

Abschlussbericht

Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT)

Vorhaben: Erarbeitung eines mobilen mikrosystemtechnischen Gesamtsystems für Anreicherung, Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen

Kurzname: MiNa-CTC

Förderkennzeichen: 16SV5432

Teilvorhaben IPHT: **Entwicklung eines chipbasierten elektrischen Nachweises zur parallelen Identifikation von Tumorspezifischen Markern**

Beteiligte Partner: Analytik Jena AG (AJ, Koordinator)
Biometra GmbH (Biometra)
Quantifoil Instruments GmbH (Q.Instruments)
Universitätsklinikum Jena (UKJ)
Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (IPHT)

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2011 – 30.06.2014

Inhalt

1. EINLEITENDE DARSTELLUNG	3
1.1. AUFGABENSTELLUNG	3
1.2. VORAUSSETZUNGEN, UNTER DENEN DAS VORHABEN DURCHGEFÜHRT WURDE	3
1.3. PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS	5
1.4. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND	6
1.5. KOOPERATIONEN	9
2. EINGEHENDE DARSTELLUNG	10
2.1 DARSTELLUNG DER ERZIELTEN ERGEBNISSE	10
AP 2: SEPARATION DER TUMORZELLEN	10
AP 3: ANALYSE DER ZELLEN	11
AP 4: AUTOMATISIERUNG UND MINIATURISIERUNG DES ANALYSESYSTEMS	20
AP 6: TESTUNG UND VALIDIERUNG	22
2.2 NOTWENDIGKEIT UND ANGEMESSENHEIT DER GELEISTETEN ARBEIT	25
2.3 VORAUSSICHTLICHER NUTZEN, INSBESONDERE DIE VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE IM SINNE DES FORTGESCHRIEBENEN VERWERTUNGSPLANS	26
2.4 WÄHREND DER DURCHFÜHRUNG DES VORHABENS DEM ZUWENDUNGSEMPFÄNGER BEKANNT GEWORDENER FORTSCHRITT AUF DEM GEBIET DES VORHABENS BEI ANDEREN STELLEN	26
2.5 ERFOLGTE ODER GEPLANTE VERÖFFENTLICHUNGEN DER ERGEBNISSE	27

1. Einleitende Darstellung

1.1. Aufgabenstellung

Krebs ist heute eine der Haupttodesursachen in den Industriestaaten, welche mit steigendem Lebensalter deutlich zunimmt. Von besonderer Wichtigkeit für eine gezielte Krebstherapie ist der Nachweis von Metastasen, da über 90% aller Todesfälle bei Krebserkrankungen durch Metastasen verursacht werden. Als Auslöser der Bildung von Metastasen werden im Blut zirkulierende Tumorzellen angesehen. Die Bestimmung und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut stellt somit unter Berücksichtigung aller zur Verfügung stehenden klinischen Daten, insbesondere bei Patienten mit Mamma- und kolorektalem Karzinom, einen aussagefähigen Prognosefaktor dar. Dies erlaubt eine sehr zeitnahe Wirksamkeitsüberprüfung der eingesetzten Therapie, die den bisherigen Methoden der Überprüfung der Therapieeffizienz überlegen ist.

Im Fokus des Verbundvorhabens „MiNa-CTC“ (gefördert durch das BMBF, basierend auf der Bekanntmachung „Mobile Diagnostiksysteme“ vom 30. Dezember 2009) stand daher die Erforschung und Realisierung eines miniaturisierten, kostengünstigen, zuverlässigen, effizienten und mobilen Gesamtsystems für die Anreicherung, den Nachweis und die Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen. Das Teilvorhaben des IPHT befasst sich dabei insbesondere mit der Erforschung und Erarbeitung einer chipbasierten Nachweismethode zur Detektion verschiedener Tumor-spezifischer Marker. Die chipbasierte Detektion soll dabei mit einem optisch/elektrischen Auswerteverfahren vorgenommen werden, welches die Konstruktion von kleinen, robusten und kostengünstigen Auswerteeinheiten ermöglicht. Im Ergebnis steht die Integration der erforschten Teiltechnologien, die Automatisierung manueller Arbeitsschritte und die Erarbeitung geschlossener Arbeitsabläufe in ein leistungsfähiges und dezentral einsetzbares Gesamtsystem zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen, welches ein kosteneffizientes Therapie-Monitoring und eine optimierte Krebsnachsorge, u.a. auch in Facharztpraxen sowie strukturschwachen ländlichen Regionen ermöglicht.

1.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Im Mittelpunkt der Arbeiten des Leibniz-Instituts für Photonische Technologien steht die Erforschung innovativer optischer Systemlösungen für Fragestellungen aus den Bereichen Medizin, Lebens- und Umweltwissenschaften gemäß dem Motto „Photonics for Life“. Die Erforschung und Etablierung neuartiger chipbasierter Nachweisverfahren basierend auf metallischen Nanopartikeln und –strukturen ist dabei ein Schwerpunkt der am IPHT integrierten Arbeitsgruppe *Jenaer Biochip Initiative* (JBCI). Die JBCI stellt eine gemeinsame Arbeitsgruppe des IPHT und des Instituts für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena dar, die auf den Erkenntnissen und Erfahrungen der durch das BMBF,

Unternehmen-Region geförderten InnoProfile-Nachwuchsgruppe „JBCI“ (2006-2010) aufbaut. Nach Auslaufen der Förderung für die JBCI wurde diese als Arbeitsgruppe am IPHT integriert und beschäftigte sich weiterhin mit der Erforschung und Entwicklung von neuen Technologien für den chipbasierten Nachweis von Biomolekülen. Darüber hinaus standen aufbauend auf den Erfahrungen des IPHT zur Markierung von Biomolekülen mit metallischen Nanopartikeln eine Vielzahl von neuartigen optischen, elektrischen und gravimetrischen Nachweisverfahren zur Verfügung. Innerhalb der JBCI werden vor allem spektroskopische (oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie) und elektrisch/optische chipbasierte Nachweismethoden basierend auf einer Markierung mit metallischen Nanopartikeln und spezifischen Metallabscheidungsreaktionen untersucht.

Das Funktionsprinzip des elektrischen chipbasierten DNA-Nachweises beruht dabei auf einer biomolekularen Interaktion auf einer Trägeroberfläche, welcher mit mikrostrukturierten Elektrodenspalten modifiziert wurde. Dazu werden spezifische Fängermoleküle in die Elektrodenspalte immobilisiert. Nach erfolgreicher Hybridisierung der komplementären Biomoleküle können mittels einer enzymatisch gesteuerten Reaktion Silber in den Elektrodenspalten abgeschieden werden, welches den Elektrodenspalt überbrückt und zu einem deutlichen Anstieg der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit führt. Dadurch ist es möglich den Nachweis von Biomolekülen über eine einfache und robuste elektrische aber auch optische Messung (Grauwertanalyse) zu realisieren. Die Eignung dieser Technologie zum parallelen und spezifischen Nachweis von DNA konnte bereits am Beispiel der Detektion unterschiedlicher Bodenbakterien gezeigt werden. Darüber hinaus werden weitere bioanalytische Fragestellungen, wie z.B. dem Nachweis von Tierseuchenerregern und Pflanzenpathogenen, adressiert. Im vorliegenden Teilvorhaben des Projektes MiNa-CTC wurde die chipbasierte Technologieplattform für medizinisch relevante Fragestellungen optimiert und die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) erforscht.

Neben der Erforschung und Etablierung der Nachweistechologie wurde in den letzten Jahren intensiv an weiteren Aspekten der chipbasierten Analyse gearbeitet. Dabei konnte unter anderem erfolgreich demonstriert werden, dass sich mittels Siebdruck kostengünstige Elektrodenstrukturen für den elektrischen chipbasierten Nachweis herstellen lassen und diese auch für einen DNA-Nachweis genutzt werden können. Des Weiteren wurden unterschiedliche Substrate (z.B. Polymer) zur Herstellung kostengünstiger Biochips untersucht. Durch die langjährige enge Zusammenarbeit mit institutionellen und industriellen (Verbund) Partnern besteht ein tiefes Verständnis über die Anforderungen an tragfähige Systemlösungen in der Diagnostik. Deshalb lag ein besonderes Augenmerk der Arbeiten auf der Erforschung von kostengünstigen und robusten Lösungen für die automatisierte und miniaturisierte Bioanalytik.

Im Hinblick auf die Realisierung des Teilvorhabens brachte das IPHT seine langjährigen Erfahrungen zum chipbasierten Nachweis und zur Nanopartikelmarkierung von Biomolekülen sowie die Patente eines Affinitätssensor zum Nachweis spezifischer

molekularer Bindungsereignisse ein. Das IPHT ist Inhaber eines deutschen (DE 19860547) und eines internationalen Patentes (WO 00739325) für einen Affinitätssensor für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse und dessen Verwendung. Diese Patente bildeten die Grundlage des zu erforschenden Chipsystems im vorliegenden Projekt. Nach dem Wissen der Verbundpartner bestanden zum Zeitpunkt der Beantragung keine Schutzrechte Dritter, die einer späteren Verwertung der Ergebnisse entgegenstehen.

1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Hauptaufgabe des IPHT innerhalb des Verbundes bestand in der Erforschung einer chipbasierten optisch/elektrischen auslesbaren Nachweismethode zur parallelen Identifikation von Tumor-spezifischen Markern, basierend auf der am IPHT entwickelten Technologie. Weiterhin beschäftigte sich das IPHT mit Aufgaben zur Miniaturisierung und Automatisierung, der Modifikation von Oberflächen mit Biomolekülen, der Amplifikation von DNA sowie der Integration, Testung und Validierung der chipbasierten Analyse in ein mobiles Gesamtsystem.

Im Folgenden sind die Arbeitspakete des IPHT innerhalb des Projektes dargestellt. Die Bearbeitung der Arbeitspakete erfolgte dabei in der Regel durch mehrere Projektpartner.

AP 1: Festlegung von Anforderungen und Spezifikationen

In Zusammenarbeit mit allen beteiligten Projektpartnern wurden die erforderlichen Spezifikationen für die Teillösungen und –module festgelegt. Darauf aufbauend erfolgte die Erarbeitung eines detaillierten Konzeptes sowie der Erstellung eines Lastenheftes.

AP 2: Separation der Tumorzellen

Dieses Arbeitspaket wurde insbesondere durch das UKJ bearbeitet. Die Separation der Tumorzellen wird mit der am UKJ entwickelten Technologie zur magnetischen Separation von CTCs entwickelt. Eine Steigerung der Effizienz dieser Methode durch den Einsatz von spezifisch modifizierten Oberflächen wird getestet. Hierbei galt es am IPHT u.a. verschiedene Strategien zur Anbindung von Antikörpern an magnetischen Partikeln (AP 2.3) zu erarbeiten.

AP 3: Analyse der isolierten Zellen

Die in AP2 am UKJ separierten CTCs wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methode charakterisiert. Dazu war es notwendig, die enthaltene DNA zu isolieren, zu amplifizieren und zu markieren.

- Lyse der isolierten Zellen (AP 3.1)
- Isolierung und Aufreinigung der Nukleinsäuren (AP 3.2)
- Amplifikation und Markierung (AP 3.3)
- Entwicklung einer chipbasierten Analyse (AP 3.5)

AP 4: Automatisierung und Miniaturisierung des Analysesystems

Zur Gewährleistung eines späteren Vor-Ort-Einsatzes des Systems war eine Automatisierung und Miniaturisierung der chipbasierten Analyse notwendig. In enger Absprache mit den beteiligten industriellen Partnern erfolgte die Konzeptionierung und Umsetzung.

