Diese Einteilung der CapG-Expression auf CTCs wurde bisher nicht durchgeführt, ob allerdings hieraus eine klinische Relevanz abzuleiten ist, muss getestet werden, ebenso steht eine Korrelation zum Östrogen-Rezeptorstatus noch aus.

Die Daten wiesen eine hohe Abundanz des CapG-Proteins in CTCs nach. Nur in 6% der Fälle war eine CapG-Expression auf Leukozyten-Niveau auszumachen (Score 0). Die Majorität der mit CapG gefärbten CTCs konnten in ein Scoring von 1+ oder 2+ eingeteilt werden. Dies entsprach einem Scoring zwischen BT-20 und MDA-MB 231 Zellen. Die meisten CTCs wiesen einen über den von BT-20 liegenden CTCF-Wert (*corrected total cell fluorescence*) auf, wobei nur vereinzelt ein CTCF-Wert ähnlich dem der MDA-MB 231 Zellen oder höher gemessen wurde. Unter der Prämisse, dass mit Hilfe des CapG-Scorings eine Quantifizierung der Invasivität von zirkulierenden Tumorzellen möglich ist, wäre eine Einschätzung des Invasionspotentials von CTCs denkbar. Dadurch könnte CapG als prognostischer Marker geführt werden, wobei CTCs isoliert, einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CapG unterzogen werden und anschließend anhand des Scores in bestimmte Invasionsklassen eingeordnet werden könnten. Beispielsweise zeigen Subpopulationen von CTCs demnach ein geringeres Invasionspotential im Vergleich zu MDA-MB 231 Zellen und besitzen dadurch vielleicht ein geringeres Potential Metastasen auszubilden. Allerdings sind weitere Tests und statistischen Auswertungen notwendig, um CapG eindeutig als Invasions-Klassifikator zu definieren. Diese Methodik erscheint allerdings denkbar, da die Messungen (insbesondere bei den beiden Tumorzelllinien) sich als sehr robust heraus-

stellten.

Bezüglich der analysierten CTC-Population muss ergänzt werden, dass sämtliche isolierte und fürs Scoring genutzte CTCs EpCAM<sup>pos</sup> waren (aufgrund des CellSearch-Verfahrens). Folglich wäre eine Quantifizierung der CapG-Intensität auf EpCAM<sup>neg</sup>-Zellen sehr interessant, jedoch ist die Anreicherung solcher erheblich schwieriger.

#### 4.9 Machbarkeitsnachweis: Sequenzierung von isolierten CTCs

Im Rahmen der CellCelector-Etablierung sollte die genomische Charakterisierung als Downstream-Analyse folgen. Hierfür musste eine Machbarkeitsprüfung (*proof of concept*) durchgeführt werden und demonstrieren, dass nach Isolation und insbesondere nach einer zweiten Immunfluoreszenzfärbung (2. Isolation) genomische Analysen möglich sind. Durch dieses *proof of concept* sollten Prozess-bedingte DNA-Schäden, die Möglichkeit der zweiten Immunfluoreszenzfärbung und die technische Validierung der Sequenzierung Post-Isolationsprozess überprüft werden.

Die 7 isolierten, Immunfluoreszenz-gefärbten CTCs wurden per *whole genome amplification* (WGA) und anschließender Sequenzierung analysiert. Die rel. geringe Anzahl ist der starken Haftung an der Oberfläche der Haftobjektträger geschuldet. Weshalb für die zweite Isolation der Zellen eine direkte Interaktion mit der Glaskapillare, sprich Abschaben, erfolgen musste. Dies minimierte den Isolationserfolg drastisch (nicht systematisch gemessen, Annahmen können aber von 20%-Isolationserfolg ausgehen).

Alle 7 CapG-exprimierenden CTCs, die für eine WGA geeignet waren, wiesen konsistent SNPs, (*single nucleotide polymorphism*) in verschiedenen Genen auf (z.B.: *alk*, *pik3ca*, *tp53*). Allerdings hatten keine SNPs Auswirkungen auf die spätere Proteinsequenz.

Von besonderer Bedeutung war allerdings der Nachweis der PIK3CA Mutation (G→A, E545K), die zu einem Aminosäureaustausch, Glutaminsäure zu Lysin, führt. Es ist bekannt, dass Mutationen im PIK3CA-Signalweg mit Tumorentstehung und -progression assoziiert sind, wie z.B. im *triple-negative breast cancer* (TNBC), welches von hoher klinischer Relevanz ist[58][16]. Somit können CTCs als *liquid biopsy* möglicherweise auch zur Therapie-Findung genutzt werden.

CapG nimmt im PIK3CA-Signalweg über die Interaktion mit der p85-Untereinheit von PI3K eine funktionale Rolle ein[27] und CapG interferiert mit PI3K im Zellkern[64]. CapG könnte somit auch an der PIK3CA-abhängigen Tumorentwicklung eine Rollen spielen. Ob eine Korrelation zwischen einer PIK3CA-Mutation und der CapG-Expression von CTCs möglich ist, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Dafür ist die Fallzahl zu gering.

Insgesamt konnte mit der Sequenzierung von Einzelzellen (CTCs, Zellkulturzellen) post CellCelector eindrucksvoll demonstriert werden, dass SNP-Profil Erstellungen oder sogar der Nachweis von Punktmutationen möglich ist.



## 4.10 Schlussbetrachtung und Ausblick

Das *macrophage capping protein* (CapG) ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Eine aktuelle Übersicht in welchen Prozessen CapG beteiligt ist sowie welche Daten aus der Literatur für CapG vorliegen, ist (in englischer Sprache) in Abbildung 32 (Anhang, Seite 105) dargestellt<sup>19</sup>. Es wird deutlich, dass CapG innerhalb dieser komplexen Prozesse an der Regulation der Gen-Expression, der Invasivität oder bestimmten Protein-Interaktion beteiligt ist. Betrachtet man die Daten der vorliegenden Arbeit, können diese in bereits bestehende Informationen über CapG integriert werden (in Abb. 32 Rot dargestellt, Seite 105). Zudem könnten weitere Punkte innerhalb des Netzwerkes mit diesen Daten verbunden werden.

Es ist denkbar, dass in Tumorzellen durch (Über-) Aktivierungen von Proteinen, wie z.B. PDGFRA oder PIK3CA, eine CapG Überexpression ausgelöst wird. Die Tumorzelle würde u.a. ein Motilitätsprogramm aktivieren, bei dem auch CapG Einfluss auf die Gen-Expression ausübt. Vielleicht ist CapG ein Helfer-Protein im Kontext der Proliferation sowie Motilität und ist sowohl an der jeweiligen Funktion und Transkription (Aktivierung weitere Regulatoren für diese Abläufe) beteiligt.

Es ist anzunehmen, dass CapG in den meisten Zellen ubiquitär exprimiert wird, wobei die CapG-Expression anhand des *Scorings* in Tumorzellen bzw. CTCs über dem Niveau von Leukozyten einzuordnen ist. Offensichtlich ist, dass im Moment der Tumorentstehung sowie im Verlauf der Tumorzell-Proliferation, das CapG-Niveau einen Anstieg erfährt. Abbildung 31 stellt schematisch die CapG Effekte dar und fasst mögliche Mechanismen zusammen. Neben möglichen anderen Faktoren, ist die durch O<sub>2</sub>-Mangel induzierte HIF1 $\alpha$ -Expression und mechanischer Stress (z.B. Druck) eine der Ursachen für die CapG-Überexpression (Abb. 31, ①). Zudem könnten auch Punktmutationen in bestimmten Protein-Kinasen (PK), wie PIK3CA, PDGFRA oder ALK zu einer solchen Überexpression führen (Abb. 31 ①). Liegt eine CapG-Überexpression vor (Abb. 31, CapG in grün, ②), wird zum einen eine erhöhte Dynamik des Cytoskeletts ermöglicht (Abb. 31, ③) und zum anderen transloziert CapG in den Nucleus oder interagiert mit Proteinen der Transkription. Hier könnte es Einfluss auf die Gen-Expression ausüben, wobei unklar ist, ob CapG direkt oder indirekt an die DNA bindet (Abb. 31, indirekt über Transkriptionsfaktor in gelb und Co-Faktoren in rot, ④). Final werden Gene verstärkt exprimiert (u.A. FACIT- Collagene und GPNMB), welche mit Migration/ Invasivität und der Remodulation der ECM einhergehen (Abb. 31, ⑤ und ⑥). GPNMB war nicht auf Protein-Level nach CapG-Überexpression erhöht, jedoch ist durch eine stetig hohe (oder auch steigende) Konzentration von CapG, auch eine möglicherweise konstante Menge GPNMB vorhanden. Vielleicht bedarf es eines weiteren Faktors (Abb. 31, +X), welcher zur verstärkten

<sup>19</sup>kein Anspruch auf Vollständigkeit



## 5 Zusammenfassung

Eine erhöhte Expression des Actin-regulierenden *macrophage capping proteins* (CapG) ist an der Tumorinvasivität beteiligt, jedoch sind die Mechanismen unklar. Vorarbeiten bestätigten die Korrelation zwischen CapG und Invasivität in Zelllinien. Hier konnte diese Invasivität ebenfalls auf Tumorproben des Mammakarzinoms gezeigt werden.

