

Isolierung und Signalweg-Analytik von Stammzellen solider Tumoren

Dr. U. Kübler, Dr. J. Schnepel ^[#]

Jahrestagung Deutsche Menopause Gesellschaft e.V., Frankfurt 2012

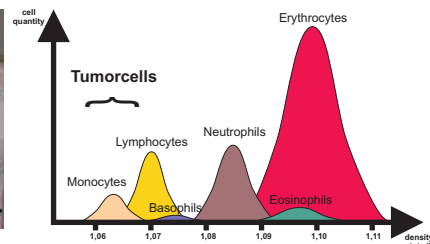
Krebs ist eine Erkrankung nicht regelbarer Stammzellen. Die Dr. Kübler GmbH verfügt über ein patentiertes System zur Isolierung, Quantifizierung und molekularen Charakterisierung dieser Zellen. Nach Auflösung epithelialer Zellschichten finden sich in der Blutbahn Tumor-Stammzellen, welche die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben und welche die Heterogenität sowohl des Primärtumors als auch der disseminierten Zellen widerspiegeln. Die Zellen verändern also ihre zellspezifischen Eigenschaften und erlangen dadurch Migrationsfähigkeit und Invasivität. Das frühzeitige Erkennen dieser Zellen bedeutet eine Revolution in Vorsorge, Diagnostik und Therapie. Die Zahl der zirkulierenden Tumor-Stammzellen korreliert mit dem Verlauf und dem Stadium der Erkrankung. Die molekulare Charakteristik dieser Tumor-Stammzellen ist entscheidend für die Wahl des richtigen Therapeutikums. ^[1-9]

EMT (Epithelial-mesenchymale Transition)

Tumorzellen erlangen durch die Epithelial-mesenchymale Transition die Fähigkeit zur Migration. Der Epithelial-mesenchymale Charakter dieser Zellen wird durch Überexpression bzw. Amplifikation von Oct-3/4, c-met und ZEB1 nachweisbar. Haben diese Zellen auch den angiogenetischen Switch vollzogen (vermehrte VEGF Bildung), können sie Blutgefäße rekrutieren, sind teilungsaktiv und invasiv (myc, ras, p53m, uPA). ^[1, 10-13]

Diagnostische Apherese

Die Diagnostische Apherese ermöglicht die biopsiefreie und quantitative Gewinnung von Tumor-Stammzellen aus der Blutbahn, sowie deren vollständige molekular-pathologische Charakterisierung. ^[7,16]



Verfahren

Dieses Verfahren erlaubt:

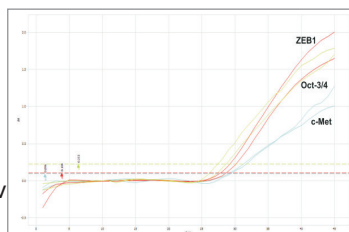
1. den biopsiefreien Nachweis zirkulierender Tumor-Stammzellen
2. die Quantifizierung dieser Zellen
3. deren komplette molekulare Charakterisierung: c-Met, Oct-3/4, GFAP, EGFR, erb/B2, erb/B3, myc, ras, p53m, MDR, CD44v5/v6, VEGF, Akt/mTOR, IDO, Survivin, Urokinase

Diese Tumor-Stammzellen rekrutieren sich eigene Blutgefäße, sie sind angiogenetisch aktiv, sie warten und proliferieren in sog. Stammzell-Nischen, wo sie sich dem Zugriff des Skalpells entziehen. Sie sind chemo- und strahlenresistent. ^[1-4, 10-13]

Nach Isolierung und Kultivierung der Tumor-Stammzelle verwenden wir deren komplettes antigenes Material zur Immunisierung des Patienten und zur Auslösung einer NK-Zell-Antwort. Zusätzlich setzen wir biologische Deacetylierungs-Hemmstoffe und Protease-Inhibitoren ein, die die weitere Entartung der Tumor-Stammzelle und deren Invasionspotential abfangen. Insbesondere vermeiden wir den Evolutionsdruck auf die Tumor-Stammzelle durch die toxische Chemo- und Strahlentherapie. Auf diese Weise verlängern wir das Überleben des Patienten mit nicht-toxischen Mitteln bei Erhalt der Lebensqualität.