- Prinzipstudien zur Funktionsfähigkeit der konzipierten Teillösungen (AP 4.1)
 - Technische Studien zur Miniaturisierung der Teillösungen und des Gesamtsystems (AP 4.1.2)
 - Studien zur Interaktion der konzipierten Teillösungen und –module (AP 4.1.4)
- Definition der erweiterten Parameter (AP 4.2)
- Erforschung eines Moduls für die chipbasierte Analyse im mobilen Gesamtsystem (AP 4.6)

AP 6: Testung und Validierung

In enger Zusammenarbeit aller Partner wurde das Gesamtsystem entsprechend geprüft und gegenüber Standardverfahren validiert.

- Testung der einzelnen Module (AP 6.1)
- Anpassung der Module (AP 6.2)
- Validierung des Labormusters sowie Testung mit definierten Proben (AP 6.3)
- Bewertung der Komponenten und Zusammenfassung der Ergebnisse (AP 6.4)

1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Solide Tumore erreichen während ihrer Entwicklung einen Zustand der Malignität, in dem der Zusammenhalt der Tumorzellen nicht mehr aufrechterhalten wird. Externe Faktoren des umliegenden Gewebes, sowie interne Faktoren, wie Tumorzell-eigene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, aber auch Mutationen verringern die Adhäsion der Tumorzellen und fördern die Migration und Invasion dieser Zellen (Disseminierung). Diese zirkulierenden Zellen erreichen das Blut- und Lymphsystem und erhalten damit Zugang zu allen Organen des Körpers. Die Tumorzellen zirkulieren vor allem im peripheren Blut, und gelten als ein entscheidender Ausgangspunkt für die Bildung von Metastasen [Wittekind und Neid, 2005]. Die CTCs treten in einem Verhältnis von 1×10^4 bis 1×10^6 in Vergleich zu den normalen Blutzellen auf, was den einwandfreien Nachweis und die Charakterisierung dieser Zellen erschwert.

So konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Tumorzellzahl im Verlauf einer Tumorerkrankung sowie unter Therapie, Rückschlüsse auf den Erfolg der Therapie, sowie auf den Fortgang der Krebserkrankung erlaubt. Eine große Anzahl der CTCs ist apoptotisch, so dass diese keine anderen Organe befallen können. Trotzdem verbleibt ein kleiner Teil, der neue Metastasen bilden kann [Pachmann et al., 2005; Mocellin et al., 2006]. Diese CTCs persistieren in einem Stadium, der sogenannten Dormanz. Dabei befinden sich die Zellen im

Zellzyklus-Arrest in der G₀-Phase, einem mitotisch inaktiven Zustand, ohne Apoptose oder Proliferation. Wenn sich die Mikroumgebung oder Genexpression verändert, können diese „schlafenden“ Zellen in ein aktives Stadium zurückkehren und Metastasen bilden, auch noch lange nachdem der Primärtumor diagnostiziert wurde [Fehm et al., 2008]. In 90% aller Tumorpatienten konnten CTCs detektiert werden, während im Blut gesunder Personen nur sehr wenige gefunden werden [Pachmann et al., 2008]. Somit ist die genaue tumorbiologische Charakterisierung der zirkulierenden Tumorzellen von erheblicher Bedeutung für die Abschätzung des weiteren Verlaufs der Krebserkrankung sowie in zunehmendem Maße für die Therapiekontrolle.

Die Charakterisierung dieser CTCs erfolgt beispielsweise mit molekularbiologischen Methoden (PCR, *in-situ* Hybridisierung). Die bisherigen Diagnostiksysteme für zirkulierende Tumorzellen z.B. Cell Search System der Fa. Veridex Johnson & Johnson und Tests der AdnaGen AG erlauben auf Grund ihrer Komplexität nur einen Nachweis in spezialisierten Laboren und sind für die mobile Diagnostik ungeeignet.

Bei der Realisierung von robusten und tragbaren Nachweissystemen für die chipbasierte Analytik sind vor allem elektrische und elektrochemische Nachweissysteme von großem Interesse, da diese mittels einfacher elektrischer Messungen zum Ergebnis führen und auf empfindliche optische Komponente verzichtet werden kann. Das zu entwickelnde DNA-Chip-System weist somit gegenüber den standardisierten Detektionsmethoden Vorteile auf. Die elektrische Detektion ist robuster als die optischen Detektionssysteme und lässt sich besser miniaturisieren [Moeller et al, 2008]. Transportable Diagnosegeräte mit DNA-Chips können so wesentlich kleiner und handlicher konstruiert werden. Ein weiterer Vorteil ist eine erhebliche Kostenreduzierung durch die einfache elektrische Detektion. Die Vorteile etablierter Chipsysteme bleiben dabei erhalten: pro Chip können viele verschiedene Tumorspezifische Marker gleichzeitig getestet werden; drastische Reduzierung der Analysenzeit für die DNA-Probe, Minimierung der benötigten Proben- und Reagenzvolumina sowie hoher Probendurchsatz sind zu verzeichnen.

1.4.1 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte

Die im Teilvorhaben des IPHT eingesetzte chipbasierte Detektionsmethode basiert auf den Grundlagen der am IPHT patentierten Technologie eines Affinitätssensors für den Nachweis spezifischer molekularer Bindungsereignisse und dessen Verwendung. Das IPHT besitzt sowohl ein deutsches (DE 19860547) als auch ein internationales (WO 00739325) Patent. Nach dem Wissen aller Verbundpartner bestanden zurzeit der Antragstellung keine Schutzrechte Dritter, die einer späteren Verwertung der Ergebnisse entgegenstehen.

1.4.2 Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Für die Rechercharbeiten vor und während der Projektlaufzeit wurden folgende Informations- und Dokumentationsdienste verwendet:

Bezeichnung	URL
Elektronische Zeitschriftenbibliothek	http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Science Direct	http://www.sciencedirect.com/
PubMed	http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html
Web of Science	http://apps.isiknowledge.com/

Im Folgenden ist eine Auswahl projektrelevanter Veröffentlichungen dargestellt.

R. Möller, T. Schüler, S. Günther, M. R. Carlsohn, T. Munder, W. Fritzsche: Electrical DNA-chipbased identification of different species of the genus *Kitasatospora*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 1181 (2008).

T. Schüler, T. Asmus, W. Fritzsche, R. Möller: Screen printing as cost-efficient fabrication method for DNA-chips with electrical readout for detection of viral DNA. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2077 (2009).

A. J. Ibanez, T. Schüler, R. Möller, W. Fritzsche, H. P. Saluz, A. Svatos: DNA detection using a triple readout optical/AFM/MALDI planar microwell plastic chip. *Analytical Chemistry* 80, 5892 (2008).

M. Peter, T. Schüler, F. Furthner, P. A. Rensing, G. T. van Heck, H. F. M. Schoo, R. Möller, W. Fritzsche, A. J. J. M. van Breemen, E. R. Meinders: Flexible Biochips for Detection of Biomolecules. *Langmuir* 25, 5384 (2009).

Brinker A1, Schulze H, Bachmann T, Möller R. Lambda exonuclease pre-treatment for improved DNA-chip performance depends on the relative probe-target position. *Biosens Bioelectron.* 26(2):898-902 (2010)

C. Berndt, G. Wolf, G. Schroder, M. Bebenroth, K. Oehlschlegel, T. Hillebrand and J. Zanow, *Eur J Clin Chem Clin*, 34, 837-840 (1996).

J L Cenis. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.*; 20(9): 2380 (1992).

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9 (1987).

Fehm, T., V. Müller, R. Marches, G. Klein, B. Gückel, H. Neubauer, E. Solomeyer, S. Becker, Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer. *APMIS* 116, 742 (2008).

Mocellin, S., U. Keilholz, C.R. Rossi, D. Nitti, Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 12, 130 (2006).

Pachmann, K., O. Camara, A. Kavallaris, S. Krauspe, N. Malarski, M. Gajda, T. Kroll, C. Jörke, U. Hammer, A. Altendorf-Hofmann, C. Rabenstein, U. Pachmann, I. Runnebaum, K. Höffken, Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse, *J Clin Oncol* 26, 1208 (2008).

Pachmann, K., J.H. Clement, C.-P. Schneider, B. Willen, O. Camara, U. Pachmann, K. Höffken, Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 617 (2005).

Wittekin, C., M. Neid, Cancer invasion and metastasis, *Oncology* 69, 14 (2005).

Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature Reviews Drug Discovery* 13: 828-851 (2014).

Turner AP. 2013. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews* 42: 3184-3196.

Tsougeni K, Koukouvinos G, Petrou PS, Tserepi A, Kakabakos SE, Gogolides E. 2012. High-capacity and high-intensity DNA microarray spots using oxygen-plasma nanotextured polystyrene slides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 2757-2764.

Shackelford RE, Whitling NA, McNab P, Japa S, Coppola D. KRAS Testing: A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. *Genes Cancer* 3: 459-466 (2012).

Gonzalez de Castro D, et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer* 107: 345-351 (2012).

Chen X, Ying A, Gao Z. Highly sensitive and selective colorimetric genotyping of single-nucleotide polymorphisms based on enzyme-amplified ligation on magnetic beads. *Biosensors & Bioelectronics* 36: 89-94 (2012).

Domagała, P., Hybiak, J., Sulżyc-Bielicka, V., Cybulski, C., Ryś, J., and Domagała, W. KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: a practical approach. *Polish Journal of Pathology* 3, 145–164 (2012).

Jakka, S., and Rossbach, M. An economic perspective on personalized medicine. *The HUGO Journal* 7, 1 (2013).

Kitano S, Myers J, Nakamura J, Yamane A, Yamashita M, Nakayama M, Tsukahara Y, Ushida H, Liu W, Ratain MJ, Amano M., A novel fully automated molecular diagnostic system (AMDS) for colorectal cancer mutation detection. *PLoS One* 8(5):e62989 (2013).

Angulo, B., Lopez-Rios, F., and Gonzalez, D. A new generation of companion diagnostics: cobas BRAF, KRAS and EGFR mutation detection tests. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14, 517–524 (2014).

Kristensen LS, Andersen GB, Hager H, Hansen LL. Competitive amplification of differentially melting amplicons (CADMA) enables sensitive and direct detection of all mutation types by high-resolution melting analysis. *Hum Mutat* 33: 264-271 (2012).

Lalmahomed ZS, Mostert B, Onstenk W, Kraan J, Ayez N, Gratama JW, Grünhagen D, Verhoef C, Sleijfer S. Prognostic value of circulating tumour cells for early recurrence after resection of colorectal liver metastases. *Br J Cancer*. Jan 6. doi: 10.1038/bjc.2014.651 (2015).

Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, Vermeulen L., Colorectal Cancer Heterogeneity and Targeted Therapy: A Case for Molecular Disease Subtypes. *Cancer Res.*75(2):245-249 (2015).

1.5. Kooperationen

Im Verbundvorhaben waren sowohl Partner der institutionellen Forschung (UKJ und IPHT) als auch Partner aus der Industrie (Analytik Jena, Biometra und Q.Instruments) vertreten, um zielführend ein modulares, dezentral einsetzbares Gesamtsystem zur Charakterisierung und Identifizierung zirkulierender Tumorzellen zu erforschen. Die Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Clement am UKJ bearbeitete in Kooperation mit den Firmen Q.Instruments und Analytik Jena AG die Separation und Charakterisierung der zirkulierenden Tumorzellen. Verantwortlich für die Amplifikation der gesuchten Zielmoleküle und den chipbasierten Multiparameternachweis zeichnete sich das IPHT in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG. Basierend auf den Vorarbeiten der Forschungspartner lag die Verantwortlichkeit für die Integration der Einzelmodule unter Einbeziehung produktionstechnischer Aspekte bei der Analytik Jena AG und der Biometra.