Bisher ist nur die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation der Cytoskelettkomponente Actin von CapG näher charakterisiert und demnach ist CapG im Cytoplasma lokalisiert. Allerdings ist CapG auch im Zellkern nachweisbar, wobei die Funktion, welche CapG im Zellkern ausübt, nicht bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war es, CapG im Hinblick auf dessen Induktion der Invasivität funktional zu charakterisieren und die Subpopulation von Tumorzellen (zirkulierende Tumorzellen, CTCs), die ein hohes Potential an Invasivität besitzen, auf die CapG-Expression hin zu untersuchen. Es wurde anhand von Tumormaterial CapG als Tumorinvasionsmarker bestätigt. Hier wiesen 28% (n=78) der Tumorproben eine hohe Expression auf, wobei dies mit dem M1-Status und ER<sup>neg</sup>-Status signifikant korrelierte ( $p \leq 0,05$ ). Eine ROC-Analyse wies CapG, bezogen auf den M1-Status, mit einer Vorhersagekraft von 40% als tendenziellen Klassifikator aus. Aufgrund der Kern-Lokalisation von CapG wurden in Vorarbeiten, mit einem bereits etablierten Zellkulturmodell (MDA-MB 231 und BT-20), Microarrays durchgeführt. Eine erneute bioinformatische Analyse und der direkte Vergleich mit dem Expressionsprofil aus Tumorgewebe ergab eine Korrelation der Gen-Expression von *gpnmb*, *nrp1*, *lox12*, *trim46*, *col16a1* (Überexpression zusammen mit CapG) und *zdhhc11* sowie *kiaa1467* (verminderte Expression bei CapG-Überexpression) mit CapG. Das zur Zeit in einer klinischen Phase (Stufe II) in Testung gegen ossäre Metastasen (Mammakarzinom) befindliche GPNMB-Protein konnte in Validierungsexperimenten als CapG-abhängig reguliertes Protein bestätigt werden. GO-Analysen der Microarrays wiesen auch auf eine Beteiligung von CapG bei Termini der extrazellulären Matrix, Zelladhäsion und Ossifikation hin. Weiterhin erfolgte eine Co-Immünpräzipitation mit nachgeschalteter Massenspektrometrie um über das CapG-Interaktom die Mechanismen des CapG Einflusses auf die Transkription aufzuklären. Es konnten 154 potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, welche im Vergleich zu einer Interaktom-Studie aus der Literatur in 36 potentielle Interaktionspartner spezifiziert werden konnte. Eine Analyse über funktionale Annotation der Proteine ergab, dass die Interaktionspartner an der Actin-Regulation, der mRNA-Prozessierung, mRNA-Splicing, Protein-DNA-Komplexierung, DNA-Packaging und der Regulation der Apoptose beteiligt sind.

Zum Nachweis von CapG auf CTCs konnte für die notwendige Isolation von CTCs eine automatisierte Mikromanipulationsanwendung (CellCelector) etabliert werden. CTCs wurden wie folgt klassifiziert: DAPI<sup>pos</sup>, Cytokeratin<sup>pos</sup> und CD45<sup>neg</sup>.

Die optimierten Isolationsparameter, wie Aspirationsvolumen sowie -höhe des CellCelec-

tors wurden bestimmt. Nach CellSearch Analyse wurden 97% der SKBR3 Zellen und 95% der CTCs nach CellCelector-Scan detektiert. Es wurden 87% der von CellSearch-klassifizierten CTCs detektiert und isoliert. Eine Regressionsanalyse des Wiederfindungs- und Isolationserfolges von CTCs aus Patientenproben (n=20) im Vergleich zum CellSearch-System ergab  $R^2=0,98$ .

CTCs wurden auf Haftobjektträger abgelegt und für CapG gefärbt, quantifiziert, anschließend erneut isoliert und in PCR-Tubes transferiert. Es konnte ein CapG-Score (von 0 bis 3) auf den CTCs etabliert werden, demnach sind von 59 analysierten CTCs 40% schwach CapG positiv (Score 1+), 37% stark CapG positiv (Score 2+), 15% wiesen einen sehr starken CapG-Gehalt auf (Score 3+).

Es wurde nach Mikromanipulation die Sequenzierung von CTCs nach *Whole Genome Amplification* (WGA) demonstriert. In einer Patientin mit 5 CTCs wurde eine PIK3CA-Mutation nachgewiesen (G→A, E545K).

CapG ist involviert in diverse für die Metastasierung relevante Signalwege und Prozesse. CapG kann somit als Invasions- und Tumormarker auch für CTCs Verwendung finden und ist möglicherweise ein Prädiktor für die Metastasierung.

## 6 Abstract

Increased expression of macrophage capping protein (CapG) is involved in tumor invasion. However, the mechanisms are unclear. Previous work verified that increased CapG expression correlates with increased invasion potential in cell lines. Here induced invasion potential after CapG over expression was also shown in breast cancer samples.

Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of actin is the only characterized action of CapG performing its function in the cytoplasm. However, CapG is also located in the nucleus, but the functionality is not clear. Aim of this work was to characterize CapG in regard of its potential to induce invasion as well as to verify CapG protein expression on circulating tumor cells (CTCs), because of their high potential for migration and invasion.

CapG expression was determined on 78 breast cancer samples showing in 28% a high CapG expression and it correlates significantly with M1 status as well as ER<sup>neg</sup> status ( $p \leq 0,05$ ). CapG was tested to be a classifier for M1 using a ROC analysis (right-positiv-rate of 40%). Due to the fact of CapG presence in the nucleus microarrays were performed previously. Bioinformatic analysis compared directly with a sample subset from tumor tissue revealed 81 differential expressed genes: *gpnmb*, *nrp1*, *loxl2*, *trim46*, *col16a1* (co-regulated with CapG) and *zdhhc11* as well as *kiaa1467* (contrary expressed to CapG). GPNMB, currently novel target in a clinical trail (phase II) against bone marrow metastasis (breast cancer), was validated to be CapG-dependent expressed.

GO analysis of the microarray results revealed CapG-dependend regulated genes playing roles in extra cellular matrix, cell adhesion or ossification. Moreover, analysis of the

CapG interactome via co-immunoprecipitation and massspectrometry revealed a list of 154 potential interaction candidates and 36 of them are also listed as novel interaction partners elsewhere. Annotation analysis of these proteins showed, that they are taking part in actin regulation, mRNA processing, mRNA splicing, protein-DNA complexation, DNA packaging and regulation of apoptosis.

To verify CapG expression in CTCs the automated micromanipulation technology (CellCelector) was established. CTCs are classified as DAPI<sup>pos</sup>, Cytokeratin<sup>pos</sup> and CD45<sup>neg</sup> cells.

The optimized isolation parameters using the CellCelector were determined After CellSearch analysis 97% of spiked SKBR3 cells and 95% of patient CTCs were detected by rescanning using the CellCelector system. A regression analysis of recovery and isolation success using patient samples (n=20) revealed:  $R^2=0,98$ . After transfer of the content out of the CellSearch cartridge to chamber slides on a magnet adapter 87% of CellSearch classified CTCs could be detected and isolated using the CellCelector following transfer to glass slides. Here they were stained for CapG and the staining was quantified using an established scoring system (CapG scoring from 0 to 3+). In total CapG protein expression was quantified on 59 CTCs. CapG<sup>pos</sup>-CTCs showed in 40% weak CapG signal (score 1+), 37% showed a strong CapG signal (score 2+) and 15% showed a very strong signal (score 3+).

