



**Genexpressionsanalyse einzelner CTCs
zur Charakterisierung der inter-zellulären
Heterogenität hinsichtlich endokriner
Resistenzmechanismen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Florian Reinhardt
aus Stuttgart

Düsseldorf, Januar 2019

aus dem Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Hans Neubauer
2. Prof. Dr. Constantin Czekelius
3. Prof. Dr. Tanja Fehm

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2019

Für meine Familie

Tagungsbeiträge

Reinhardt F. et al. Single cell transcriptional profiling of Circulating Tumor Cells (CTCs): Intra-patient heterogeneity of endocrine resistant and phenotypic markers; 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., Berlin, 2018

Meier-Stiegen F., Jäger B., **Reinhardt F.**, Naskou J., Franken A., Neubauer H., Driemel C., Ruckhäberle E., Niederacher D., Fischer J.C., Stoecklein N.H., Fehm T. Überprüfung der klinischen Sicherheit der Diagnostischen Leukapherese zur Anreicherung Zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit primärem und metastasiertem Mammakarzinom; 9. Wissenschaftliches Symposium der Kommission TraFo der AGO, Düsseldorf, 2018

Reinhardt F. et al. Single cell profiling of Circulating Tumor Cells (CTCs): Intra-patient transcriptional heterogeneity of endocrine resistant and phenotypic markers; 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Berlin, 2018

Reinhardt F. et al. Single cell profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional intra-patient heterogeneity of endocrine resistant and phenotypic markers; 11th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Montpellier, 2018

Neubauer H., Franken A., Driemel C., Lampignano R., Behrens B., **Reinhardt F.**, Niederacher D., Stoecklein N.H., Fischer J.C. and Fehm T. Isolation of viable CTCs from leukapheresis product with parsortix system enables subsequent culture; San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 2017

Reinhardt F. et al. Multiplex Real-Time PCR zur Phänotypisierung heterogener Subpopulationen zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten Mammakarzinom; 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Berlin, 2017

Reinhardt F. et al. Phänotypisierung heterogener Subpopulationen zirkulierender Tumorzellen mittels multiplex Real-Time PCR bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom; 8. Wissenschaftliches Symposium der Kommission TraFo der AGO, Düsseldorf, 2017

Reinhardt F. et al. Charakterisierung heterogener Subpopulationen zirkulierender Tumorzellen mittels Multiplex Real-Time PCR bei Patientinnen mit metastasiertem

Mammakarzinom; XXV. Akademische Tagung Deutschsprachiger Hochschullehrer der Gynäkologie und Geburtshilfe, Mannheim, 2017

Publikationen

Reinhardt F. et al. Navigation through inter- and intratumoral heterogeneity of endocrine resistance mechanisms in breast cancer: A potential role for liquid biopsies? *Tumour Biology*. 2017;39(11):1010428317731511

Reinhardt F. et al. Diagnostic Leukapheresis enables reliable transcriptomic profiling of single circulating tumor cells to characterize inter-cellular heterogeneity in terms of endocrine resistance. *In preparation*