2. Eingehende Darstellung

2.1 Darstellung der erzielten Ergebnisse

Das IPHT befasst sich im Verbundvorhaben MiNa-CTC mit der Erforschung eines chipbasierten Nachweisverfahrens zur parallelen Identifikation Tumor-spezifischer Marker. Im Fokus der Forschungsaufgaben standen dabei die AP 3, 4 und 6. Die Präzisierung der Anforderungen und Spezifikationen an die Teilmodule sowie an das Gesamtsystem erfolgte mit allen beteiligten Projektpartnern. Neben technischen Parametern wurden drei wichtige Marker (Tab. 1: *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*) im Bereich der Krebsdiagnostik für die Erforschung eines mobilen Gesamtsystems zur Anreicherung, dem Nachweis und der Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen festgelegt. Zudem wurden zwei Referenzgene, besonders im Hinblick auf eine mögliche Real-Time Amplifikation festgelegt (Tab. 1: *RPL13A*, *GusBeta*). Eine eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse am IPHT ist im Folgenden dargestellt.

Tab.1: ausgewählte Biomarker, Referenzgene sowie untersuchte Zelllinien

Gen Name	Wildtyp/ Mutation	Exon-Pos.	Zelllinien	Genotyp
KRAS	Wt	Exon2	FaDu	homozygot
	c.34G>A (p.G12S)	Pos.45	A549	homozygot
	c.34G>C (p.G12R)			
	c.34G>T (p.G12C)			
	c.35G>A (p.G12D)			
	c.35G>C (p.G12A)	Pos.46	RPMI8226	heterozygot
	c.35G>T (p.G12V)	Pos.46	SW480	homozygot
		Capan-1	homozygot	
	C13Asp			
BRAF	Wt	Exon15	Capan-1	
	c.1799 T>A (p.V600E)	Pos.58	MDA-MB-435S	heterozygot
PIK3CA	Wt	Exon21	Capan-1	
	c.3140 A>G (p.H1047R)	Pos.204	BT-20	heterozygot
			MDA-MB-453	heterozygot
			T47D	heterozygot
RPL13A				
GUSbeta				

AP 2: Separation der Tumorzellen

TP 2.3: Spezifisch modifizierte Oberflächen zur magnetischen Separation mit kombinierter molekularer Erkennung

Die Arbeiten zur Anreicherung und Separation zirkulierender Tumorzellen wurden im Wesentlichen durch das UKJ in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG durchgeführt. Die

Aufgabe des IPHT bestand darin, verschiedene Strategien zur spezifischen Modifikation (z.B. Antikörper) von Partikeloberflächen zu erarbeiten, um eine selektivere Anreicherung der CTCs zu untersuchen. Hierbei wurden verschiedene Ansätze zur kovalenten Anbindung von Antikörpern an magnetische Beads getestet. Neben der ungerichteten Immobilisierung über intrinsisch im Antikörper vorhandene Aminogruppen, wurde auch eine Strategie untersucht, die eine gerichtete Immobilisierung der Antikörper erlaubt, so dass die Antigen-bindenden Bereiche aktiv bleiben. Für die ungerichtete Immobilisierung über die Aminogruppen des Antikörpers wurden magnetische Beads mit reaktiven Epoxygruppen sowie Carbonsäure-funktionalisierte Beads verwendet. Während die Epoxygruppen direkt mit den primären Aminen im Antikörper unter Ausbildung eines stabilen sekundären Amins reagieren, mussten die Carbonsäuregruppen am Magnetpartikel zuvor aktiviert werden. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze getestet. Zum einen wurde dazu das Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) allein verwendet, zum anderen in Kombination mit NHSS (N-Hydroxysulfosuccinimid) um einen NHS-Ester als stabileres Zwischenprodukt für die Kopplung mit den Aminogruppen zu erhalten. Des Weiteren konnten Antikörper an aminfunktionalisierte Magnetpartikel unter Verwendung des bifunktionellen Crosslinkers Glutaraldehyd gebunden werden. Die resultierenden Iminbindungen wurden anschließend selektiv mit dem Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid zum sekundären Amin reduziert.

Zur gerichteten Immobilisierung von Antikörpern wurde Protein A genutzt. Dieses wurde vor der Anbindung der Antikörper kovalent auf Carbonsäure-modifizierten Beads nach vorheriger Aktivierung durch EDC immobilisiert. Anschließend erfolgte die gerichtete Immobilisierung der Antikörper über ihren Fc(fragment crystallizable)-Bereich.

Jedoch zeigte sich im Verlauf des Projektes, dass die Anreicherung der Tumorzellen mittels Carboxymethyl-Dextran-(CMD)-umhüllter magnetischer Nanopartikel am UKJ für eine effiziente Anreicherung erfolgreich angewendet werden können. Aufgrund der kostengünstigen und einfachen Herstellung dieser CMD-Nanopartikel im Vergleich zur deutlich kostenintensiven und aufwändigeren Methode der spezifischen Modifikation der Partikeloberflächen mit Antikörpern wurde entschieden die Anreicherung und Separation der zirkulierenden Tumorzellen mit Hilfe der CMD-Nanopartikel des UKJ im Gesamtsystem durchzuführen.

AP 3: Analyse der Zellen

Die Aufgabenstellung dieses Arbeitspaketes beinhaltete die Optimierung der CTC-Separation und die molekularbiologische Charakterisierung der CTCs. Dazu war es notwendig, die enthaltene DNA aus den CTCs zu isolieren, zu amplifizieren und zu markieren. Um ausreichend Mengen an Probenmaterial zur Verfügung zu haben, wurden zunächst ausgewählte Zelllinien untersucht. Weiterhin wurde die chipbasierte Analyse für die biomedizinische Fragestellung validiert und optimiert. Schematisch ist der chipbasierte Nachweis mit vorheriger Amplifikation in Abb. 1 dargestellt.

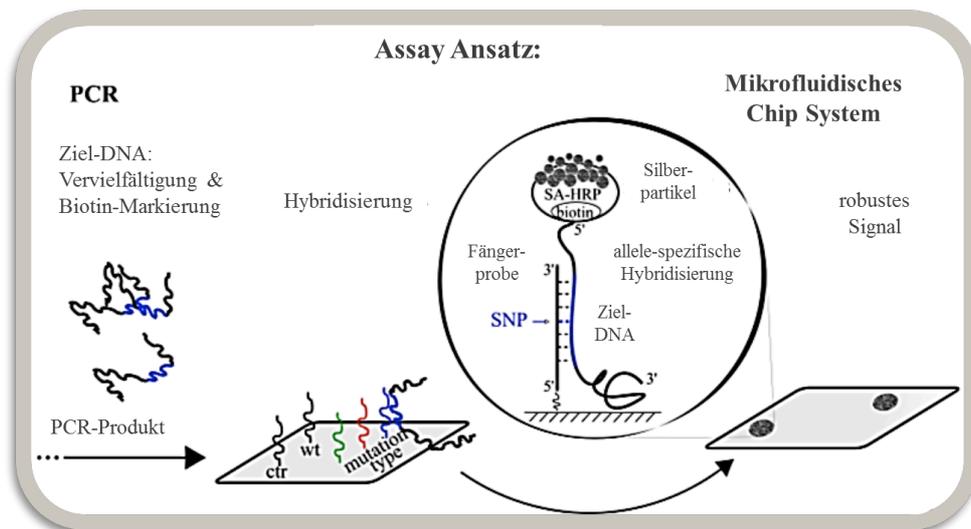


Abb.1: schematische Darstellung der chipbasierten Analyse mit vorheriger Amplifikation.

TP 3.1: Lyse der isolierten Zellen

Die Zellisolierung erfolgte im Wesentlichen am UKJ in enger Zusammenarbeit mit Q.Instruments. Für die anschließende Lyse der Zellen wurden am IPHT entsprechende Vorversuche durchgeführt, die in TP 3.2 eingegangen sind.

TP 3.2: Isolierung und Aufreinigung der Nukleinsäuren

Für diese Untersuchungen wurde vom UKJ aus Zellkultur stammendes, eingefrorenes Zellmaterial sowie bereits isolierte DNA zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die DNA traditionell nach den Protokollen Cenis (1992) und Chomczynski (1987) isoliert. Parallel wurde in Kooperation mit der Analytik Jena AG ein neuartiger DNA-Isolierungskit auf Basis magnetischer Beads (BCT Innueasy, AJ Innuscreen) speziell für Tumorzellen eingesetzt und erfolgreich getestet. Es konnte mit allen Methoden eine erfolgreiche DNA-Isolierung aus humanen Zellen erhalten werden. Als schnellste und effektivste Methode stellte sich der BCT-Innueasy-Kit dar, so dass in Hinblick auf die Erforschung eines schnellen, robusten Vor-Ort-Verfahrens dieser in den weiteren Arbeiten zur DNA-Isolierung herangezogen wird. Zur weiteren Validierung der Methode konnten erfolgreich Untersuchungen an Blutproben, welche mit malignen Zellen (insbesondere der Zelllinie RPMI-8226) versetzt wurden, durchgeführt werden.

TP 3.3: Amplifikation und Markierung

Zur erfolgreichen Durchführung der chipbasierten Analyse wird ein definierter Abschnitt der isolierten DNA zuvor vervielfältigt. Die Herausforderung bestand hierbei insbesondere in der Auswahl der zu amplifizierenden Sequenzabschnitte für die Biomarker *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* sowie die Referenzgene *RPL13A* und *GUSbeta* und der damit verbundenen Festlegung

entsprechender Primersequenzen für die PCR (Tab. 2) sowie nachfolgend der Sonden für den spezifischen chipbasierten Nachweis (TP 3.5). Während der Amplifikation erfolgte zusätzlich eine Markierung des gewünschten Zielproduktes mit Biotin und einem Phosphatrest. Mit Hilfe des Phosphatrestes ist eine Möglichkeit gegeben, durch einen Exonuklease-Verdau gezielt Einzelstränge zu generieren, die für eine erfolgreiche chipbasierte DNA-Analyse notwendig sind (Brinker et al., 2010). Alternativ wurden Einzelstränge über eine thermische Denaturierung mit anschließender schockartiger Kühlung erhalten. Die Methoden wurden hinsichtlich ihres Einsatzs in ein mobiles Gesamtsystem geprüft und bewertet.

Tab.2: eingesetzte PCR-Primer der drei Biomarker *KRAS*, *PIK3CA* und *BRAF*.

	Forward-Primer	Reverse--Primer	PCR-Produkt
<i>KRAS</i>	GACTGAATATAAACTTGTGGT	GTTGGATCATATTCGTCCAC	102 bp
<i>PIK3CA</i>	AGAGGCTTTGGAGTATTCATG	ATGCTGTTTAATTGTGTGGAAG	97 bp
<i>BRAF</i>	TCTTCATGAAGACCTCACAGT	CAACTGTTCAAACCTGATGGG	91 bp

Zur schnellen und spezifischen Amplifikation der Zielprodukte wurden verschiedene Strategien erarbeitet und in umfangreichen Experimenten getestet. Zunächst wurden die Primer so designt, dass die PCR-Produkte der ausgewählten Biomarker *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* bereits während der Gelelektrophorese durch ihre unterschiedliche Stranglänge (Basenpaarlänge) unterschieden werden konnten. Exemplarisch ist die in Abb. 2 dargestellt. Es wurden sowohl Einzel-PCR- als auch Multiplex-PCR-Ansätze erfolgreich untersucht, wobei jeweils pro Ansatz ca. 8 bis 10 ng/ μ l genomische DNA eingesetzt wurde. Zielführend wurde der Multiplex-PCR-Ansatz verfolgt, da diese eine sehr material- und zeitsparende Methode zur simultanen Amplifikation der einzelnen PCR-Fragmente in einem Reaktionsansatz darstellt. Vor allem im diagnostischen Bereich spielt dies eine wesentliche Rolle, da oftmals nur begrenzt Probenmaterial zur Verfügung steht.