Sequencing after micromanipulation of CTCs were demonstrated. Next, CTCs were processed for *Whole Genome Amplification* (WGA). Quality of WGA products was checked by the Ampli1 - QC protocol and genomic analyses (Panel-Sequencing) were performed successfully. One patient with 5 CTCs showed PIK3CA-mutation (G→A, E545K)

CapG is involved in various signalling pathways and processes necessary for successful metastatic spreading. CapG is a potent invasion and tumor marker and could serve as a predictor of potential to metastasis.

## 7 Literatur

### Literatur

- [1] Samir M. Abdelmagid, Mary F. Barbe, Israel Arango-Hisijara, Thomas A. Owen, Steven N. Popoff, and Fayez F. Safadi. Osteoactivin acts as downstream mediator of BMP-2 effects on osteoblast function. *Journal of Cellular Physiology*, 210(1):26–37, 2007.
- [2] Samir M. Abdelmagid, Mary F. Barbe, Michael Hadjiargyrou, Thomas A. Owen, Roshanak Razmpour, Saqib Rehman, Steven N. Popoff, and Fayez F. Safadi. Temporal and spatial expression of osteoactivin during fracture repair. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(2):295–309, 2010.

- 
- [3] WJ Allard, J Matera, MC Miller, M Repoller, MC Connelly, C Rao, AGJ Tibbe, JW Uhr, and LWMM Terstappen. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin Cancer Res*, 10:6897–6904, 2004.
- [4] PS Amenta, S Hadad, MT Lee, N Barnard, D Li, and JC Myers. Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast. *J Pathol*, 199(3):298–308, 2003.
- [5] PS Amenta, S Hadad, MT Lee, N Barnard, D Li, and JC Myers. Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast. *J Pathol*, 199:298–308, 2003.
- [6] T Ashworth. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*, 14:146–149, 1869.
- [7] EM Bahassi, S Karyala, CR Tomlinson, MA Sartor, M Medyedovic, and RF Hennigan. Critical regulation of genes for tumor cell migration by AP-1. *Clin Exp Metastasis*, 21:293–304, 2004.
- [8] Ana Barradas and Leon Terstappen. Towards the Biological Understanding of CTC: Capture Technologies, Definitions and Potential to Create Metastasis. *Cancers*, 5(4):1619–1642, 2013.
- [9] R Bauer, S Ratzinger, L Wales, A Bosserhoff, V Senner, J Grifka, and S Grässel. Inhibition of Collagen XVI Expression Reduces Glioma Cell Invasiveness. *Cell Physiol Biochem*, 27:217–226, 2011.
- [10] M Bendre, D Gaddy, RW Nicholas, and LJ Suva. Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTHrP. *Clin Orthop Relat Res*, 415:39–45, 2003.
- [11] Y Benjamini and Y Hochberg. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B*, 57:289–300, 1995.
- [12] G. Berx and F. van Roy. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6):a003129, 2009.
- [13] BM Bolstad, RA Irizarry, M Astrand, and TP Speed. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19(2):185–193, 2003.
- [14] MM Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- [15] Andrew Burgess, Suzanne Vigneron, Estelle Brioudes, Jean-Claude Labbé, Thierry Lorca, and Anna Castro. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects

- due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28):12564–12569, 2010.
- [16] Ian G. Campbell, Sarah E. Russell, Choong, David Y H, Karen G. Montgomery, Marianne L. Ciavarella, Hooi, Christine S F, Briony E. Cristiano, Richard B. Pearson, and Wayne A. Phillips. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*, 64(21):7678–7681, 2004.
- [17] U Cavallaro and G Cristofori. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2):118–132, 2004.
- [18] M Chen, M Sinha, BA Luxon, AR Bresnick, and KL O'Connor. Integrin alpha6beta4 controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem*, 284(3):1484–1494, 2009.
- [19] J Condeelis, RH Singer, and JE Segall. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21:695–718, 2005.
- [20] John Condeelis and Jeffrey E. Segall. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, 3(12):921–930, 2003.
- [21] Coumans, F. A. W., S. T. Ligthart, J. W. Uhr, and Terstappen, L. W. M. M. Challenges in the Enumeration and Phenotyping of CTC. *Clinical Cancer Research*, 18(20):5711–5718, 2012.
- [22] Cristofanilli Massimo, Budd G. Thomas, Ellis Matthew J., Stopeck Alison, Matera Jeri, Miller M. Craig, Reuben James M., Doyle Gerald V., Allard W. Jeffrey, Terstappen Leon W.M.M., Hayes Daniel F. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J med*, 351:781–791, 2004.
- [23] GA Dabiri, CL Young, J Rosenbloom, and FS Southwick. Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. A unique member of the gelsolin/villin family expressed primarily in macrophages. *J Biol Chem*, 267(23):16545–16552, 1992.
- [24] E. Dahl, A Sadr-Nabavi, E Klopocki, B Betz, S Grube, R Kreutzfeld, M Himmelfarb, HX An, S Gelling, I Klamann, B Hinzmann, G Kristiansen, R Grützmann, R Kuner, B Petschke, K Rhiem, K Wiechen, C Sers, O Wiestler, A Schneider, H Höfler, J Nährig, M Dietel, R Schäfer, A Rosenthal, R Schmutzler, M Dürst, A Meindl, and D Niederacher. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *J Pathol*, 205(1):21–28, 2005.
- [25] M. A. Davies and Y. Samuels. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41):5545–5555, 2010.
- [26] Shaheenah Dawood and Massimo Cristofanilli. Using circulating tumor cells to guide therapy in breast cancer: could this replace biopsies? *Pharmacogenomics*, 16(7):669–672, 2015.

- 
- [27] V De Corte, K van Impe, E Bruyneel, C Boucherie, M Mareel, J Vandekerckhove, and J Gettemans. Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci*, 117:5283–5292, 2004.
- [28] CG dos Remedios, D Chhabra, M Kekic, IV Dedova, M Tsubakihara, DA Berry, and NJ Nosworthy. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol Rev*, 83:33–473, 2003.
- [29] JA Eble, A Kassner, S Niland, M Morgelin, J Grifka, and S Grässel. Collagen XVI harbors an integrin alpha1 beta1 recognition site in its C-terminal domains. *J Biol Chem*, 281:25745–25756, 2006.
- [30] Hadi Esmaeilsabzali, Timothy V. Beischlag, Michael E. Cox, Ash M. Parameswaran, and Edward J. Park. Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods. *Biotechnology advances*, 31(7):1063–1084, 2013.
- [31] J Ferlay, HR Shin, F Bray, D Forman, C Mathers, and DM Parkin. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: BOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127:2893–2917, 2010.
- [32] F Forozan, R Veldman, CA Ammerman, NZ Parsa, A Kallioniemi, OP Kallioniemi, and SP Ethier. Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 81(8), 1999.
- [33] P Friedl and K Wolf. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3:362–374, 2003.
- [34] Olivier Gavet and Jonathon Pines. Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis. *Developmental Cell*, 18(4):533–543, 2010.
- [35] J Gettemans, K van Impe, V Delanote, T Hubert, J Vandekerckhove, and V De Corte. Nuclear Actin Binding Proteins as Modulators of Gene Transcription. *Traffic*, 6:847–857, 2005.
- [36] M Giuliano, A Giordano, S Jackson, U De Giorgi, M Mego, EN Cohen, H Gao, S Anfossi, BC Handy, NT Ueno, RH Alvarez, S De Placido, V Valero, GN Hortibagyi, JM Reuben, and M Cristofanilli. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res*, 16, 2014.
- [37] J. Glaser, Neumann, M. H. D., Qi Mei, B. Betz, N. Seier, I. Beyer, T. Fehm, H. Neubauer, D. Niederacher, and M. C. Fleisch. Macrophage Capping Protein CapG Is a Putative Oncogene Involved in Migration and Invasiveness in Ovarian Carcinoma. *BioMed Research International*, 2014(5):1–8, 2014.
- [38] LA Gordon, KT Mulligan, H Maxwell-Jones, M Adams, RA Walker, and JL Jones. Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. *Int J Cancer*, 106:8–16, 2003.