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	NEOPLASIE.....	1
1.2.	KARZINOGENESE.....	2
1.3.	MAMMAKARZINOM.....	3
1.3.1.	<i>Epidemiologie und Ätiologie.....</i>	<i>3</i>
1.3.2.	<i>Stadieneinteilung und molekulare Subtypen.....</i>	<i>4</i>
1.3.3.	<i>Therapieoptionen.....</i>	<i>5</i>
1.3.3.1.	Endokrine Therapie.....	5
1.3.4.	<i>Endokrine Resistenz.....</i>	<i>6</i>
1.3.4.1.	ER und ESR1 Mutationen.....	7
1.3.4.2.	Wachstumsfaktor-Rezeptoren.....	8
1.3.4.3.	Wachstumsfaktor-Signalkaskade (PI3K/AKT/mTOR/FOXO).....	9
1.3.4.4.	Zellzyklus.....	10
1.3.4.5.	Autophagie.....	10
1.3.4.6.	Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT).....	10
1.3.4.7.	Heterogenität.....	10
1.3.5.	<i>Metastasierung.....</i>	<i>11</i>
1.3.5.1.	Metastatische Kaskade.....	11
1.3.6.	<i>Epithelial-Mesenchymale Transition.....</i>	<i>13</i>
1.3.7.	<i>Zirkulierende Tumorzellen (CTCs).....</i>	<i>14</i>
1.3.7.1.	Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs.....	15
1.3.7.2.	Einzelzellanalysen von CTCs.....	16
1.3.7.3.	Kultivierte CTCs – CTC Zelllinien.....	17
1.3.7.4.	Klinische Relevanz von CTCs bei Patientinnen mit Mammakarzinom.....	17
1.3.7.5.	CTCs als prognostischer Faktor.....	18
1.3.7.6.	CTCs im Rahmen des Therapiemonitorings.....	19
1.3.7.7.	CTCs im Rahmen der Therapieentscheidung.....	19
1.4.	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	21
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1.	MATERIAL.....	23
2.1.1.	<i>Zellen.....</i>	<i>23</i>
2.1.2.	<i>Kulturmedien.....</i>	<i>23</i>
2.1.3.	<i>Chemikalien.....</i>	<i>24</i>
2.1.4.	<i>Antikörper.....</i>	<i>25</i>
2.1.5.	<i>Kits.....</i>	<i>26</i>
2.1.6.	<i>Molekulargewichtsmarker.....</i>	<i>27</i>
2.1.7.	<i>TATAA Probe/Primer Assays.....</i>	<i>27</i>
2.1.8.	<i>Verwendete Lösungen und Puffer.....</i>	<i>28</i>
2.1.9.	<i>Geräte.....</i>	<i>29</i>
2.1.10.	<i>Software.....</i>	<i>30</i>
2.1.11.	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>31</i>
2.2.	METHODEN.....	33
2.2.1.	<i>Zellbiologische Methoden.....</i>	<i>33</i>
2.2.1.1.	Zelllinien: MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231.....	33
2.2.1.2.	Kultivierung und Passagieren von Zelllinien.....	33
2.2.1.3.	Kryokonservierung und Reaktivierung.....	33
2.2.1.4.	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau.....	34
2.2.1.5.	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen.....	35
2.2.2.	<i>Gewinnung von CTCs.....</i>	<i>35</i>
2.2.2.1.	Anreicherung und Detektion von CTCs mit dem CellSearch®-System.....	35
2.2.2.2.	Anreicherung mit Hilfe der Diagnostischen Leukapherese (DLA).....	36
2.2.2.3.	Kryokonservierung von DLA Proben.....	38
2.2.2.4.	Aufarbeitung von DLA Proben über das Parsortix™-System.....	38
2.2.2.5.	Langzeitkultivierung von CTCs.....	39
2.2.2.6.	Isolation von Einzelzellen mittels Mikromanipulation.....	39
2.2.3.	<i>RNA-Expressionsanalysen von Einzelzellen und gepoolten Einzelzellen.....</i>	<i>40</i>
2.2.3.1.	RNA-Extraktion.....	40
2.2.3.2.	cDNA Synthese.....	41
2.2.3.3.	Präamplifikation.....	42
2.2.3.4.	quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	42