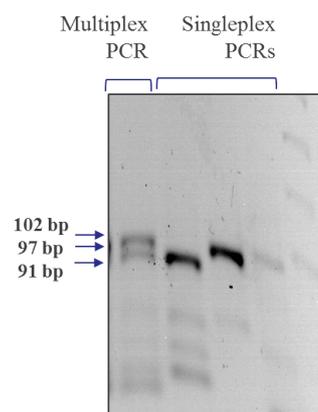


Abb.2: Analytisches Agarosegel von PCR-Produkten für *KRAS* (102 bp), *BRAF* (97 bp) und *PIK3CA* (91 bp) in einer Einzel- und Multiplex-PCR.

Parallel zur Etablierung geeigneter Amplifikationsstrategien für eine nachfolgende chipbasierte Analyse wurde in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG die Real-Time PCR zur Amplifikation der Biomarker erfolgreich erforscht. Hierfür wurde das TaqMan-System zur Multiplex-Echtzeit-Analyse der spezifischen *KRAS*-Mutation c.35G>C und der Referenz-Marker *RPL13A* und *GusBeta* umfassend untersucht und optimiert. Zur Durchführung der Arbeiten wurden in Abstimmung mit der Analytik Jena AG die Fluoreszenz-Farbstoffe FAM, Cy3.5, und Cy5 (Tab.3) ausgewählt. In umfangreichen Untersuchungen konnten die drei ausgewählten Gene (*KRAS*, *GusBeta*, *RPL13A*) erfolgreich detektiert werden.

Tab. 1 Kurze tabellarische Übersicht des eingesetzten TaqMan-Systems

		PCR-Produkt	TaqMan-Sonde	Fluoreszenz-Farbstoff	Farb-Kanal
Mutations-Sonde	KRAS	102bp	17mer	FAM	Grün
Referenz-Sonden	GusBeta	120bp	22mer	Cy3.5	Orange
	RPL13A	133bp	25mer	Cy5	rot

TP 3.5: Entwicklung einer chipbasierten Analyse

Die Erforschung und Entwicklung einer chipbasierten optisch/elektrischen Nachweismethode zur parallelen Identifikation verschiedener Tumor-spezifischer Marker bildet die Hauptaufgabe des IPHT im Verbundvorhaben MiNa-CTC. Dazu wurden unterschiedliche Ansätze erforscht und das Chipdesign auf die spezifischen Anforderungen dieser biomedizinischen Anwendung angepasst.

Aufbauend auf den Arbeiten in TP 3.3 wurden die amplifizierten und markierten PCR-Produkte der spezifischen chipbasierten Analyse zugeführt. Zunächst wurden umfangreiche Experimente auf planaren, oberflächenmodifizierten Glasobjektträger durchgeführt, um die Spezifität der Sonden zu erforschen. In ersten Experimenten wurden bereits bekannte Sonden (Berndt et al.) zur Bestimmung der *KRAS*-Mutationen auf der Chip-Plattform eingesetzt. Aufgrund auftretender Unspezifitäten wurden nach umfangreichen Untersuchungen neue Sonden designt. Die Sonden wurden so konzipiert, dass die Punktmutation mittig in der Sondensequenz liegt (Tab. 5).

Tab. 2: Spezifische Sonden des *KRAS* Codon 12 für chipbasierte Analyse.

KRAS mutation	nach Berndt et al. 1998	Neue Sonden
wild type	TACGCC ACC AGCTCCAAC	GCCTACGCC ACC AGCTCC
c.34G>A	TACGCC ACT AGCTCCAAC	TACGCC ACT AGCTCCAA
c.34G>C	TACGCC ACG AGCTCCAAC	TACGCC ACG AGCTCCAA
c.34G>T	TACGCC ACA AGCTCCAAC	TACGCC ACA AGCTCCAA
c.35G>A	TACGCC ATC AGCTCCAAC	CTACGCC ATC AGCTCCA
c.35G>C	TACGCC AGC AGCTCCAAC	CTACGCC AGC AGCTCCA
c.35G>T	TACGCC AAC AGCTCCAAC	CTACGCC AAC AGCTCCA

Am Beispiel der homozygoten Zelllinie A549 konnte gezeigt werden, dass durch die neuen Sonden auf dem Chip eine deutlich Verbesserung der Spezifität erreicht werden konnte. (Abb.3). Am Beispiel der Zelllinie A549, die homozygot für c.34G>A ist, kann gezeigt werden, dass bei der Verwendung des von Berndt et al. adaptierten Sondendesigns ein falsch positives Signal für den Fall c34G>C detektiert wird. Durch die Verwendung des neuen Sondendesigns können falsch positive Signale verhindert werden und die KRAS-Kontrolle, die Wildtyp-Kontrolle und die Punktmutation c.34G>A können spezifisch nachgewiesen werden.

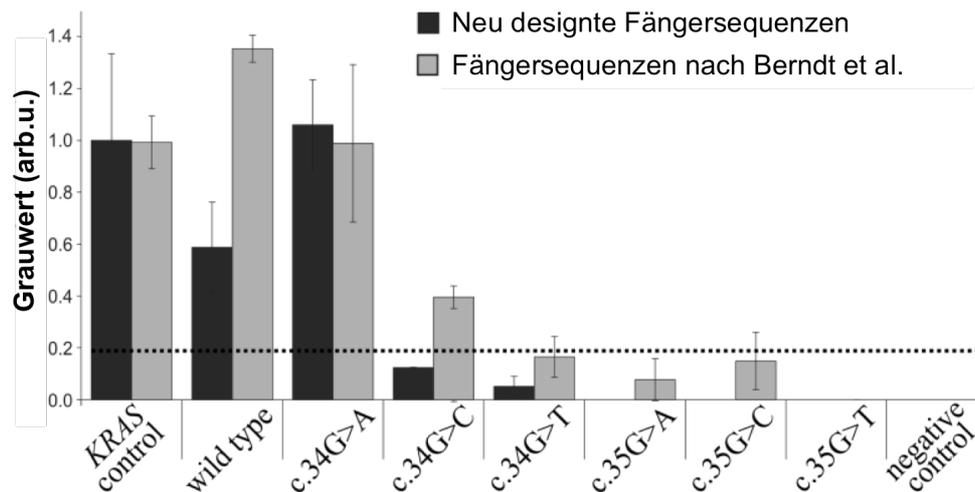


Abb.3: Untersuchung zur Spezifität der Sonden am Beispiel der Zelllinie A549 (homozygot, Mutation in c.34G>A).

Aufbauend auf den gewonnenen Erfahrungen wurde ein Multiparameter-Chip zur spezifischen Detektion relevanter *KRAS*-Mutationen erforscht (Tab. 5). Als Positivkontrolle dient eine Hybridisierungsreaktion in einem Bereich des *KRAS*-Amplikons, in dem keine Mutationen beschrieben sind.

Für die genaue Untersuchung spezifischer Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP), vorrangig für *KRAS*, konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Die Hybridisierungsbedingungen (Puffer, Temperatur, Reaktionsdauer) sowie die für die Sonden-Immobilisierung notwendigen Puffer und Oligonukleotid-Konzentrationen wurden für die Durchführung der Analyse in einem mikrofluidischen Durchfluss-Kammersystem validiert und optimiert. Die gesamte Analysedauer auf dem Chip beträgt 50 Minuten. Die 6 untersuchten *KRAS*-Sonden für das Codon 12 konnten somit erfolgreich getestet werden. Mit der erforschten Chipplattform ist es erfolgreich gelungen einzelne Mutationen zu unterscheiden.

Zur Validierung der Chip-Plattform hinsichtlich Spezifität und Sensitivität wurden verschiedene Zelllinien untersucht. Im Ergebnis konnte eine eindeutige Zuordnung der homo- bzw. heterozygoten Merkmalausprägung der jeweiligen Zelllinie erfolgreich nachgewiesen werden. In Abb. 4 ist dies beispielhaft für die Zelllinie SW480 (homozygot,

Mutation GGT) und der heterozygoten Zelllinie RPMI-8226 (Mutation GCT) dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch Normierung der erhaltenen Signale auf die Hybridisierungskontrolle. Ausgehend von einem prozessbedingten Hintergrundsignal wurde im Anschluss ein Schwellwert von 20 % festgesetzt. Alle detektierten Signale höher 20 % gehen als spezifische Signale in die Auswertung ein. Somit konnte die Spezifität der Chip-Plattform zur Detektion von Punktmutationen erfolgreich gezeigt werden.

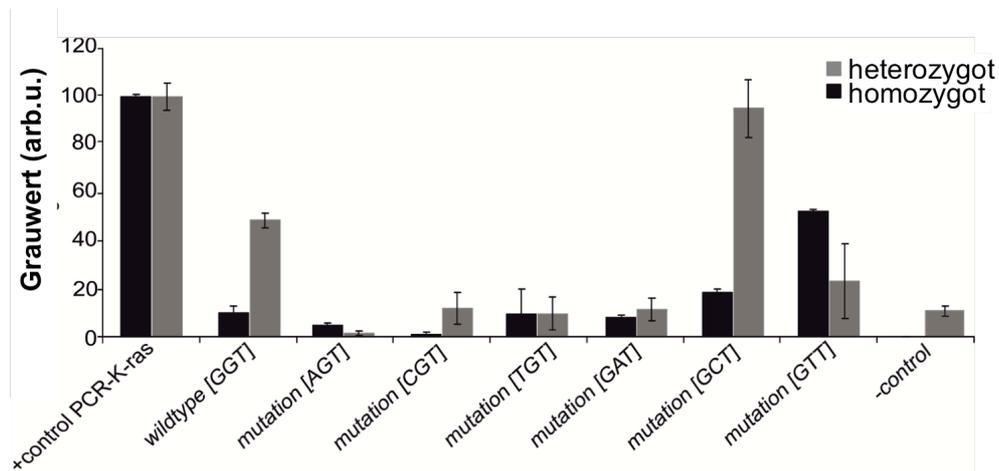


Abb.4: Chipbasierte Analyse von, aus zwei verschiedenen Krebszelllinien isolierter DNA -homozygote Zelllinie (SW-480 mit Mutation GGT) und heterozygote Zelllinie (RPMI-8226, Mutation) GCT)

Weiterhin wurden umfangreiche Untersuchungen zur Sensitivität, in Bezug auf den stets in einer Probe vorhandenen Wildtyp, durchgeführt. Zur Durchführung der Untersuchungen wurden Leukozyten in verschiedenen Verhältnissen zur heterozygoten Zelllinie RPMI-8226 zugegeben. Hierbei konnte eine Unterscheidung spezifischer Punktmutationen in bis zu 95% Wildtyphintergrund realisiert werden (Abb. 5). Die mitgeführte interne Hybridisierungskontrolle (*KRAS*-Kontrolle) zeigt die erfolgreiche Durchführung des Assays an und ist in beiden dargestellten Fällen positiv.