- 
- [39] JM Gozgit, BT Pentecost, SA Marconi, CN Otis, C Wu, and KF Arcaro. Use of an Aggressive MCF-7 Cell Line Variant, TMX2-28, to Study Cell Invasion in Breast Cancer. *Mol Cancer Res*, 4(12):905–913, 2006.
- [40] Alan Hall. The cytoskeleton and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2):5–14, 2009.
- [41] D Hanahan and RA Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144:646–674, 2011.
- [42] W Hofmann, B Reichart, A Ewald, E Müller, I Schmitt, RH Stauber, F Lottspeich, BM Jockusch, U Scheer, J Hauber, and M Dabauvalle. Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (RRE)- and Constitutive Transport Element (CTE)-containing Retroviral RNAs: An Unexpected Role for Actin. *J Cell Biol*, 152(5):895–910, 2001.
- [43] D W Huang, B T Sherman, and R A Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1):44–57, 2009.
- [44] T Hubert, K van Impe, J Vandekerckhove, and J Gettemans. The F-actin filament capping protein CapG is a bona fide nucleolar protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 377:699–704, 2008.
- [45] T Hubert, K van Impe, J Vandekerckhove, and J Gettemans. The actin-capping protein CapG localizes to microtubule-dependent organelles during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*, 380:166–170, 2009.
- [46] RO Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, 2002.
- [47] Y Izu, M Sun, D Zwolanek, G Veit, V Williams, B Cha, KJ Jepsen, M Koch, and DE Birk. Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J Cell Biol*, 193(6):1115–1130, 2011.
- [48] Janssen Diagnostics, LLC, 2015. THE GOLD STANDARD: The first and only actionable test for detecting CTCs in cancer patients, 2015.
- [49] KW Jeong, YH Lee, and MR Stallcup. Recruitment of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex to Steroid Hormone-regulated Promoters by Nuclear Receptor Coactivator Flightless-1. *J Biol Chem*, 284(43):29298–29309, 2009.
- [50] PA Johnston, FX Yu, GA Reynolds, HL Yin, CR Moonmaw, CA Slaughter, and TC Südhof. Purification and Expression of gCap39. An intracellular and secreted Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent actin-binding protein enriched in mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*, 265(29):17946–17952, 1990.

- 
- [51] S Kang, MJ Kim, H An, BG Kim, YP Choi, KS Kang, MQ Gao, H Park, HJ Na, HK Kim, AR Yun, DS Kim, and NH Cho. Proteomic Molecular Portrait of Interface Zone in Breast Cancer. *J Proteom Res*, 9:5638–5645, 2010.
- [52] GS Karagiannis, IP Petraki, P Saraon, N Musrap, A Dimitromanolakis, and EP Diamandis. Proteomic Signatures of the Desmoplastic Invasion Front Reveal Collagen Type XII as a Marker of Myofibroblastic Differentiation During Colorectal Cancer Metastasis. *Oncotarget*, 3:267–285, 2012.
- [53] L Kass, JT Eler, M Dembo, and VM Weaver. Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 39:1987–1994, 2007.
- [54] CH Keir and LT Vahdat. The use of an antibody drug conjugate, glembatumumab vedotin (CDX-011), for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 12(2):259–263, 2012.
- [55] Kyobum Kim, Kwan Hyi Lee, Jongmin Lee, and Jonghoon Choi. Overview of current standpoints in profiling of circulating tumor cells. *Archives of pharmacal research*, 37(1):88–95, 2014.
- [56] K Kimura, H Ojima, K Kubota, M Sakumoto, N Yukiko, T Tomonaga, T Kosuge, and T Kondo. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. *J Proteomics*, 2012.
- [57] Jonathan D. King, Benjamin P. Casavant, and Joshua M. Lang. Rapid translation of circulating tumor cell biomarkers into clinical practice: technology development, clinical needs and regulatory requirements. *Lab on a chip*, 14(1):24–31, 2014.
- [58] Mark Kriegsmann, Volker Endris, Thomas Wolf, Nicole Pfarr, Albrecht Stenzinger, Sibylle Loibl, Carsten Denkert, Andreas Schneeweiss, Jan Budczies, Peter Sinn, and Wilko Weichert. Mutational profiles in triple-negative breast cancer defined by ultradeep multi-gene sequencing show high rates of PI3K pathway alterations and clinically relevant entity subgroup specific differences. *Oncotarget*, 5(20):9952–9965, 2014.
- [59] CT Kuan, K Wakiya, JM Dowell, JE 2nd Herndon, DA Reardon, MW Graner, GJ Riggins, CJ Wikstrand, and DD Bigner. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, a potential molecular therapeutic target in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, 12(7):1970–1982, 2006.
- [60] UK Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [61] A Lal, AE Lash, SF Altschul, V Velculescu, L Zhang, RE McLendon, and et al. A Public Database for Gene Expression in Human Cancers. *Cancer Res*, 59:5403–5407, 1999.

- [62] YH Lee, HD Campbell, and MR Stallcup. Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol*, 24:2103–2117, 2004.
- [63] Stacie K. Loftus, Anthony Antonellis, Ivana Matera, Gabriel Renaud, Laura L. Baxter, Duncan Reid, Tyra G. Wolfsberg, Yidong Chen, ChenWei Wang, Megana K. Prasad, Seneca L. Bessling, Andrew S. McCallion, Eric D. Green, Dorothy C. Bennett, and William J. Pavan. GpnmB is a melanoblast-expressed, MITF-dependent gene. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(1):99–110, 2009.
- [64] PJ Lu, AL Hsu, DS Wang, HY Yan, HL Yin, and CS Chen. Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochemistry*, 37:5738–5745, 1990.
- [65] Antonio Marchetti, Maela Del Grammastro, Lara Felicioni, Sara Malatesta, Giampaolo Filice, Irene Centi, Tommaso de Pas, Armando Santoro, Antonio Chella, Alba Ariela Brandes, Paola Venturino, Franco Cuccurullo, Lucio Crinò, Fiamma Buttitta, and Hiromu Suzuki. Assessment of EGFR Mutations in Circulating Tumor Cell Preparations from NSCLC Patients by Next Generation Sequencing: Toward a Real-Time Liquid Biopsy for Treatment. *PLoS ONE*, 9(8):e103883, 2014.
- [66] N Morofuji, H Ojima, H Onaya, T Okusaka, K Shimada, Y Sakamoto, M Esaki, S Nara, T Kosuge, D Asahina, M Ushigome, N Hiraoka, M Nagino, and T Kondo. Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J Proteomics*, 75(5):1577–1589, 2012.
- [67] National Cancer Institute. NCI Drug Dictionary - Glembatumumab vedotin, 2015.
- [68] RM Neve, K Chin, J Fridlyand, J Yeh, FL Baehner, T Fevr, L Clark, N Bayani, JP Coppe, F Tong, T Speed, PT Spellman, S DeVries, A Lapuk, NJ Wang, WL Kuo, JL Stilwell, D Pinkel, DG Albertson, FM Waldman, F McCormick, RB Dickson, MD Johnson, M Lippman, S Ethier, Adi Gazdar, and JW Gray. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10:515–527, 2006.
- [69] DX Nguyen, PD Bos, and J Massagué. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 9:274–284, 2009.
- [70] A Nurnberg, T Kitzing, and R Grosse. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer*, 11:177–187, 2011.
- [71] K Onoda, FX Yu, and HL Yin. gCap39 is a nuclear and cytoplasmic protein. *Cell Motil Cytoskeleton*, 26(3):227–238, 1993.
- [72] K Partheen, K Levan, L Osterberg, I Claesson, and G Fallenius. Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer*, 123:2130–2137, 2008.