2.2.4.	<i>Methoden zur Proteinanalyse</i>	45
2.2.4.1.	Zellyse	45
2.2.4.2.	Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.....	45
2.2.4.3.	SDS-PAGE.....	45
2.2.4.4.	Blotting	46
2.2.4.5.	Western Blot	46
2.2.5.	<i>Immunzytochemie</i>	47
2.2.5.1.	Anfertigung von Zytospins	48
2.2.5.2.	Immunzytochemische Analysen auf Zytospins (EpCAM, VIM, ER, Zytokeratin)	48
2.2.5.3.	Immunzytochemische Analysen in Zellsuspension (EpCAM, CD45).....	48
2.2.5.4.	Proliferationstest (MTT Assay).....	49
2.2.6.	<i>Auswertung der Daten</i>	49
3.	ERGEBNISSE	51
3.1.	ZELLMORPHOLOGIE VERWENDETER ZELLINIEN	51
3.2.	IMMUNZYTOCHEMISCHE ANALYSE DER EPCAM, VIMENTIN UND ERA EXPRESSION IN MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLEN	52
3.3.	PROTEINEXPRESSIONSANALYSE VON ERA IN MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLEN	53
3.4.	ZELLPROLIFERATION VON MCF-7 UND MCF-7/TAMR1 ZELLEN UNTER TAMOXIFEN BEHANDLUNG	54
3.5.	GENEXPRESSIONSANALYSEN IN EINZELNEN UND GEPOOLTEN MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLEN.....	55
3.5.1.	<i>Genexpressionsanalyse der Referenzgene GAPDH, UBC und ACTB in einzelnen und gepoolten nativen MDA-MB-231 Zellen</i>	55
3.5.2.	<i>KR19 und ACTB als Marker zur RNA-Qualitätskontrolle von einzelnen nativen MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen</i>	57
3.5.3.	<i>Multi-Marker-Genexpressionsanalyse einzelner und gepoolter MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen</i>	58
3.5.3.1.	Signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen	59
3.5.3.2.	Signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen	60
3.6.	EINFLUSS VON FIXIERUNG UND/ODER PERMEABILISIERUNG AUF DIE EINZELZELL-GENEXPRESSIONSANALYSEN VON MDA-MB-231 UND MCF-7 ZELLEN	61
3.6.1.	<i>Genexpressionsanalyse von CDH2, VIM und ACTB nach Fixierung und/oder Permeabilisierung einzelner MDA-MB-231 Zellen</i>	61
3.6.2.	<i>Genexpressionsanalyse von EpCAM, ESR1 und ACTB nach Fixierung und/oder Permeabilisierung einzelner MCF-7 Zellen</i>	63
3.7.	GENEXPRESSIONSANALYSEN EINZELNER UND GEPOOLTER ZELLEN NACH ANREICHERUNG UND DETEKTION MITTELS CELLSEARCH® CTC KITS	65
3.7.1.	<i>Genexpressionsanalyse einzelner und gepoolter MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kits</i>	65
3.7.2.	<i>RNA-Qualitätskontrolle einzelner und gepoolter CTCs nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kits</i>	68
3.8.	GENEXPRESSIONSANALYSEN EINZELNER CTCs SOWIE KULTIVierter CTCs NACH ANREICHERUNG MITTELS DIAGNOSTISCHER LEUKAPHERESE (DLA) UND PARSORTIX™-SYSTEMS	70
3.8.1.	<i>Klinisch-pathologische Charakteristika der Mammakarzinom-Patientin, aus deren Blut die DLA-Probe gewonnen wurde</i>	70
3.8.2.	<i>Immunzytochemische Analyse der ERα Expression einzelner CTCs nach Anreicherung mittels DLA und Parsortix™-Systems</i>	72
3.8.3.	<i>RNA-Qualitätskontrolle einzelner CTCs nach Anreicherung mittels DLA und Parsortix™-Systems</i>	73
3.8.4.	<i>Multi-Marker-Genexpressionsanalyse einzelner CTCs nach Anreicherung mittels DLA und Parsortix™-Systems</i>	74
3.8.4.1.	Analysen zur intra-individuellen Heterogenität einzelner CTCs.....	75
3.8.4.2.	Signifikante Genexpressionsunterschiede der CTC-Subpopulationen.....	75
3.8.4.3.	Signifikante Genexpressionsunterschiede ER-positiver gegenüber ER-negativer CTC-Subpopulationen	76
3.8.5.	<i>RNA-Qualitätskontrolle einzelner kultivierter CTCs (cCTCs) nach Anreicherung mittels DLA und Parsortix™ Systems</i>	77
3.8.6.	<i>Multi-Marker-Genexpressionsanalyse einzelner kultivierter CTCs nach Anreicherung mittels DLA und Parsortix™-Systems</i>	78
3.8.6.1.	Analysen zur intra-individuellen Heterogenität einzelner kultivierter CTCs	79
3.8.6.2.	Signifikante Genexpressionsunterschiede kultivierter CTC-Subpopulationen.....	79

3.9.	VERGLEICH DER MULTI-MARKER-GENEXPRESSIONSPROFILE EINZELNER NICHT-KULTIVierter UND KULTIVierter CTCs EINER PATIENTIN	81
4.	DISKUSSION	82
4.1.	METHODEN ZUR ANREICHERUNG, DETEKTION UND ISOLATION VON CTCs FÜR EINZELZELLANALYSEN	83
4.2.	MULTI-MARKER-EINZELZELLANALYSEN	84
4.2.1.	<i>Etablierung von Multi-Marker-Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene</i>	<i>85</i>
4.2.2.	<i>Genexpressionsprofile einzelner Zelllinien-Zellen, CTCs und kultivierter CTCs</i>	<i>87</i>
4.3.	KLINISCHE RELEVANZ VON CTC GENEXPRESSIONSANALYSEN AUF EINZELZELLEBENE ZUR OPTIMIERUNG ENDOKRINER THERAPIEN BEI PATIENTINNEN MIT METASTASIERTEM MAMMAKARZINOM.....	91
4.4.	AUSBLICK	94
4.5.	ZUSAMMENFASSUNG	96
4.6.	ABSTRACT	99
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
	LITERATURVERZEICHNIS.....	107
	TABELLENVERZEICHNIS.....	130
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	131
	ANHANG.....	135
	STADIENEINTEILUNG DER MAMMAKARZINOME	135
	GEN-PANEL	137
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	138
	WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF	139
	DANKSAGUNG.....	140