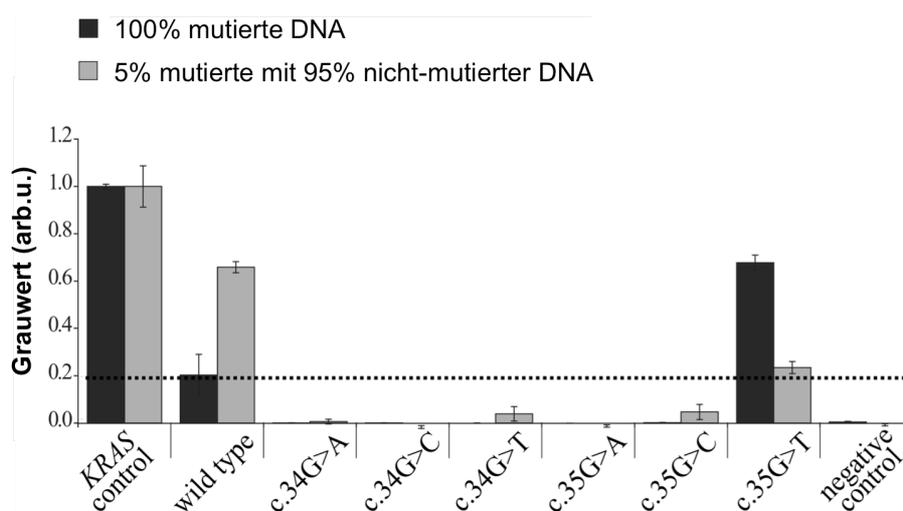


Abb.5: Bestimmung der Sensitivität der chipbasierten Analyse (Untersuchung verschiedener Zellmischungen bestehend aus RPMI-8226-Zellen und Leukozyten)

Parallel zu den umfangreichen Untersuchungen zur Erforschung der Sensitivität und Spezifität der entwickelten Sonden sowie der Optimierung und Anpassung der Assaychemie, war das Ziel im Teilvorhaben eine Chip-Plattform basierend auf einer elektrischen Nachweismethode zur Charakterisierung der zirkulierenden Tumorzellen zu erforschen. Hierzu wurden zunächst Untersuchungen an vorhandenen Glassubstraten mit siebgedruckten Elektrodenstrukturen durchgeführt. Die Chips wurden in Vorbereitung auf die Analyse chemisch vorbehandelt, um eine effiziente Immobilisierung der Sonden zu ermöglichen. In Abb. 6 ist das Ergebnis der chipbasierten Analyse der Capan-1-Zelllinie (homozygot, Mutation c.35G>T) dargestellt. Die Ereignisse wurden sowohl elektrisch (grau) als auch optisch (schwarz) ausgelesen. Der angegebene Schwellenwert von 20 % bezieht sich nur auf die optische Auswertung. Es kann erfolgreich gezeigt werden, dass die erwarteten Signale für die Positivkontrolle, die KRAS-Kontrolle und die Punktmutation c.35G>T spezifisch für die Zelllinie Capan-1 nachgewiesen werden können. Die elektrisch detektierten Signale sind dagegen jedoch sehr schwach und in sich sehr heterogen, so dass große Schwankungen auftreten.

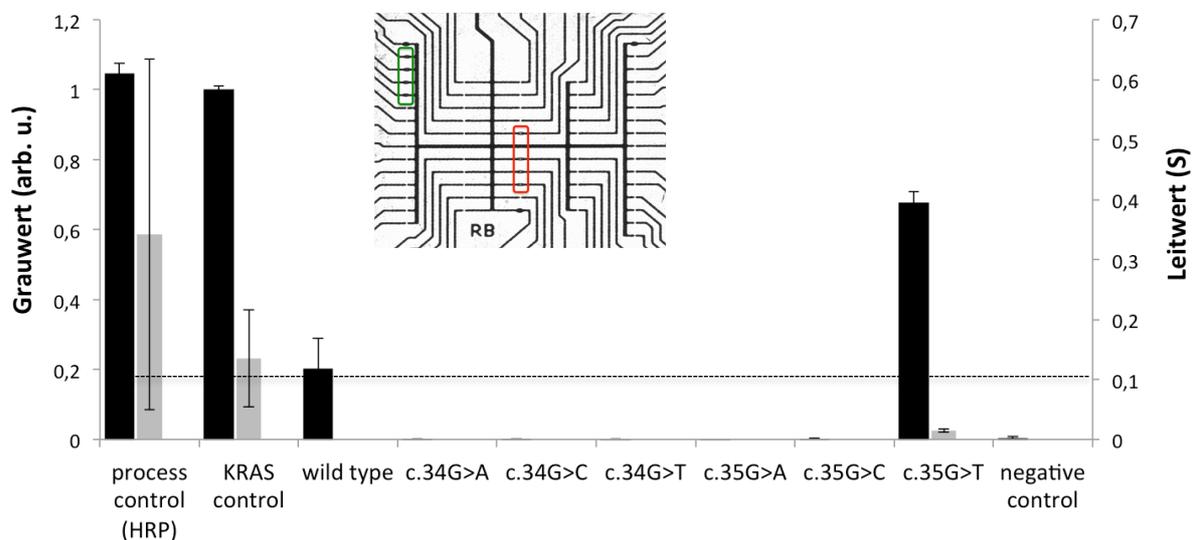


Abb. 6: Chipbasierte Analyse der Zelllinie Capan-1 (homozygot, Mutation c.35G>T)

Leider stellte sich heraus, dass eine elektrische Detektion mittels Änderungen in der Leitfähigkeit (Widerstandsmessungen) für diese Fragestellung nicht ausreichte, um geringe Änderungen und Ereignisse auf dem Chip zu erfassen. In enger Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG wurde daher an der Umsetzung neuer Strategien für eine elektrische Detektion (z.B. Kapazität, Impedanz) gearbeitet. Nach umfangreichen Prinzipstudien wurde festgelegt, dass eine elektrische Auslese zum jetzigen Zeitpunkt für die projektrelevante Fragestellung nicht geeignet ist. Parallel zur elektrischen Auslese wurde daher eine einfache optische Auslese mittels Grauwertbestimmung durchgeführt. Vorteilhaft ist dabei, dass durch die Abscheidung von Silberpartikel im Fall eines erfolgreichen Ereignisses, diese als schwarze (graue) Punkte selbst mit bloßem Auge detektierbar sind. Somit wurde für die

Entwicklung der chipbasierten Plattform vorrangig die einfache optische Detektion (Grauwertanalyse) durchgeführt. In Hinblick auf ein mobiles Gesamtsystem lässt sich diese Auswertetechnik einfach durch Smartphones integrieren.

Basierend auf dem optisch auslesbaren Chipsystem wurden erfolgreich Untersuchungen an Patientenmaterial durchgeführt. Hierzu wurde aus Paraffinschnitten isolierte genomische Patienten-DNA durch Prof. Yver Petersen und Dr. Yuan Chen (UKJ Pathologie) bereitgestellt. In Abb. 7 sind die erhaltenen Ergebnisse der erfolgreich durchgeführten chipbasierten Analyse von drei Patienten exemplarisch dargestellt, wobei Patient A und B verschiedene Mutationen aufweisen. Patient C trägt hingegen nur das Wildtyp-Codon.

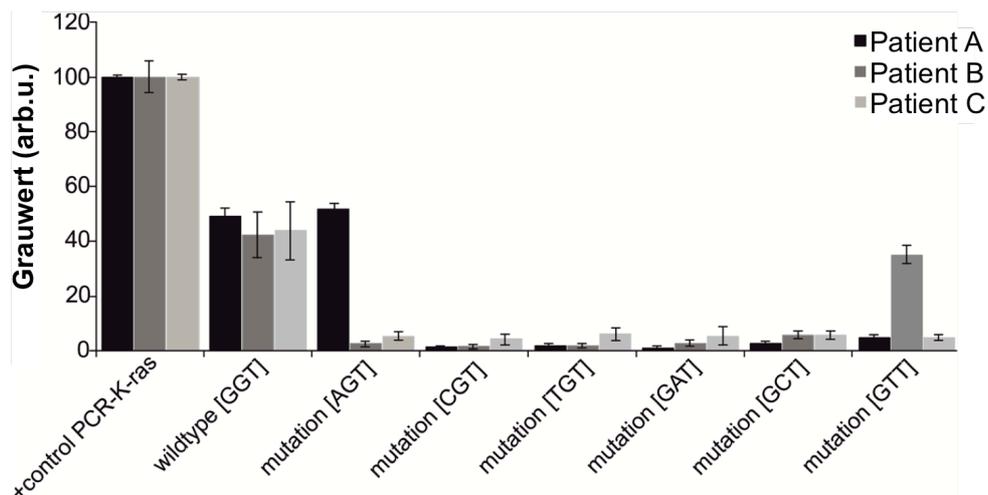


Abb.7: Chipbasierte Analyse von, aus 3 verschiedenen Patiententumoren (Paraffinschnitt), isolierter DNA - Patient 1 (Mutation AGT) Patient 2 (Mutation GCT) Patient 3 (Wildtyp)

Weiterhin kann anhand dieser Ergebnisse die Leistungsfähigkeit der chipbasierten Analyse gezeigt werden, da die Herausforderungen in der eindeutigen Charakterisierung von Mutationen in einer Patientenprobe bestehen. Zum einen sind *KRAS*-Mutationen im Patienten sehr häufig heterozygot ausgeprägt, des Weiteren handelt es sich bei dem Ausgangsmaterial um Tumorproben in denen gesunde und Krebszellen immer als Mischung vorliegen. Im Ergebnis der Untersuchungen konnte die Validierung der Chipplattform an 11 Patientenproben (Tab. 3) erfolgreich durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch die entsprechenden Sequenzierungsreaktionen vom Uniklinikum bestätigt.

Tab. 3: Bestimmung des KRAS Mutations-Status von klinischen Proben (Paraffin-Schnitte von Darmkrebs-Patienten) im Vergleich zu den Sequenzierungsergebnissen. Alle spezifisch detektierten Signale über dem Schwellenwert von 20 % sind in der Tabelle fett markiert.

Patient	Assay result † – Mittelwert der Grauwertanalyse (arb. u.)									Sequencing result ‡
	KRAS control	Wild type	c.34G>A	c.34G>C	c.34G>T	c.35G>A	c.35G>C	c.35G>T	negative control	
A	1.000 (+/-0.007)	0.489 (+/-0.030)	0.514 (+/-0.024)	0.012 (+/-0.006)	0.018 (+/-0.009)	0.011 (+/-0.006)	0.027 (+/-0.007)	0.047 (+/-0.008)	0.040 (+/-0.034)	c.34G>A
B	1.000 (+/-0.058)	0.422 (+/-0.081)	0.026 (+/-0.010)	0.015 (+/-0.008)	0.019 (+/-0.005)	0.024 (+/-0.010)	0.055 (+/-0.011)	0.350 (+/-0.034)	0.036 (+/-0.002)	c.35G>T
C	1.000 (+/-0.004)	0.438 (+/-0.105)	0.052 (+/-0.016)	0.041 (+/-0.020)	0.058 (+/-0.022)	0.054 (+/-0.031)	0.054 (+/-0.016)	0.048 (+/-0.009)	0.133 (+/-0.024)	wild type
D	1.000 (+/-0.291)	1.469 (+/-0.015)	0.021 (+/-0.007)	0.010 (+/-0.002)	0.015 (+/-0.003)	0.010 (+/-0.003)	0.015 (+/-0.007)	0.020 (+/-0.012)	0.004 (+/-0.002)	wild type
E	1.000 (+/-0.128)	0.932 (+/-0.086)	0.003 (+/-0.000)	0.002 (+/-0.002)	0.005 (+/-0.002)	0.002 (+/-0.001)	0.004 (+/-0.004)	0.013 (+/-0.017)	0.002 (+/-0.001)	wild type
F	1.000 (+/-0.151)	1.095 (+/-0.159)	0.023 (+/-0.011)	0.020 (+/-0.005)	0.022 (+/-0.010)	0.015 (+/-0.005)	0.029 (+/-0.014)	0.022 (+/-0.002)	0.021 (+/-0.011)	wild type
G	1.000 (+/-0.815)	5.467 (+/-0.255)	0.044 (+/-0.024)	0.023 (+/-0.015)	0.025 (+/-0.010)	1.181 (+/-0.209)	0.069 (+/-0.046)	0.018 (+/-0.002)	0.013 (+/-0.009)	c.35G>A
H	1.000 (+/-0.851)	3.472 (+/-0.360)	0.003 (+/-0.007)	0.014 (+/-0.006)	0.011 (+/-0.006)	-0.001 (+/-0.003)	0.005 (+/-0.016)	0.026 (+/-0.004)	0.021 (+/-0.013)	wild type
J	1.000 (+/-0.209)	0.529 (+/-0.175)	0.758 (+/-0.176)	0.005 (+/-0.002)	0.002 (+/-0.001)	0.001 (+/-0.001)	0.002 (+/-0.001)	0.003 (+/-0.004)	0.005 (+/-0.002)	c.34G>A
K	1.000 (+/-0.097)	1.790 (+/-0.029)	0.009 (+/-0.003)	0.009 (+/-0.005)	0.007 (+/-0.001)	0.766 (+/-0.052)	0.066 (+/-0.014)	0.013 (+/-0.005)	0.001 (+/-0.003)	c.35G>A
L	1.000 (+/-0.122)	1.173 (+/-0.015)	0.009 (+/-0.006)	0.004 (+/-0.003)	0.008 (+/-0.004)	0.003 (+/-0.000)	0.002 (+/-0.002)	0.006 (+/-0.001)	0.011 (+/-0.007)	wild type

Nach erfolgreicher Etablierung der chipbasierten, einfach optisch auslesbaren und mobil einsetzbaren Plattform zum Nachweis von *KRAS*-Mutationen wurden zusätzlich die Biomarker *BRAF* und *PIK3CA* sowie die Referenzgene *RPL13A* und *GUSbeta* in die Untersuchungen einbezogen. Hierzu wurden auf den jeweils untersuchten Chips alle Sonden für die Biomarker *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* sowie die Referenzgene *RPL13A* und *GUSbeta* (Tab. 8) immobilisiert. Diese wurden nach entsprechender Hybridisierung der Zielprodukte auf mögliche Kreuzkontaminationen und unspezifische Wechselwirkungen untersucht.