- 
- [73] MJ Paszek and VM Weaver. The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 9:325–342, 2004.
- [74] C Pellieux, A Desgeorges, CH Pigeon, C Chambaz, H Yin, and et al. Cap G, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress. *J Biol Chem*, 278:29136–29144, 2003.
- [75] KN Pestonjamas, RK Pope, JD Wulfkühle, and EJ Luna. Supervillin (p205): a novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J Cell Biol*, 139(5):1255–1269, 1997.
- [76] MW Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), 2001.
- [77] A Pierce, RD Unwin, CA Evans, S Griffiths, L Carney, L Zhang, E Jaworska, CF Lee, D Blinco, MJ Okoniewski, CJ Miller, DA Bitton, E Spooncer, and AD Whetton. Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases. *Mol Cell Proteomics*, 7(5):853–863, 2008.
- [78] GC Prendergast and EB Ziff. Mbh1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization. *EMBO J*, 10:157–166, 1991.
- [79] JT Price, MT Bonovich, EC Kohn, and DR Welch. The Biochemistry of Cancer Dissemination. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2):175–253, 1997.
- [80] PP Provenzano, DR Inman, KW Eliceiri, JG Knittel, L Yan, CT Rueden, JG White, and PJ Keely. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine*, 6(11), 2008.
- [81] X Qian, E Mills, M Torgov, WJ LaRochelle, and M Jeffers. Pharmacologically enhanced expression of GPNMB increases the sensitivity of melanoma cells to the CR011-vcMMAE antibody-drug conjugate. *Mol Oncol*, 2(1):81–93, 2008.
- [82] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>*, 2013.
- [83] OJ Rando, TH Chi, and GR Crabtree. Second messenger control of chromatin remodeling. *Nat Struct Biol*, 10:81–83, 2003.
- [84] S Ratzinger, S Grässel, A Dowejko, TE Reichert, and RJ Bauer. Induction of type XVI collagen expression facilitates proliferation of oral cancer cells. *Matrix Biol*, 30:118–125, 2011.
- [85] M Renz, B Betz, D Niederacher, HG Bender, and J Langowski. Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG. *Int J Cancer*, 122:1476–1482, 2008.

- 
- [86] M Renz and J Langowski. Dynamics of the CapG actin-binding protein in the cell nucleus studied by FRAP and FCS. *Chromosome Res*, 16:427–437, 2008.
- [87] Vera M. Ripoll, Nicholas A. Meadows, Liza-Jane Raggatt, Ming K. Chang, Allison R. Pettit, Alan I. Cassady, and David A. Hume. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene*, 413(1-2):32–41, 2008.
- [88] VM Ripoll, KM Irvine, T Ravasi, MJ Sweet, and DA Hume. Gpnmb Is Induced in Macrophages by IFN-g and Lipopolysaccharide and Acts as a Feedback Regulator of Proinflammatory Responses. *J Immunol*, 178:6557–6566, 2007.
- [89] Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010, 2013.
- [90] AA Rose, MG Annis, Z Dong, F Pepin, M Hallett, M Park, and PM Siegel. ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS ONE*, 5(8), 2010.
- [91] AA Rose, AA Grosset, Z Dong, C Russo, PA MacDonald, NR Bertos, Y St-Pierre, R Simantov, M Hallett, M Park, L Gaboury, and PM Siegel. Glycoprotein Nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 16(7):2147–2156, 2010.
- [92] AA Rose, F Pepin, C Russo, JE Abou Kahlil, M Hallett, and PM Siegel. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol Cancer Res*, 5(10):1001–1014, 2007.
- [93] AA Ross, BW Cooper, HM Lazarus, W Mackay, TJ Moss, N Ciobanu, MS Tallman, MJ Kennedy, NE Davidson, D Sweet, C Winter, L Akward, J Jansen, E Copelan, RC Meagher, RH Herzig, TR Klumpp, DG Kahn, and NE Warner. Detection and Viability of Tumor Cells in Peripheral Blood Stem Cell Collections From Breast Cancer Patients Using Immunocytochemical and Clonogenic Assay Techniques. *Blood J*, 82(9):2605–2610, 1993.
- [94] ER Sampson, SY Yeh, HC Chang, MY Tsai, X Wang, HJ Ting, and C Chang. Identification and characterization of androgen receptor associated coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Regul Homeost Agents*, 15(2):123–129, 2001.
- [95] Kae Sato. Microdevice in Cellular Pathology: Microfluidic Platforms for Fluorescence in situ Hybridization and Analysis of Circulating Tumor Cells. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 31(9):867–873, 2015.
- [96] Carolin Schleithoff. *Einfluss von CapG auf die Expressionsprofile von Mammakarzinom-Zellen*. PhD thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2010.
- [97] A Schlicker, FS Domingues, J Rahmenführer, and T Lengauer. A new measure for functional similarity of gene products based on Gene Ontology. *BMC Bioinformatics*, 7(1):302, 2006.

- 
- [98] AO Schmitt, T Specht, G Beckmann, E Dahl, CP Pilarsky, B Hinzmann, and A Rosenthal. Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissue. *Nucleic Acids Res*, 27(21):4251–4260, 1999.
- [99] CS Schuetz, M Bonin, SE Clare, KN Nieselt, K Sotlar, M Walter, T Fehm, E Solomayer, O Riess, D Wallwiener, R Kurek, and HJ Neubauer. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res*, 66(10):5278–5286, 2006.
- [100] Nicole Seier. *Analyse der Modifikationen von CapG und ihre Bedeutung für die Metastasierung des Mammakarzinoms*. PhD thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2009.
- [101] F Shao, R Zang, L Dong, and K Ying. Overexpression of gelsolin-like actin-capping protein is associated with progression of lung adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med*, 225:95–101, 2011.
- [102] P Silacci, L Mazzolai, C Gauci, N Stergiopoulos, HL Yin, and D Hayoz. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, 61:2614–2623, 2004.
- [103] MJ Silverstein, MD Lagios, PH Craig, JR Waisman, BS Lewinsky, WJ Colburn, and DN Poller. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Cell*, 77(11):2267–2274, 1996.
- [104] T Sing, O Sander, N Beerenwinkel, and T Lengauer. R-Package: ROCR: Visualizing the performance of scoring classifiers, 2013-05-16 17:20:32.
- [105] CL Sommers, SW Byers, EW Thompson, JA Torri, and ER Gelmann. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 31:325–335, 1994.
- [106] S Southwick and MJ DiNubile. Rabbit alveolar macrophages contain a Ca<sup>2+</sup>(+)-sensitive, 41.000 Dalton protein which reversibly blocks the "barbed" ends of actin filaments but does not sever them. *J Biol Chem*, 261:14191–14195, 1986.
- [107] Statistisches Bundesamt Deutschland. Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis), 2012.
- [108] DJ Steger, ES Haswell, AL Miller, RS Wenthe, and EK O'Shea. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science*, 299:114–116, 2003.
- [109] R. P. Stevenson, D. Veltman, and L. M. Machesky. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(5):1073–1079, 2012.
- [110] F Supek, M Bošnjak, N Škunca, T Šmuc, and C Gibas. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE*, 6(7):e21800, 2011.

- 
- [111] Joost F. Swennenhuis and Leon Terstappen. Sample Preparation Methods Following Cell-Search Approach Compatible of Single-Cell Whole-Genome Amplification: An Overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1347:57–67, 2015.
- [112] J. E. Talmadge and I. J. Fidler. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70(14):5649–5669, 2010.
- [113] C Thompson, FJ Ashcroft, S Patel, G Saraga, D Vimalachandran, WC Prime, and et al. Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility. *Gut*, 56:95–106, 2007.
- [114] HJ Ting, S Yeh, K Nishimura, and C Chang. Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:661–666, 2000.
- [115] S Tonack, S Patel, M Jalali, T Nedjadi, RE Jenkins, C Goldring, and et al. Tetracycline-inducible protein expression in pancreatic cancer cells: Effects of CapG overexpression. *World J Gastroenterol*, 17:1947–1960, 2011.
- [116] KF Tse, M Jeffers, VA Pollack, DA McCabe, ML Shadish, NV Khramtsov, CS Hackett, SG Shenoy, B Kuang, FL Boldog, JR MacDougall, L Rastelli, J Herrmann, M Gallo, G Gazit-Bornstein, PD Senter, DL Meyer, HS Lichenstein, and WJ LaRochelle. CR011, a fully human monoclonal antibody-auristatin E conjugate, for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res*, 12(4):1373–1382, 2006.
- [117] PR van Ginkel, RL Gee, TM Walker, DN Hu, CW Heizmann, and AS Polans. The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta*, 1448:290–297, 1998.
- [118] K van Impe, J Bethuyne, S Cool, F Impens, D Ruano-Gallego, O De Wever, B Vannloo, M van Troys, K Lambein, C Boucherie, E Martnes, O Zwaenepoel, G Hassanzadeh-Ghassabeh, J Vandekerckhove, K Gevaert, L Ángel Fernández, NN Sanders, and J Gettemans. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer. *Breast Cancer Res*, 15, 2013.
- [119] K van Impe, V De Corte, L Eichinger, E Bruyneel, M Mareel, J Vandekerekhove, and J Gettemans. The Nucleo-cytoplasmic Actin-binding Protein CapG Lacks a Nuclear Export Sequence Present in Structurally Related Proteins. *J Biol Chem*, 278:17945–17952, 2003.
- [120] K van Impe, T Hubert, V De Corte, B Vannloo, C Boucherie, J Vandekerekhove, and J Gettemans. A New Role for Nuclear Transport Factor 2 and Ran: Nuclear Import of CapG. *Traffic*, 9:695–707, 2008.
- [121] Katrien Van Impe, Jonas Bethuyne, Steven Cool, Francis Impens, David Ruano-Gallego, Oliver De Wever, Berlinda Vanloo, Marleen Van Troys, Kathleen Lambein, Ciska Boucherie, Evelien Martens, Olivier Zwaenepoel, Gholamreza Hassanzadeh-Ghassabeh, Joël Vandekerckhove, Kris Gevaert, Luis Ángel-Fernández, Niek N Sanders, and Jan Gettemans. A

- nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*, 15:1–15, 2013.
- [122] Lixue Wang, Waseem Asghar, Utkan Demirci, and Yuan Wan. Nanostructured substrates for isolation of circulating tumor cells. *Nano today*, 8(4):347–387, 2013.
- [123] Britta Weigelt, Johannes L. Peterse, and van't Veer, Laura J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8):591–602, 2005.
- [124] Sanne de Wit, Guus van Dalum, Lenferink, Aufried T. M., Tibbe, Arjan G. J., Hiltermann, T. Jeroen N., Groen, Harry J. M., van Rijn, Cees J. M., and Terstappen, Leon W. M. M. The detection of EpCAM+ and EpCAM- circulating tumor cells. *Scientific Reports*, 5:12270, 2015.
- [125] JH Wu, XY Tian, and CY Hao. The significance of a group of molecular markers and clinicopathological factors in identifying colorectal liver metastasis. *Hepatogastroenterology*, 58(109):1182–1188, 2011.
- [126] JD Wulfkühle, IE Donina, NH Stark, RK Pope, KN Pestonjamas, ML Niswonger, and et al. Domain analysis of supervillin, an F-actin bundling plasma membrane protein with functional nuclear localization signals. *J Cell Sci*, 112:2125–2136, 1999.
- [127] FX Yu, PA Johnston, TC Südhof, and HL Yin. gCap39, a Calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein. *Science*, 250:1413–1415, 1990.
- [128] WY Zhu, YY Hunag, XG Liu, JY He, DD Chen, F Zheng, JH Zhou, and YK Zhang. Prognostic evaluation of CapG, gelsolin, P-gp, GST1, and Topo-II proteins in non-small cell lung cancer. *Anat Rec*, 295(2):208–214, 2012.

## 8 Anhang

### 8.1 Potentielle CapG-Interaktionspartner

**Tabelle 10:** Potentielle CapG-Interaktionspartner

Nr.	Gename	Uniprot-Acc.	Beschreibung
0	CapG	P40121	Macrophage-capping protein
1	ACOX3	O15254	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3
2	RPS3	P23396	40S ribosomal protein S3
3	GNB2L1	P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
4	TUBB	P07437	Tubulin beta chain

...

**Tabelle 10:** Potentielle CapG-Interaktionspartner (*Fortsetzung*)

Nr.	Genname	Uniprot-Acc.	Beschreibung
5	ACTN4	O43707	Alpha-actinin-4
6	TUBB4B	P68371	Tubulin beta-4B chain
7	ACTN1	P12814	Alpha-actinin-1
8	RPL22	P35268	60S ribosomal protein L22
9	EHD1	Q9H4M9	EH domain-containing protein 1
10	FLNB	O75369	Filamin-B
11	PLEC	Q15149	Plectin
12	RPLP0	P05388	60S acidic ribosomal protein P0
13	FLNA	P21333	Filamin-A
14	EIF4A1	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I
15	MYH9	P35579	Myosin-9
16	CLTC	Q00610	Clathrin heavy chain 1
17	RPL12	P30050	60S ribosomal protein L12
18	SPTAN1	Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
19	MYO1C	O00159	Unconventional myosin-Ic
20	SPTBN1	Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1
21	SERPINH1	P50454	Serpin H1
22	ILF2	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2
23	MYL12A	P19105	Myosin regulatory light chain 12A
24	COPA	P53621	Coatomer subunit alpha
25	RPL10A	P62906	60S ribosomal protein L10a
26	DDX39A	O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A
27	ACTR3	P61158	Actin-related protein 3
28	UQCRC2	P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
29	TUBB6	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain
30	ACTC1	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1
31	MPRIP	Q6WCQ1	Myosin phosphatase Rho-interacting protein
32	HIST1H4A	P62805	Histone H4
33	CAPZA1	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1
34	PTBP1	P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1
35	LMNA	P02545	Prelamin-A/C
36	ARPC4	P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4
37	CDK1	P06493	Cyclin-dependent kinase 1
38	EIF2S3	P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3

...

**Tabelle 10:** Potentielle CapG-Interaktionspartner (*Fortsetzung*)

Nr.	Genname	Uniprot-Acc.	Beschreibung
39	ZNF185	O15231	Zinc finger protein 185
40	RPL11	P62913	60S ribosomal protein L11
41	SNRPD1	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1
42	DDX5	P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
43	HSPA1A	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
44	DYNC1H1	Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
45	ISG15	P05161	Ubiquitin-like protein ISG15
46	NUDT21	O43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5
47	MYL6	P60660	Myosin light polypeptide 6
48	CAPZA2	P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2
49	RPS5	P46782	40S ribosomal protein S5
50	PDLIM5	Q96HC4	PDZ and LIM domain protein 5
51	DDX3X	O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
52	TMOD3	Q9NYL9	Tropomodulin-3
53	CAPZB	P47756	F-actin-capping protein subunit beta
54	SLC25A6	P12236	ADP/ATP translocase 3
55	ATAD3A	Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A
56	MYH10	P35580	Myosin-10
57	CFL1	P23528	Cofilin-1
58	YWHAZ	P63104	14-3-3 protein zeta/delta
59	ABCE1	P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1
60	EEF2	P13639	Elongation factor 2
61	RPS7	P62081	40S ribosomal protein S7
62	PPP1CC	P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit
63	DRG1	Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1
64	XRCC6	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6
65	PFKP	Q01813	6-phosphofructokinase type C
66	HSD17B11	Q8NBQ5	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11
67	HSP90AB1	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta
68	RPS16	P62249	40S ribosomal protein S16
69	EEF1D	P29692	Elongation factor 1-delta
70	DNAJA2	O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2

...

**Tabelle 10:** Potentielle CapG-Interaktionspartner (*Fortsetzung*)

Nr.	Genname	Uniprot-Acc.	Beschreibung
71	HSPB1	P04792	Heat shock protein beta-1
72	LGALS1	P09382	Galectin-1
73	EIF2S2	P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2
74	EEF1B2	P24534	Elongation factor 1-beta
75	DSP	P15924	Desmoplakin
76	RAI14	Q9P0K7	Ankycorbin
77	LIMA1	Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1
78	IQGAP1	P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1
79	XRCC5	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5
80	ARPC2	O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2
81	MGST1	P10620	Microsomal glutathione S-transferase 1
82	SLC25A5	P05141	ADP/ATP translocase 2
83	VCP	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
84	NCL	P19338	Nucleolin
85	EHD2	Q9NZN4	EH domain-containing protein 2
86	RPS11	P62280	40S ribosomal protein S11
87	CORO1C	Q9ULV4	Coronin-1C
88	MTHFD1	P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic
89	SSR4	P51571	Translocon-associated protein subunit delta
90	HLA-C	P30508	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain
91	RBM14	Q96PK6	RNA-binding protein 14
92	HNRNPA2B1	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
93	ATP2A2	P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
94	MYO1B	O43795	Unconventional myosin-Ib
95	DBN1	Q16643	Drebrin
96	HNRNPU	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
97	RPS9	P46781	40S ribosomal protein S9
98	PPP1R12A	O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A
99	RPS2	P15880	40S ribosomal protein S2
100	RPL6	Q02878	60S ribosomal protein L6
101	HNRNPH3	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
102	TUFM	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial

...