1. EINLEITUNG

1.1. Neoplasie

Eine Neoplasie (von griech. neo = „neu“, plastein = „formen“) bezeichnet eine Neubildung von Körpergewebe aus körpereigenen Zellen. Grundsätzlich erfolgt die Unterteilung in maligne (bösartige) oder benigne (gutartige) Neoplasien (Abbildung 1). Benigne Neoplasien zeichnen sich durch ein lokal verdrängendes Wachstum ab, weisen eine gute Abgrenzung zum umliegenden Gewebe auf und haben nicht die Fähigkeit in benachbartes Gewebe zu infiltrieren. Maligne Neoplasien, denen umgangssprachlich der Terminus „Krebs“ zugeordnet wird, zeigen ein invasives, Basalmembran-überschreitendes, destruierendes Wachstum in umliegendes Gewebe und können dadurch lymphogen und hämatogen metastasieren. Zytomorphologische Merkmale maligner Neoplasien sind eine erhöhte Mitoserate, Kernpolymorphien sowie Zellpolymorphien [1, 2].

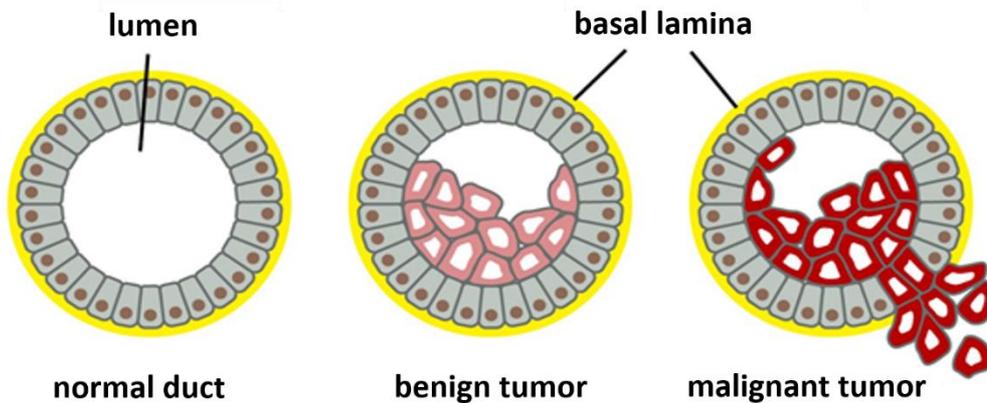


Abbildung 1: Benigne und maligne Neoplasien (Alberts *et al.*, 2011 [2]): Eine benigne Neoplasie zeigt ein verdrängendes Wachstum ohne Infiltration der Basalmembran. Maligne Neoplasien zeichnen sich durch ein invasives Basalmembran-überschreitendes Wachstum aus.

Neben der Dignität (benigne vs. maligne) erfolgt die Einteilung nach dem Phänotyp der Parenchymzellen. Prinzipiell können Neoplasien aus jeder Art von Zelle entstehen. Maligne Neoplasien epithelialer Zellen, die 80 % aller malignen Neoplasien ausmachen, werden als Karzinome bezeichnet [2, 3]. Sarkome (von griech. „sarcos“ = fleischig) entstehen aus

mesenchymalen Zellen. Weitere Formen stellen Neoplasien aus Zellen neuroektodermalen Ursprungs, aus Keimzellen oder aus embryonalem Gewebe dar [1-3].

Krebs stellt nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in westlichen Ländern dar. Weltweit wird pro Jahr bei über 14 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert [4]. 8,8 Millionen Menschen sind im Jahr 2015 schätzungsweise an Krebs gestorben (World Health Organisation, WHO), wobei 90 % der krebsbedingten Todesfälle auf eine Metastasierung zurückzuführen sind [5].

1.2. **Karzinogenese**

Die Karzinogenese (aus dem lat. carcinoma = „Krebs“ und griech. genesis = „Zeugung“, „Schöpfung“) beschreibt den komplexen biologischen Prozess der Krebsentstehung [6]. Nach heutigem Wissen bedarf es mehrerer Veränderungen auf unterschiedlichen Stufen (Mehrstufen-Modell), die zu einer Transformation einer benignen in eine maligne Zelle führt [7]. Dabei spielen vor allem zwei Mechanismen eine zentrale Rolle: Veränderungen der epigenetischen Regulation sowie genetische Mutationen [7]. Wichtige epigenetische Modifikationen umfassen die Hypermethylierung der DNA im Promotorbereich, die damit verbundene veränderte Chromatinstruktur sowie die genomweite Hypomethylierung. Genetische Mutationen treten als Teil der Karzinogenese vorwiegend in zwei Genfamilien auf: den Proto-Onkogenen, welche Schlüsselfunktionen bei dem Zellwachstum beinhalten sowie den Tumorsuppressorgenen, welche die Zellproliferation hemmen. Nur die Akkumulation entsprechender Mutationen sowie epigenetischer Veränderungen führt zur malignen Transformation der Zelle [7].