Tab.8: Biomarker-Sonden für *PIK3CA* und *BRAF* sowie Sonden der Referenz-Gene *RPL13A* und *GusBeta* für die chipbasierte Detektion.

Marker	Beschreibung	Sequence 5' - 3'	Modification
<i>RPL13A</i>	PCR positive Kontrolle	AGGACCTCTGTGTATTTGTCA	5'-NH ₂ -C6
<i>GusBeta</i>	PCR positive Kontrolle	CCAGACCCAGATGGTACTGC	5'-NH ₂ -C6
<i>PIK3CA</i>	PCR positive Kontrolle	GATCCAATCCATTTTTGTTGTCC	5'-NH ₂ -C6
	Wildtyp	GCCACCATGATGTGCATCA	5'-NH ₂ -C6
	c.3140 A>G	GCCACCATGACGTGCATCA	5'-NH ₂ -C6
<i>BRAF</i>	PCR positive Kontrolle	ATGGGACCCACTCCATCG	5'-NH ₂ -C6
	Wildtyp	ATCGAGATTTCACTGTAGCTAGA	5'-NH ₂ -C6
	c.1799 T>A	ATCGAGATTTCTGTAGCTAGA	5'-NH ₂ -C6

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Biomarker sehr gut unterschieden werden können und keine unspezifischen Wechselwirkungen mit den jeweils anderen Sonden auftraten. Der in TP 3.3 beschriebene Multiplex-PCR-Ansatz für die drei Biomarker *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* konnte erfolgreich im mikrofluidischen Chipaufbau untersucht werden. Beispielhaft sind in Abb. 8 die Ergebnisse für die Zelllinie MDA-MB-453 gezeigt, wobei die Zelllinien-spezifische Mutation im Marker *PIK3CA* nachgewiesen werden konnte. Die beiden anderen Marker *KRAS* und *BRAF* wurden jeweils als Wildtyp auf dem Chip erkannt.

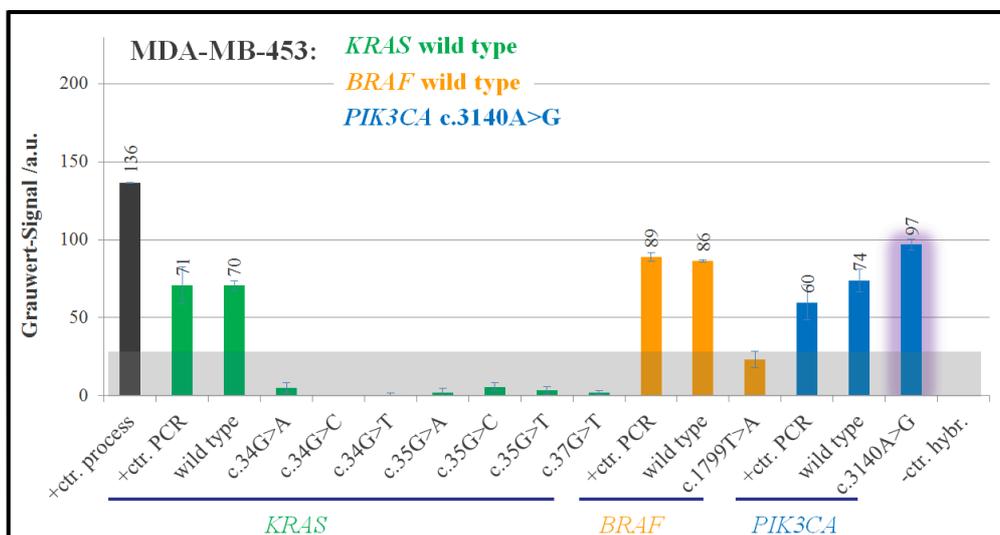


Abb.8: Chipbasierte Analyse der Multiplex-PCR-Produkte am Beispiel der Zelllinie MDA-MB-453

AP 4: Automatisierung und Miniaturisierung des Analysesystems

Aufbauend auf der am IPHT erforschten chipbasierten Technologie-Plattform wurden im Rahmen dieses Arbeitspaketes weiterführende Studien und Untersuchungen zur

Miniaturisierung und Automatisierung durchgeführt und in Hinblick auf die Überführung in ein fluidisches Gesamtsystem betrachtet.

TP 4.1.2: Technische Studien zur Miniaturisierung der Teillösungen und des Gesamtsystems

Für die Konzeption eines fluidischen Gesamtsystems wurden verschiedene Materialien und Komponenten auf ihre Eignung getestet. Insbesondere standen bei den Studien die drei Faktoren Robustheit, Kosteneffizienz sowie die Vermeidung von Kreuzkontaminationen im Vordergrund. Für das Flüssigkeitsmanagement wurden verschiedene Pumpen (Membran-, Schlauch- und Spritzenpumpen) getestet. Es kann festgehalten werden, dass vor allem ein Spritzenpumpensystem für einen Vor-Ort-Einsatz nicht geeignet ist, obwohl die Flüssigkeitsraten sehr exakt eingestellt werden können. Allerdings ist das System wenig robust und nicht kosteneffektiv. Auf dieser Basis wurden alle Komponenten und Materialien bewertet. Darüber hinaus wurden Silikon- und Teflonschläuche für die Flüssigkeitszufuhr untersucht. Um Kreuzkontaminationen zu verhindern wurden verschiedene Ventile z.B. Dreh- und Magnetventile, getestet. Schließlich standen auch Lichtschranken zur Fluidiküberwachung in Hinblick auf eine Automatisierung im Vordergrund der Arbeiten. Alle Ergebnisse wurden mit den Projektpartnern diskutiert und bewertet.

TP 4.1.4: Studien zur Interaktion der konzipierten Teillösungen und –module

In Zusammenarbeit mit den beteiligten Projektpartnern wurde im Rahmen dieses Arbeitspaketes die Funktionsfähigkeit aller konzipierten Teillösungen von der Separation bis zur Detektion erfolgreich untersucht. In einem fluidischen Aufbau konnten die Tumorzellen mittels Magnetpartikel separiert und nach einer anschließenden DNA-Isolierung (AJ, UKJ) erfolgreich am IPHT amplifiziert und detektiert werden.

TP 4.2: Definition der erweiterten Parameter

In Absprache mit den Projektpartnern wurden die Parameter für das Gesamtkonzept festgelegt. Als Modellsystem zur weiteren Validierung des Gesamtsystems wird die RPMI-Zelllinie 8226 eingesetzt.

TP 4.6: Entwicklung eines Moduls für die chipbasierte Analyse

Unter Nutzung der Ergebnisse der Prinzipstudien (TP 4.1) sowie der Definition der erweiterten Parameter (TP 4.2) konnte im Rahmen dieses Arbeitspaketes ein funktionaler Aufbau zur chipbasierten DNA-Analyse einzelner Mutationen erfolgreich realisiert werden. Aufbauend auf der bereits bestehenden Plattform konnten neue Materialien und Komponenten erfolgreich integriert und für biomedizinische Fragestellungen adaptiert werden (Abb. 9A). Parallel dazu wurde eine neuartige mikrofluidische Durchflussskammer (Abb. 9B) konzipiert und getestet. Erste Ergebnisse zum erfolgreichen chipbasierten DNA-Nachweis konnten in Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG in einem kompakten fluidischen Aufbau realisiert werden. Somit stehen zwei gleichwertige Module zur chipbasierten Analyse für die Integration in das Gesamtsystem zu Verfügung.

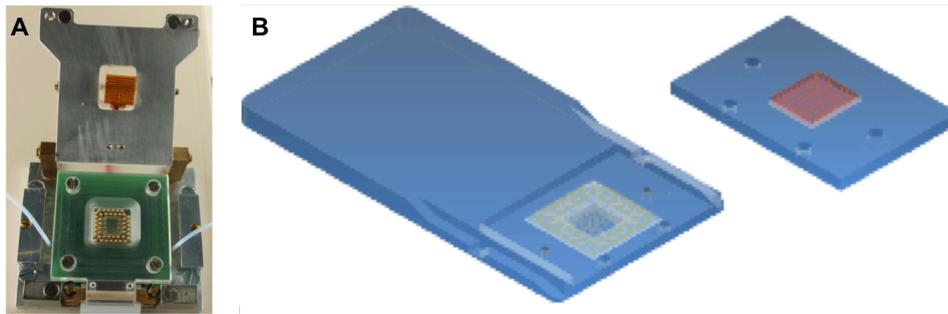


Abbildung 9: Eingesetzte mikrofluidische Durchflusskammer mit neuen Komponenten (A) sowie ein neuartiges Kammerdesign im Kartuschenformat (B)

AP 6: Testung und Validierung

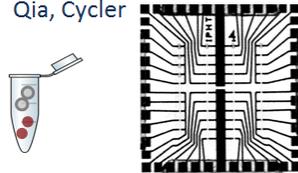
In Zusammenarbeit mit dem Verbundpartner Analytik Jena AG wird neben der chipbasierten Analyse ein qPCR-Ansatz verfolgt. Zur erfolgreichen Bearbeitung der Forschungsaufgaben bestand ein wesentlicher Schwerpunkt darin, entsprechende Sonden zu konzipieren, die sowohl eine Detektion bei der qPCR als auch bei der nachfolgenden on-Chip Hybridisierung erlauben. Die gesamte chipbasierte Analyse von der Separation der Zellen, der DNA-Isolation, der Hybridisierung und Signaldetektion konnte am Beispiel der eingesetzten Zelllinie RPMI-8226 erfolgreich gezeigt werden.