**Tabelle 10:** Potentielle CapG-Interaktionspartner (*Fortsetzung*)

Nr.	Genname	Uniprot-Acc.	Beschreibung
103	HSP90AA1	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha
104	RPL27A	P46776	60S ribosomal protein L27a
105	RPL7	P18124	60S ribosomal protein L7
106	EIF4G1	Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
107	RPL18	Q07020	60S ribosomal protein L18
108	SQRDL	Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
109	HIST1H1C	P16403	Histone H1.2
110	NPM1	P06748	Nucleophosmin
111	CTTN	Q14247	Src substrate cortactin
112	ARHGEF2	Q92974	Rho guanine nucleotide exchange factor 2
113	SVIL	O95425	Supervillin
114	COPB2	P35606	Coatomer subunit beta
115	RPL13	P26373	60S ribosomal protein L13
116	CAND1	Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
117	DDOST	P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
118	FXR1	P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
119	RPL18A	Q02543	60S ribosomal protein L18a
120	RPL3	P39023	60S ribosomal protein L3
121	PRPF31	Q8WWY3	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31
122	PRKDC	P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
123	CYC1	P08574	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial
124	ENO1	P06733	Alpha-enolase
125	RPS8	P62241	40S ribosomal protein S8
126	SCYL1	Q96KG9	N-terminal kinase-like protein
127	AFAP1	Q8N556	Actin filament-associated protein 1
128	XPO1	O14980	Exportin-1
129	TNPO1	Q92973	Transportin-1
130	FAM129B	Q96TA1	Niban-like protein 1
131	HNRNPM	P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
132	ATP5A1	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
133	NAMPT	P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
134	PUF60	Q9UHX1	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60

...

**Tabelle 10:** Potentielle CapG-Interaktionspartner (*Fortsetzung*)

Nr.	Genname	Uniprot-Acc.	Beschreibung
135	GFPT1	Q06210	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
136	SYNPO	Q8N3V7	Synaptopodin
137	CANX	P27824	Calnexin
138	TPM3	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain
139	PPP1R9B	Q96SB3	Neurabin-2
140	NEXN	Q0ZGT2	Nexilin
141	IMPDH2	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
142	TRIM21	P19474	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21
143	SIPA1L3	O60292	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3
144	FLII	Q13045	Protein flightless-1 homolog
145	ASPH	Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
146	SLC2A1	P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
147	HSP90B1	P14625	Endoplasmin
148	MYO18A	Q92614	Unconventional myosin-XVIIIa
149	CSE1L	P55060	Exportin-2
150	SPECC1L	Q69YQ0	Cytospin-A
151	GLB1	P16278	Beta-galactosidase
152	IPO7	O95373	Importin-7
153	MYO5A	Q9Y4I1	Unconventional myosin-Va
154	SIPA1L1	O43166	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1

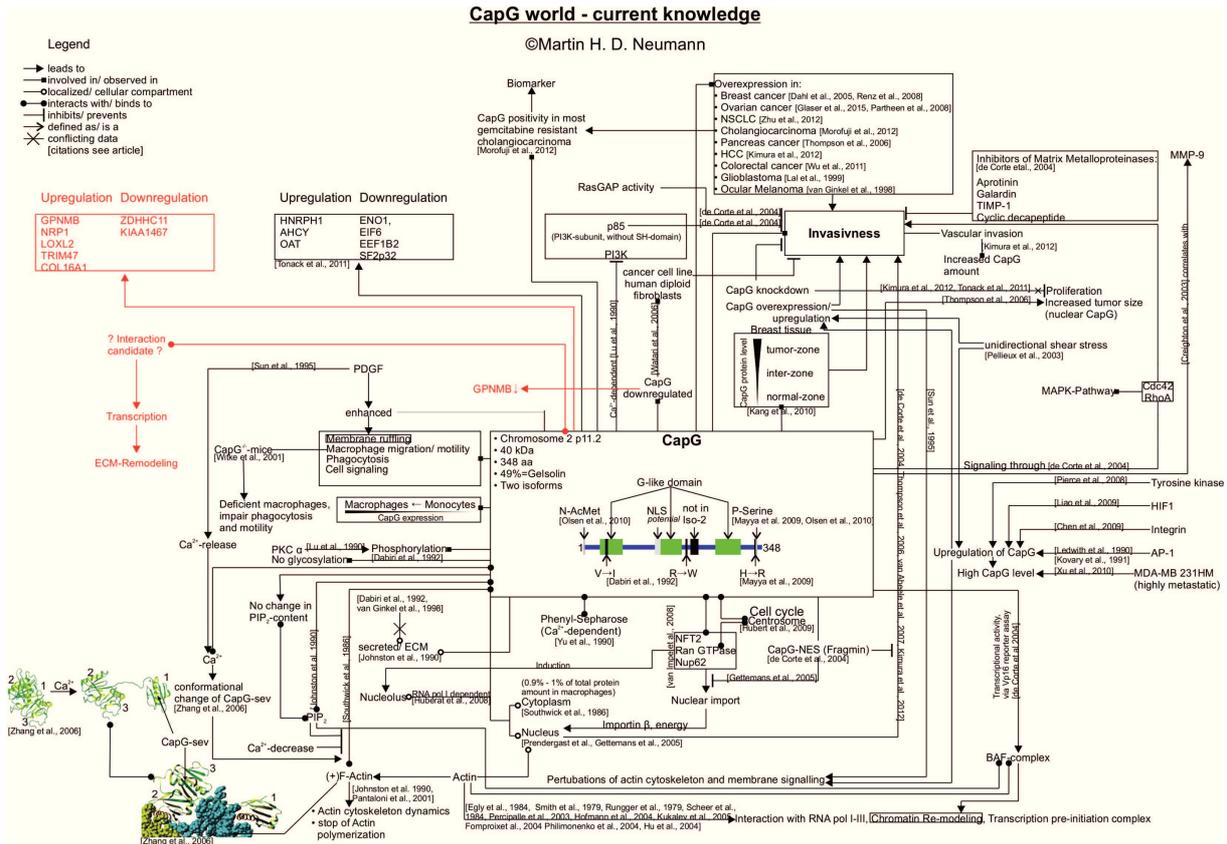
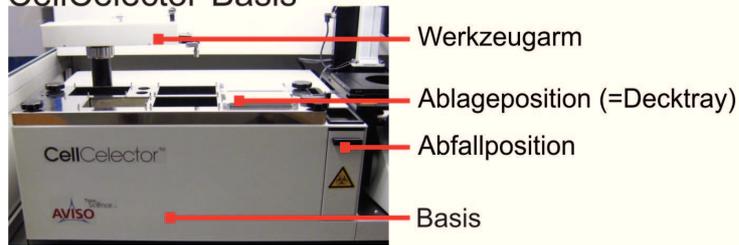


Abb. 32: CapG im komplexen Kontext von Physiologie und Neoplasie.