Die Anhäufung genetischer Veränderungen stellt den ersten Schritt der Karzinogenese, die Phase der Initiation, dar. Während der Promotion kommt es durch Karzinogene (Promotoren) zur Umwandlung der Zelle mit Bildung eines autonomen Mitoserhythmus. Die letzte Phase, genannt Progression, umfasst das Stadium der autonom und invasiv wachsenden Zelle mit einer zunehmenden zellulären Maskierung [7].

Hanahan und Weinberg fassten 2000 und 2011 in zwei Übersichtsarbeiten als „Hallmarks of Cancer“ die zehn Veränderungen zusammen, die eine maligne Transformation einer Zelle hervorrufen [8, 9]. Bei diesen zehn Veränderungen handelt es sich um die Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege, die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-Inhibitoren, die Fähigkeit zur Umgehung der Immunabwehr, ein unlimitiertes replikatives Potential, die Induktion einer Tumor-bedingten Entzündung, die Fähigkeit zur Invasion bzw. Metastasierung, die fortwährende Angiogenese, das Auftreten von Mutationen sowie genomischer Instabilität,

die Inaktivierung des programmierten Zelltodes sowie die Dysregulation zellulärer Metabolismen.

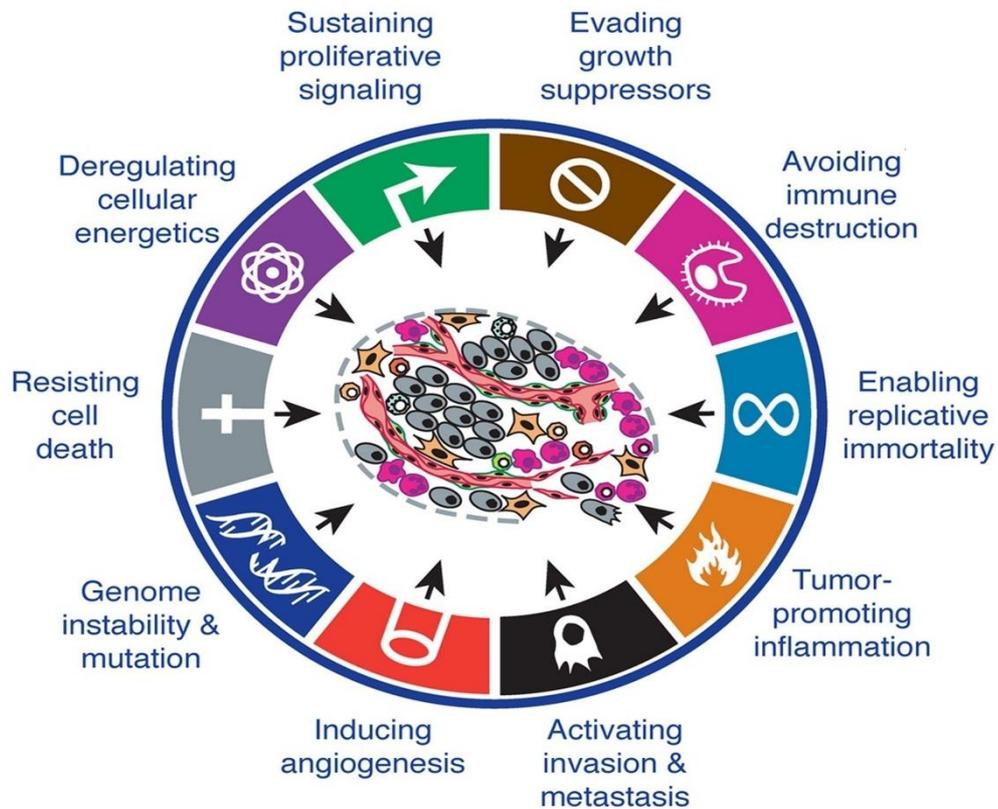


Abbildung 2: „Hallmarks of Cancer“ (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2011 [8]): Zehn Eigenschaften, die eine maligne Transformation einer Zelle hervorrufen.