TP 6.1: Testung der einzelnen Module

In einem ersten Schritt wurden die einzelnen Teilmodule der Projektpartner hinsichtlich ihrer Funktionalität im Gesamtsystem untersucht. Hierzu wurden die erforschten Teillösungen der Zellseparation, DNA-Isolierung und Amplifikation mit kommerziell verfügbaren Verfahren und Methoden verglichen. Zur Validierung wurde jeweils eine Zellmischung bestehend aus 10% RPMI-8226-Zellen und 90% Leukozyten verwendet. Eine detaillierte Beschreibung der Ergebnisse ist den Berichten des UKJ und der Analytik Jena AG zu entnehmen. Die am Ende dieser Prozessschritte erhaltenen PCR-Produkte wurden am IPHT im chipbasierten, mikrofluidischen Aufbau charakterisiert. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dargestellt. Dabei wird die Verwendung kommerziell erhältlicher Komponenten als „konventioneller Workflow“ und der Einsatz im Projekt erforschter Teillösungen als „Innovativer Workflow“ bezeichnet. Ein Vergleich der erzielten Ergebnisse zeigt, dass mit Hilfe der im Projekt erforschten Teillösungen sehr gute und vor allem spezifische Signale erhalten wurden. Das Auftreten unspezifischer Signale konnte nahezu verhindert werden. Die gesuchte Mutation der RPMI-8226-Zelllinie (GCT) wurde erfolgreich detektiert.

Konventioneller Workflow

→ Separation MACS:
Qia, Cycler



Innovativer Workflow

→ Separation chamber:
BCT, Mobi-lab

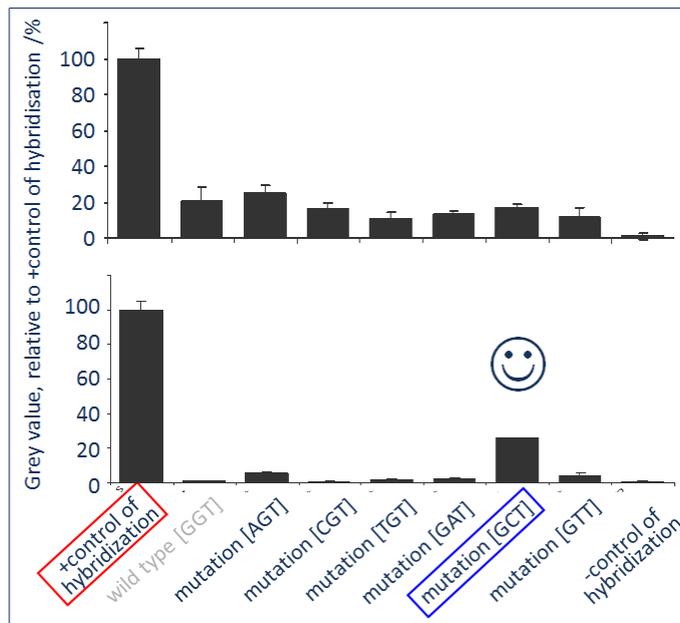
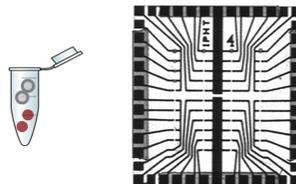


Abb. 10: Vergleich des konventionellen mit dem neu entwickelten innovativen Arbeitsablauf. Die Mutation [GCT] konnte mit dem neuen Protokoll erfolgreich nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte erfolgreich die Kompatibilität der Teilmodule der Real-Time PCR und dem chipbasierten DNA-Nachweis untersucht werden. Hierzu wurde das aus der Real-Time PCR erhaltene Produkt (bestehend aus der *KRAS*-Mutation c.35G>C und der Referenz-Marker *RPL13A* und *GusBeta*) für die Hybridisierung auf dem Chip eingesetzt. In Vorexperimenten wurden die Sonden so designt, dass die eingesetzten TaqMan-Sonden eine nachfolgende Hybridisierung auf dem Chip nicht behindern. Die erwarteten Signale für die *KRAS*-Mutation sowie für die Referenz-Gene konnten erfolgreich detektiert werden. Der Funktionsnachweis der gesamten Analyseketten ist in TP 6.3 dargestellt.

TP 6.2: Anpassung der Module

Aufbauend auf den Ergebnissen der Untersuchungen in TP 4.2 sowie TP 6.1 wurde das Modul zur chipbasierten Analyse angepasst. Weiterhin wurden verschiedene Strategien zur Kopplung der Teilmodule in das Gesamtsystem in enger Zusammenarbeit mit der Analytik Jena AG diskutiert. Die Ergebnisse sind in TP 6.3 zur Validierung des Labormusters eingegangen.

TP 6.3: Validierung des Labormusters sowie Tests mit definierten Proben

Nach erfolgter Anpassung der einzelnen Module in AP 6.2 wurde ein modulares, mobil einsetzbares Labormuster zur Isolierung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen im Gesamtverbund realisiert sowie mit definierten Proben validiert. Der definierte Meilenstein 2 konnte somit erfolgreich erfüllt werden. Alle Teilmodule erfüllen ihre Funktion und wurden in ihrer Gesamtheit geprüft sowie entsprechend durch die Projektpartner validiert.

Die Validierung des Labormusters erfolgte mit RPMI-8226 versetzten Blutproben. Der Gesamtdurchlauf beinhaltet die Module Zellseparation, DNA-Isolation, Real-Time PCR (TaqMan-PCR) und anschließende chipbasierte Analyse. Dies wurde in enger Zusammenarbeit aller Verbundpartner durchgeführt.

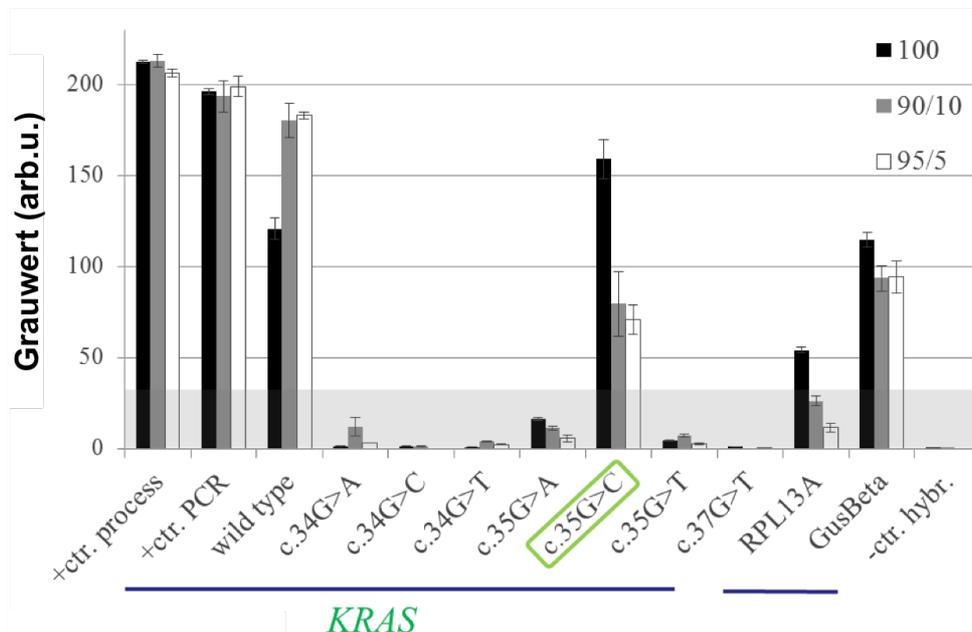


Abb.11: Chipbasierte Analyse von Zell-Proben im Cycler.

In Abbildung 11 ist das Ergebnis der erfolgreichen chipbasierten Analyse verschiedener Zellmischungen nach Durchführung aller vorherigen Prozessschritte dargestellt. Abweichend vom erforschten Gesamtsystem wurde die Amplifikation in einem von der Analytik Jena AG zur Verfügung gestellten Cycler durchgeführt. Neben dem spezifischen Nachweis der gesuchten *KRAS*-Mutation c.35G>C sowie der Referenz-Marker *RPL13A* und *GusBeta* konnte die *KRAS*-Mutation c.35G>C sogar bei nur 5% RPMI-8226-Zellen im Ausgangsmaterial nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten alle Prozesskontrollen sowie der Wildtyp detektiert werden, was die Funktionsweise der chipbasierten Analyse erfolgreich widerspiegelt.

Aufbauend auf diesem Erfolg wurde eine mit 10 % RPMI-8226 versetzte Probe mit dem modularen, mobil einsetzbaren Gesamtsystem untersucht (Abb. 12). Zur Amplifikation wurde eine miniaturisierte PCR-Kartusche von seitens der Analytik Jena AG eingesetzt. Trotz der geringen Ausbeute an erhaltenem PCR-Produkt im Vergleich zur Amplifikation in einem kommerziellen PCR-Cycler (Ergebnisse aus Abb. 11) konnten die gesuchte *KRAS*-Mutation sowie die beiden Referenz-Marker erfolgreich nachgewiesen werden.

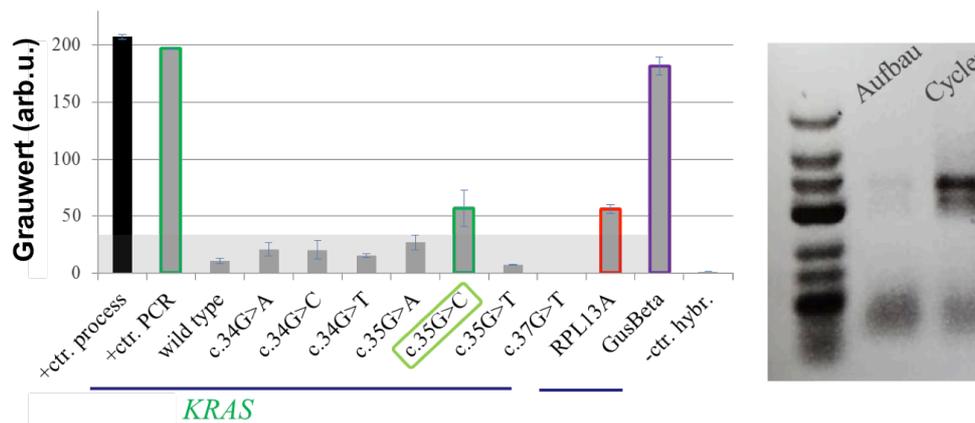


Abb. 12: Ergebnis des Durchlaufs aus der Gesamtkartusche (Zell-Separation/DNA-Isolation) mit nachfolgender multiplex-PCR im optimierten PCR-Modul (AJ).

TP 6.4: Bewertung der Komponenten und Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Rahmen des vorliegenden Teilvorhabens eine einfache chipbasierte Nachweismethode zur Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen erfolgreich erforscht werden konnte. Die Herausforderung bestand dabei insbesondere in der Etablierung einer zuverlässigen und dezentral einsetzbaren Nachweismethode von den oft im Blut vorhandenen sehr niedrigen Tumorzellzahlen.

Insgesamt konnte im Rahmen des Teilvorhabens die chipbasierte Nachweismethode für die biomedizinische Fragestellung optimiert und angepasst sowie an verschiedenen Probenmatrices (Zelllinien, Paraffinschnitte von Patiententumoren, mit Zelllinien versetzte Blutproben) erfolgreich untersucht werden. Es wurden innovative Lösungsansätze zur Automatisierung und Einbindung der chipbasierten Analyse in ein Gesamtsystem erarbeitet und in Teilen umgesetzt. In weiterführenden Arbeiten ist es notwendig, diese Teillösung in ein fluidisches Gesamtkonzept zu integrieren. Darüber hinaus ist eine Zusammenführung einzelner Prozessschritte innerhalb der chipbasierten Analyse notwendig, um in diesem Zusammenhang Prozessschritte zu vereinfachen. Derzeit besteht die chipbasierte Analyse aus 7 Einzelschritten, wofür verschiedene Reagenzien bereitgestellt werden müssen. Hier ist es notwendig neue Assaykomponenten zu erforschen, die eine Vereinfachung der Prozessschritte ermöglichen, was insbesondere in Hinblick auf eine dezentral einsetzbare Diagnostik wünschenswert ist.