## 8.2 CellCelector - Bestandteile

### CellCelector-Basis

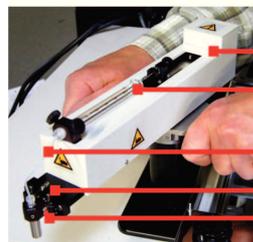
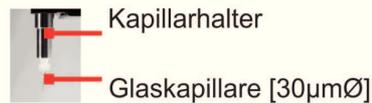


### Decktray



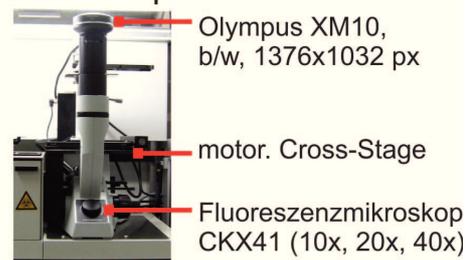
1. Puffertank/ Sterilisation
2. x-Well Platten (heizbar)
3. Glas-Objekträger (heizbar)
4. PCR-Tubes (kühlbar)
5. PCR-Tubes (kühlbar)

### Werkzeugarm



- Werkzeugarm  
Hamilton [25µl]  
Abgabevolumen: 10 nl  
Verschlauchung  
Werkzeugkopf  
Tool-Sensor

### Mikroskop



### Steuereinheit



Obige Bilder aus CellCelector-Handbuch entnommen. Copyright by ALS GmbH, Jena

Abb. 33: CellCelector-Bestandteile

## 8.3 Abkürzungsverzeichnis

%= Prozent

°C = Grad Celsius

ABP = Actin-bindendes Protein

AF = Alexa-Fluor Farbstoff

AK = Antikörper

ALK = anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

APS = Amoniumperoxodisulfat

BSA = Bovines Serum-Albumin

ca.= circa

CapG = Macrophage Capping Protein

CC = CellCelector

CS = CellSearch

CTC = zirkulierende Tumorzellen

CTCF = corrected total cell fluorescence

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindol

DCIS = Duktales Karzinom *in situ*

DEPC = Diethyldicarbonat

DMEM = Dulbecco's modified eagle Medium

DMSO = Dimethylsulfoxid

DTC = disseminierte Tumorzellen

DTT = Dithiothreitol

ECM = extrazelluläre Matrix

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

EpCAM = Epitheliales Zelluläres Adhäsions Molekül

ER = Östrogenrezeptor

FAC = Focal Adhesion Contacts

FACIT = Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple Helices

FCS = fötales Kälberserum

FFPE = Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded

g = Gramm

GADPH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat dehydrogenase

GPMB = Glycoprotein Non-Metastatic B

h = Stunde(n)

HIF1a = *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

HRP = Peroxidase aus Rettich

IDC = invasives duktales Karzinom

kDa = kilo Dalton

KLH = Keyhole Limpet Hemocyanin

l = Liter

Laser = Light Amplification Stimulated by Emission of Radiation

LCM = Laser-Capture-Microdissection

Lsg.= Lösung

m = Meter

M = Molar

m = milli

M = Molar

mA = Milliampere

MAPK = Mitogen activated protein kinase

mg = Milligramm

min = Minute

ml = Milliliter

MMP = Matrixmetalloproteinasen

NaCl = Natriumchlorid

neg = Negativ

nm = Nanometer

PBS = Phosphate-Bufferd Saline

PCR = Polymerase Kettenreaktion

PDGFRA = Alpha-type platelet-derived growth factor receptor

PFA = Paraform-Aldehyd

PIP = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PK = Protein-Kinasen

pos = Positiv

RET = ret proto-oncogene

RIPA Puffer = Radio-Immunpräzipitation-Assay Puffer

rpm = Revolution per Minute

RT = Raumtemperatur

qRT-PCR = Reverse-Transcriptase-quantitative PCR

SDS-PAGE = Natrium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SMO = Smoothened, Frizzled Class Receptor

WGA = Whole Genome Amplification

$\mu$  = Mikro-

$\mu$ g = Mikrogramm

$\mu$ l = Mikroliter

## 9 Danksagung

Ich danke meinen beiden Mentoren und Doktorvätern Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer und Dr. rer. nat. Dieter Niederacher, dass ich diese Arbeit unter ihrer Betreuung verfassen konnte sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für den Freiraum und die Entfaltungsmöglichkeiten.

Danke an Prof. Dr. rer. nat. William F. Martin für die Übernahme des Zweitgutachtens. Danken möchte ich auch der Direktorin der Frauenklinik Frau Prof. Dr. Tanja Fehm.

Danke an Johanna Naskou mit ihrer Art einen in jeder Situation zum Lachen zu bringen, ihre stetige Hilfsbereitschaft, spätestens bei der Kalorien-Aufnahme, sowie die vielen freundschaftlichen Gespräche.

Danke an Hannah Baumbach für die Einführung in die Onomatologie sowie ihre Erzählungen über jeden erdenklichen und von ihr bereisten Winkel der Erde.

Bedanken möchte ich mich bei Helen Schneck für ihr Dasein als Leidensgenossin, ihre Unterstützung und Hilfe sowie die vielen persönlichen Gesprächen.

Yvonne Decker möchte ich besonders danken für die tatkräftige Unterstützung den CellCelector zu zähmen (und zu verstehen), die Stunden vor dem CellCelector-Bildschirm bei

völliger Dunkelheit, ihre unverwechselbare Art, die sie so einzigartig macht.

Danke an Marina Willibald für die vielen freundschaftlichen Gespräche und die Organisation von Mittagessen am Mittwoch, hoffentlich streikt die Bahn nicht wieder.

Grazie mille, Rita Lampignano for the introduction to and the support with italian cuisine and food. Moreover, for the right reaction in every situation: “un cazzo”.

Danke an Dorothee Köhler für den Austausch von Ideen, die Kommunikation rund um Blutproben, die vielen heiteren Diskussion und die Berichte der Gartenpflege mit dem früh-morgendlichen Kampf gegen Schildläuse.

Danke an Ulla Grolik für ihre Hilfe bei der Labororganisation und Einweisung in die Immunhistologie.

Bei Dr. Silke Schultz möchte ich mich bedanken für die zahllosen WhatsApp-Nachrichten bei den “spannenden” DSO-Vorlesungen und die konstruktive Hilfe.

Mein Dank gilt auch Dr. Rui Neves für die gemeinsame Zeit während der Kongresse.

Danke an Michael Hollstein und Jens Eberhardt sowie Constantin Nelep für die Einführung in den CellCelector, die Freundschaft und die heiteren Treffen rund um den “Picker”. Schade, dass es keine CC-User meetings, Basteleien, schräge Ideen, Troubleshootings und Austausch rund um den CellCelector mehr geben wird.

Bedanken möchte ich mich bei Issam Chebouti und die klare Sicht auf die Dinge sowie seine Lebensart.

Mein Dank gilt auch dem Aquarium mit den kurzen Wegen zur Versorgung von Kalorien, als Treffpunkt für den Austausch aller relevanten und nicht-relevanten Informationen und dem Panorama-Blick.

Weiterhin: die vielen gemeinsamen und einsamen Stunden mit dem CellCelector werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Mein Dank gilt auch dem gesamten MolGenLab: Susanne Schömer und Shima Filipour (für die zahllosen WGAs...), Frauke Uppenkamp, Alessa Webers, André Franken, Janosh Rixius, Dagmar Hohmann, Dorothee Ruhl, Nora Hinssen, Dr. Olga Altergot-Ahmad, Christina Blassl, Dr. Franziska Meier-Stiegen, Ellen Honisch, und Dr. Kathrin Sinnigen. Dr. Gereon Poschmann für die stetige Hilfsbereitschaft alles rund um die Massenspektrometrie.

Sarah “Vanny” van den Bosch möchte ich danken für ihre Hilfe insbesondere rund um R und den CellCelector sowie ihre fröhliche unverwechselbare Art.

Danke auch an Dr. Wolfgang Kaisers für die Einführung in R.

Mein Dank gilt meinen wunderbaren Eltern, Roswitha und Klaus Neumann, die mir mit ihrem einzigartigen, liebevollen Wesen immer Vorbilder waren und sind. Danke, dass ihr mich auf das Leben vorbereitet und mir das Wichtigste mit auf dem Weg gegeben habt: sich stets selbst zu reflektieren und über sich selbst zu lachen. Danke, dass ihr immer für meine Schwester und mich da seid.

Meinem Schwiegervater Dr. Achim Klein möchte ich danken für seine Weisheit, unbe-

schreibliche Großzügigkeit und Selbstlosigkeit sowie die Inspiration zur Lebenseinstellung. Mein größter und tiefster Dank gilt dem liebe- und verständnisvollsten Menschen, der Person, die mir unendliche Liebe, Unterstützung und Lebenskraft im Überfluss schenkt: meiner klugen, schönen, fröhlichen und großartigen Frau Sarah. Danke, dass Du mich zu meinem Glück führst.

## 10 Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 23. Februar 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Neumann", is written on a light yellow rectangular background. The signature is cursive and fluid.

---

Martin H. D. Neumann