1.3. Mammakarzinom

1.3.1. *Epidemiologie und Ätiologie*

Das Mammakarzinom stellt sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar. Weltweit wurde im Jahre 2012 bei 1,68 Millionen Frauen ein Mammakarzinom diagnostiziert bei einer krebsbedingten Mortalität von 522.000 [10, 11]. Nach Angaben der Amerikanischen Krebsgesellschaft (American Cancer Society) tritt bei einer von 8 Frauen im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom auf [12]. 2050 wird die Anzahl der Neuerkrankungen auf 3,2 Millionen pro Jahr geschätzt [13]. In Deutschland werden jährlich bei über 70.000 Frauen Mammakarzinome diagnostiziert bei einer begleitenden Sterberate von über 18.000 [14]. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 64 Jahre. 25 % der Frauen sind bei

Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt und eine von 10 Frauen ist unter 45 Jahren. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt für Frauen in Deutschland 87 % [14, 15].

Verschiedene Risikofaktoren sind für die Entstehung des Mammakarzinoms bekannt. Hauptrisikofaktoren für das Mammakarzinom sind das Geschlecht, das Alter, eine familiäre Belastung, eine genetische Prädisposition (BRCA1-, BRCA2-Mutationen), die Parenchymdichte der Brust sowie Östrogenexposition (frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität, fehlende Laktation, Hormonersatztherapie in der Postmenopause) [16-24]. Zusätzlich wird das Risiko durch modifizierbare Lebensstilfaktoren wie Übergewicht, körperliche Aktivität, ein regelmäßiger Alkoholkonsum sowie ein höherer sozioökonomischer Status beeinflusst [23, 25-27]. Bei Frauen tritt im Vergleich zu Männern ein Mammakarzinom 100-fach häufiger auf [28].

1.3.2. *Stadieneinteilung und molekulare Subtypen*

Die Stadieneinteilung der Mammakarzinome sowie das Ausmaß der Metastasierung erfolgt nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM System (Anhang Tabelle 12) bzw. der UICC-Klassifikation (Anhang Tabelle 13). Die Einteilung nach der TNM Klassifikation erfolgt nach der Größe und Ausbreitung des Primärtumors (T), dem Fehlen oder Auftreten von Lymphknotenmetastasen (N) sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Die histologische Ergänzung der Stadieneinteilung mit Sicherung der Diagnose ist erforderlich und wird als pTNM beschrieben [29]. Grundsätzlich geht ein größerer Tumor, ein Lymphknoten-Befall sowie das Auftreten von Fernmetastasen mit einem höheren Stadium sowie einer schlechteren Prognose einher [30].

Diese Kriterien fasst die Einteilung der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in 4 Stadien (Anhang Tabelle 13) zusammen [29]. Zusätzlich teilt die UICC den Differenzierungsgrad von Krebszellen in 3 Stadien ein: Grad 1 (G1): gut differenziertes Gewebe, Grad 2 (G2): mäßig differenziertes Gewebe, Grad 3 (G3): schlecht/niedrig differenziertes Gewebe. Der Differenzierungsgrad ist ein weiterer Prognosefaktor. Ein hoher Differenzierungsgrad geht mit einem schlechteren krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben einher [30].

Bei dem Mammakarzinom handelt es sich um eine heterogene Erkrankung. Seit den Arbeiten von Perou und Sorlie ist bekannt, dass das Mammakarzinom in molekulare Subtypen eingeteilt werden kann, die eine klinische Relevanz aufzeigen [31]. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen können unterschiedliche molekulare Subtypen des Mammakarzinoms unterschieden werden, die grundsätzlich endokrin responsive Tumoren (luminal A, B) von

undifferenzierten (basal-like) sowie HER2-positiven Tumoren abgrenzen (Tabelle 1). Die Identifikation der molekularen Subtypen ist prädiktiv für eine medikamentöse Therapie sowie als prognostischer Marker von essentieller Bedeutung.

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (modifiziert nach [32]).

Molekularer Subtyp	Rezeptor-Expression	Proliferation
Luminal A	ER+/PR+/HER2-	Ki-67 < 14 %
Luminal B	ER+/ PR+/-/HER2+/-	Ki-67 > 14 %
HER2 enriched	ER-/PR-/HER2+	-
Basal-like	ER -/PR-/HER2-	Ki-67 50 - 60%

Basierend auf diesen molekularen Subtypen empfiehlt der St. Gallen Konsensus die Auswahl der entsprechenden Systemtherapie. Molekulare Analysen stellen derzeit immer noch ein zeitaufwendiges und kostenintensives Verfahren dar, sodass im klinischen Alltag die Subtypen mittels Immunhistochemie (ER, PR, HER2 und Ki-67) und In-situ-Hybridisierung (HER2) bestimmt werden.

1.3.3. *Therapieoptionen*

Bei der Behandlung des Mammakarzinoms unterscheidet man generell die lokale und die systemische Therapie. Die lokale Therapie beinhaltet das operative Vorgehen sowie die Strahlentherapie. Zur systemischen Therapie gehören die Chemotherapie, die endokrine Therapie sowie die Antikörpertherapie.