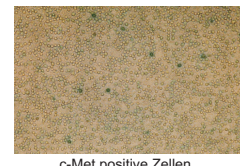
Real-Time RT-PCR

Mit Hilfe der Real-Time RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) lassen sich zirkulierende Zellen mit gestörter epithelio-mesenchymaler Transition in der Blutbahn qualitativ nachweisen. ^[4, 5, 11, 12, 14]



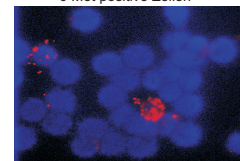
Detektion

Ein speziell entwickelter ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay) sowie die Anwendung der FISH-Analytik (fluorescence in situ hybridisation) erlaubt den Einzelzell-Nachweis und somit eine Quantifizierung. Durch die Bestimmung molekularer Biomarker wird ein Expressionsprofil der zirkulierenden Tumor-Stammzelle erstellt. ^[7,15]



c-Met positive Zellen

Oct-3/4 positive Zellen

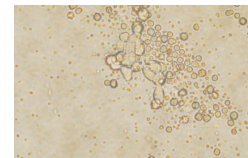
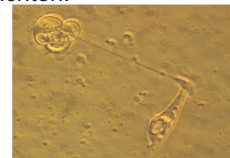


MET Genamplifikation

c-erbB2 Genamplifikation

Therapeutische Konsequenzen

Eine kombinierte Immuntherapie mit natürlichen Killerzellen und Heat-Shock-Proteinen kann Tumor-Stammzellen gezielt attackieren und vernichten. ^[7]



NK-Zellen

Literatur

- ^[1] EMT, cancer stem cells and drug resistance, emerging axis of evil, Shing, A., Settleman, J., *Oncogene* 2010, 29, 4741-4751.
- ^[2] p53 regulates epithelial mesenchymal transition and stem cell properties through modulating mi-RNAs, Chang, C., *et al.*, *Nature Cell Biology* 2011, 13, 317-323.
- ^[3] Cancer Stem Cells, Jordan, CT., Guzman, ML., Noble, M., *N. Engl. J. Med.* 2006 355;12, 1253-61.
- ^[4] c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases, Takeuchi, H., *et al.*, *Clin Cancer Res* 2003, Vol.9, 1480-1488.
- ^[5] Tumor cells circulate in the blood of all major carcinomas, but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, Allard *et al.*, *Clin Can Res* 2004, 10, 6897-6904.
- ^[6] The evidence for Cancer Stem Cells, Niederhuber, J., (NCI, Bethesda) 5th Int. H.F.C. Behr-Symposium 2008, DKFZ Heidelberg.
- ^[7] Dr. Kübler GmbH Deutsches Bundespatent 4228389; Europ. Patent 0.584.715; US-Patent 5,529,903; Japan. Patent JP 211352.
- ^[8] Nachweis von Tumorstammzellen leitet Paradigmenwechsel ein Deutsches Ärzteblatt Heft 27, 07. Juli 2006.
- ^[9] Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing, Gerlinger, M., *et al.*, 2012, *N. Engl. J. Med.*, 366(10), 883-892.
- ^[10] Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies, Thiery, JP., 2003, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15, 740-746.
- ^[11] Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, Thiery, JP., *et al.* 2009, *Cell* 139, 871-890.
- ^[12] The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, Mani, SA., 2008, *Cell* 133, 704-715.
- ^[13] Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits, Polyak, K., Weinberg, RA., 2009, *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.
- ^[14] Circulating Prostate Specific Antigen-positive cells correlate with metastatic Prostate Cancer, Hamdy FC., *et al.*, 1992, *Br J Urol*, 69(4), 392-396.
- ^[15] Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, Slamon, DJ., *et al.*, 1987, *Science* 235, 177-182.
- ^[16] Isolation and Characterization of Circulating Cancer Cells as Vaccine Candidates, Dr. Kübler GmbH, Cancer Vaccines 1996, New York.

Weiterführende Literatur unter www.kueblergmbh.com