2.2 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Zur erfolgreichen Bearbeitung der Forschungsaufgaben die gesamte Prozesskette der Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen in ein mobiles Gesamtsystem zu integrieren, war die Beteiligung aller Projektpartner essentiell. Im Bereich der chipbasierten Analytik und der Anwendung von metallischen Nanopartikeln in der Bioanalytik bestanden bereits

umfangreiche Erfahrungen am IPHT. Diese Erfahrungen konnten durch die vorangegangenen Arbeiten weiter ausgebaut werden. Somit sind jetzt Analysen von Zellkulturextrakten, Tumorproben und CTCs bis zur Detektion von Punktmutationen möglich. Nur durch die Nutzung der vorhandenen Infrastruktur und der geförderten Personal- und Verbrauchsmittel konnten die Arbeitsziele umgesetzt und eine Anpassung des Systems an auftretende Probleme schnell vorgenommen werden.

2.3 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die im Teilvorhaben erzielten Ergebnisse wurden vor allem auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert. Darüber hinaus sind zwei Veröffentlichungen ausgewählter Teilergebnisse in referierten Fachzeitschriften in Planung.

Weiterhin werden die erzielten Ergebnisse für die Lehre und Ausbildung von Fachkräften genutzt. Dazu werden z.B. Forschungspraktika für Studierende angeboten, in denen sie selbstständig in einem vorgegebenen Zeitraum eine Fragestellung bearbeiten werden.

Die gewonnenen Erfahrungen werden zum Einwerben neuer Forschungsvorhaben herangezogen. Dabei soll die im Projekt erzielte interdisziplinäre und gute Zusammenarbeit der Kooperationspartner weiter gestärkt und regional sowie überregional ausgebaut werden. Darüber hinaus ist geplant, neue Ansätze in Projektvorhaben des Forschungscampus InfectoGnostics zu integrieren. Weiterhin sind Erkenntnisse aus dem Teilvorhaben in Projektskizzen eingeflossen, die im Rahmen der POCT-Ausschreibung vom 31.07.2014 beim BMBF eingereicht worden.

2.4 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Betrachtet man die komplette Analysemesskette von der Separation der Zellen, DNA-Isolation, Amplifikation und chipbasierte Detektion, so sind verschiedene Teilkomponenten und Systeme realisiert, die im Folgenden diskutiert werden.

In den vergangenen Jahren wurden Verfahren zur selektiven Anreicherung bzw. Isolation und Analyse zirkulierender Tumorzellen weiterentwickelt. Eine große Herausforderung stellt hierbei die Tatsache dar, dass CTCs nur in sehr geringer Anzahl (1 CTC je ml) im Patientenblut vorkommen und somit mittels physikalischer oder immunbiochemischer Verfahren vor der molekularen Analyse angereichert werden müssen. Ein aktuelles, FDA-zugelassenes Verfahren zur CTC-Isolation bei Brust-, Colon- und Prostata-Krebspatienten ist das CellSearch®-System (Veridex/ Johnson & Johnson), welches mittels immunomagnetischer Separation EpCAM als Zielmolekül auf der CTC-Oberfläche adressiert. Weiterhin sind einige Mikrochip-basierte Plattformen weiterentwickelt worden, um ebenfalls über Antikörper-

Antigen-Interaktionen selektiv CTCs anzureichern und anschließend den Mutationsstatus von Biomarkern bestimmen zu können. Interessant ist auch ein Ansatz bei dem mittels eines „magnetischen Siebes“ CTCs separiert und analysiert wurden.

Der Nachweis bzw. Ausschluss diverser Mutationen prädiktiver Biomarker wie EGFR, KRAS, BRAF oder PI3K wird primär durch qPCR Varianten oder chipbasierte Verfahren realisiert, wobei vermehrt eine Separation und Analyse modular miteinander verknüpft wird.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass zum derzeitigen Zeitpunkt nur das CellSearch®-System etabliert und von der FDA zugelassen ist. Dies beruht allerdings auf der Anfärbung der CTCs mit monoklonalen Cytokeratin-Antikörpern. Eine molekulare Information wie mit unserem in MiNa-CTC erforschten Ansatz kann nicht erreicht werden. Für alle anderen chipbasierten Verfahren ist die Durchführung klinischer Studien zur Zeit nicht bekannt.

Ausgewählte Literatur:

Krebs et al., 2014 “Molecular analysis of circulating tumour cells – biology and biomarkers”; Nature Reviews Clinical Oncology 11

Balic et al., 2012 „Progress in circulating tumor cell capture and analysis: implications for cancer management“; Expert Rev Mol Diagn 12(3)

Costa et al., 2014 “Biosensors for the detection of circulating tumour cells”; Sensors 14

Earhart et al., 2014 “Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips”, Lab Chip 14

Hong & Zu 2013 “Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends”; Theranostics 3(6)

Harb et al., 2014 “Mutational Analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay”, Translational Oncology 6(5)

2.5 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus dem Projekt MiNa-CTC wurden in referierten Zeitschriften sowie auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert. Im Folgenden sind die wissenschaftlichen Beiträgen und Tagungsteilnahmen zusammengefasst. Schließlich hat das IPHT auch zu Qualifikationsarbeiten beigetragen.

Wissenschaftliche Beiträge:

Publikationen in referierten Fachzeitschriften

“KRAS mutation screening by chip-based DNA hybridization - a further step towards personalized oncology”, Christine Steinbach, Carolin Steinbrücker, Sibyll Pollok, Katharina Walther, Joachim H. Clement, Yuan Chen, Iver Petersen, Dana Cialla-May, Jürgen Popp and Karina Weber, eingereicht.

„SNP detection of the biomarker KRAS by employing common plastic foils as sensor material“, Christine Steinbach, Sibyll Pollok, Dana Cialla-May, Jürgen Popp and Karina Weber, in Vorbereitung.

Tagungsbeiträge:

Vorträge

16. Heiligenstädter Kolloquium „Technische Systeme für die Lebenswissenschaften“, 24.9.-26.9.2012, Heilbad Heiligenstadt/Deutschland, „Personalisierte Medizin: Genetische Analyse zirkulierender Tumorzellen mittels eines mikrofluidischen Chipsystems“, Christine Steinbach, Karina Weber, Jürgen Popp.

Poster

Functional Genomics and Proteomics - Applications, Molecular Diagnostics & Next Generation Sequencing, 2.2.-3.2.2012, Frankfurt/Main, Deutschland, “Chip-based electrical detection of CTCs (Circulating Tumor Cells)“, Christine Steinbach, Karina Weber, Jürgen Popp.

CLINAM 5/12 European Summit for Clinical Nanomedicine 2012, 7.5.-9.5.2012, Basel, Schweiz, “Chip-based molecular profiling of circulating tumour cells for individualized cancer treatment“, Christine Steinbach, Sibyll Pollok, Karina Weber, Jürgen Popp.

Internationales Symposium DNA-Nano Sensors, 10.5.-12.5.2012, Jena, Deutschland, “Towards personalized medicine: Genetic analysis of circulating tumour cells based on electrical and optical technologies“, Christine Steinbach, Karina Weber, Jürgen Popp.

14th Leibniz Conference of Advanced Science “Sensorsysteme 2012“, 18.10.-19.10.2012, Lichtenwalde, Deutschland, “Monitoring diagnostischer Biomarker mittels chipbasierter Analysetechniken“, Carolin Steinbrücker, Christine Steinbach, Karina Weber, Jürgen Popp.

8. Deutsches Biosensor Symposium, 10.3.-13.3.2013, Wildau/Deutschland, „Monitoring diagnostischer Biomarker mittels chipbasierter Analysetechniken“, Christine Steinbach, Carolin Steinbrücker, Karina Weber, Jürgen Popp.

6th Postgraduate Symposium on Cancer Research, 26.4.2014, Dornburg/Deutschland, “Multiplex detection of cancer biomarkers by a simple naked eye assay“, Christine Steinbach, Sibyll Pollok, Karina Weber, Jürgen Popp.

Qualifizierungsarbeiten:

Masterstudiengang „Chemische Biologie“ der FSU Jena, Modul „MCP P5: Interdisziplinäres Arbeiten: Praktikum“, Wintersemester 2013/2014.

Dissertationsschrift Christine Steinbach, in Vorbereitung.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Schlussbericht
3a. Titel des Berichts Gesamtvorhaben: Erarbeitung eines mobilen mikrosystemtechnischen Gesamtsystems für Anreicherung, Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (MiNa-CTC) Teilvorhaben IPHT: Entwicklung eines chipbasierten Nachweises zur parallelen Identifikation von Tumor-spezifischen Markern	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Weber, Karina Popp, Jürgen	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.06.2014
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT) Albert-Einstein-Straße 9 07745 Jena	9. Ber.Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 16SV5432
	11a. Seitenzahl Bericht 28
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben 32
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	14. Tabellen 8
	15. Abbildungen 11
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Die Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen stellt ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel für das Therapiemonitoring und die Therapieoptimierung bei Krebspatienten dar. Im Fokus des Verbundvorhabens „MiNa-CTC“ stand daher die Erforschung und Realisierung eines miniaturisierten, kostengünstigen, zuverlässigen, effizienten und mobilen Gesamtsystems für die Anreicherung, den Nachweis und die Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen. Das Teilvorhaben des IPHT befasst sich dabei insbesondere mit der Erforschung einer chipbasierten Nachweismethode zur Detektion verschiedener Tumor-spezifischer Marker. Hierbei wurden insbesondere die Biomarker <i>KRAS</i> , <i>PIK3CA</i> und <i>BRAF</i> sowie im Hinblick auf eine mögliche Real-Time Amplifikation die Referenzgene <i>RPL13A</i> und <i>GusBeta</i> betrachtet. Im Ergebnis steht eine optisch auslesbare und miniaturisierte Chip-Plattform zum spezifischen Nachweis von Punktmutationen, die als Teillösung in ein Gesamtsystem integriert werden konnte. Das modular aufgebaute Gesamtsystem konnte erfolgreich an verschiedenen Probenmatrices validiert werden und stellt die Basis für ein zukünftig dezentral einsetzbares System zum Therapiemonitoring dar.	
19. Schlagwörter Chipbasierter DNA-Nachweis, Punktmutation, Biomarker, <i>KRAS</i> , Hybridisierung, optische Detektion	
20. Verlag	21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) report
3. title MiNa-CTC – Development of a miniaturized, cost-efficient, reliable and mobile system to enrich, to detect and to characterize circulating tumor cells Characterization of specific tumor markers applying a chip based detection technique	
4. author(s) (family name, first name(s)) Weber, Karina	5. end of project 30/06/2014
	6. publication date
	7. form of publication report
8. performing organization(s) (name, address) Leibniz Institute of Photonic Technology e.V. Albert-Einstein-Straße 9 (Beutenberg Campus) 07745 Jena Germany	9. originator's report no.
	10. reference no.
	11. no. of pages 28
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 32
	14. no. of tables 8
	15. no. of figures 11
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	
18. abstract The investigation of predictive biomarkers can help to improve therapeutic options for an individual cancer patient. Therefore, the project "MiNa-CTC" focussed their research on a miniaturized, cost-efficient, reliable and mobile system to enrich, to detect and to characterize circulating tumour cells. Here, an on-chip hybridization technique is presented to screen therapeutic relevant biomarkers like KRAS, BRAF and PIK3CA as well as reference genes like RPL13A und GusBeta. The established DNA chip-based platform enables the reliable discrimination of selected mutations by allele-specific hybridization. The generated robust endpoint signals by means of silver deposits allow a simple optical readout. The applicability of our assay was successfully proven for various cancer cell lines as well as clinical tumour samples implemented in the whole analysis chain. Thus, the chip-based DNA hybridization technique seems to be a promising application tool to further improve personalized cancer treatment.	
19. keywords chip based DNA detection, biomarker, lab-on-a-chip-system, KRAS mutation, single nucleotid polymorphism (SNP), personalized oncology	
20. publisher	21. price