1.3.3.1. **Endokrine Therapie**

Ungefähr 75 – 85 % aller neu diagnostizierten Mammakarzinome gelten als endokrin sensitiv [33, 34]. Das Kriterium für endokrin sensitive Karzinome beinhaltet den immunhistochemischen Nachweis von ER und PR in ≥ 1 % der Tumorzellen [35]. Bei unbekanntem Hormonrezeptor-Status gilt das Karzinom als endokrin sensitiv. Bei einem Nachweis von 0 % der Tumorzellen gilt das Karzinom als nicht endokrin sensitiv.

Seit über 30 Jahren stehen gezielte Therapien für endokrin sensitive Mammakarzinome zur Verfügung, die einen entscheidenden Einfluss auf die Mortalität der Patientinnen haben [36, 37]. Die adjuvante endokrine Therapie wird in die initiale (5 Jahre) sowie die erweiterte adjuvante endokrine Therapie (6 - 15 Jahre) eingeteilt. Die Standarddauer beträgt 5 Jahre, wobei eine erweiterte endokrine Therapie nach individuellem Nutzen-Risiko abgewogen werden sollte [29, 38]. Klassische Standardtherapeutika sind selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs; Tamoxifen, Toremifen, Raloxifen), selektive Östrogenrezeptor-Downregulatoren

(SERDs; Fulvestrant), Aromatase-Inhibitoren (AI; Anastrozol, Letrozol, Exemestan), CDK4/6-Inhibitoren (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib) sowie GnRH-Analoga. Die Therapiedauer, die Wahl des Therapeutikums sowie die Sequenz sind abhängig von dem Menopausen-Status, der Medikamentenverträglichkeit sowie dem individuellen Risiko. Ungefähr 30 – 40 % der Patientinnen mit endokrin sensitivem Mammakarzinom zeigen ein gutes Ansprechen auf endokrine Therapien [39] sowie eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu Chemotherapien [40].

Prämenopausale Patientinnen mit endokrin sensitivem Mammakarzinom werden bevorzugt mit Tamoxifen über 5 - 10 Jahre behandelt. Bei Kontraindikation erfolgt die Therapie mit einem alleinigen GnRH-Analoga oder die Kombination aus GnRH-Analoga mit einem AI [29, 38]. Für die initiale endokrine Therapie stehen bei postmenopausalen Patientinnen Tamoxifen und AIs zur Verfügung. Eine Option besteht in der sequentiellen Gabe von Tamoxifen und eines AIs über insgesamt 5 Jahre (2-3 Jahre Tamoxifen gefolgt von 2-3 Jahren eines AIs oder *vice versa*). Alternativ sollte insbesondere beim lobulärem Karzinom bzw. hohem Rezidiv-Risiko eine alleinige Behandlung („Upfront“-Therapie) für 5 Jahre mit einem AI durchgeführt werden. Eine weitere Therapieoption besteht in der alleinigen Gabe von Tamoxifen über einen Behandlungszeitraum von 5 Jahren. Eine erweiterte endokrine Therapie kann bei bestimmten Subgruppen durchgeführt werden. Dabei erfolgt die Gabe eines AIs für weitere 2-3 Jahre nach initialer endokriner Therapie mit Tamoxifen. Bei erhöhtem individuellen Risiko erfolgt die weitere Gabe von Tamoxifen für 5 Jahre nach initialer 5-jähriger Tamoxifen Therapie [29, 38]. In der Behandlung des metastasierten endokrin sensitiven Mammakarzinoms ist die endokrine Therapie die erste Wahl. Dabei stehen neben Tamoxifen, AIs und GnRH-Analoga selektive Östrogenrezeptor-Downregulatoren (Fulvestrant) und CDK4/6-Inhibitoren (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib) als Therapeutika zur Verfügung. Die Auswahl des Therapeutikums bzw. des Therapieschemas richtet sich nach der entsprechenden Vortherapie [29, 38].

1.3.4. ***Endokrine Resistenz***

Die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie ist durch primäre sowie sekundäre Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien limitiert. In 20 - 25 % der Fälle zeigt sich in der adjuvanten sowie der metastasierten Situation ein Versagen einer endokrinen Therapie [41, 42]. Dabei werden endokrine Resistenzen in zwei Gruppen unterteilt [38, 43]: Primäre (*de novo*) endokrine Resistenzen bezeichnen das Auftreten eines Rezidivs innerhalb der ersten zwei Jahre einer adjuvanten endokrinen Therapie oder beim metastasierten Mammakarzinom innerhalb der ersten 6 Monate einer endokrinen Therapie. Eine sekundäre (erworbene) Resistenz wird durch

ein Rezidiv nach 2 Jahren einer adjuvanten endokrinen Therapie oder innerhalb des ersten Jahres nach abgeschlossener endokriner Therapie bezeichnet. Bei dem metastasierten Mammakarzinom handelt es sich um eine sekundäre endokrine Resistenz bei einem Progress nach 6 Monaten unter endokriner Therapie. Endokrine Resistenzen können durch eine Reihe unterschiedlicher molekularer Mechanismen verursacht werden. Dazu zählen Mutationen des Östrogenrezeptor-Gens ESR1, eine veränderte Expression von ER, eine veränderte Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, eine veränderte Expression von Zellzyklusregulatoren, eine Dysregulation von ER Co-Aktivatoren, die Autophagie, die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) sowie eine verstärkte Tumorerheterogenität [44, 45].

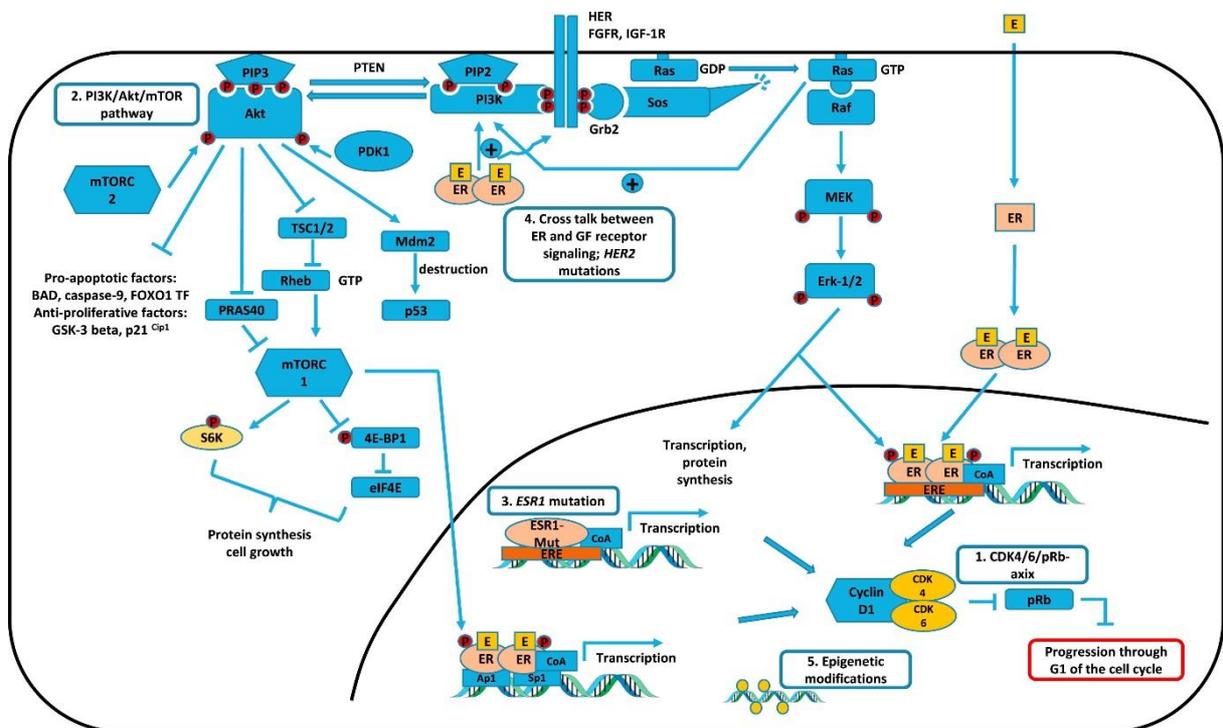


Abbildung 3: Signalwege des ER und molekulare Signalwege endokriner Resistenzmechanismen (Maurer *et al.*, 2017 [46]).

1.3.4.1. ER und ESR1 Mutationen

Über 75 % der Mammakarzinome zeigen eine Überexpression des ER [33]. Der ER ist ein nukleärer Hormonrezeptor und beeinflusst als Liganden-bindender Transkriptionsfaktor die

Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung. Zwei ER Isoformen sind bekannt: ER α und ER β . ER α wird durch das ESR1 Gen kodiert, ER β durch ESR2.

Der ER ist das zentrale Target endokriner Therapien und eine ER Expression der wichtigste Prädiktor hinsichtlich der Ansprechraten. Anfänglich wurde die Ursache einer endokrinen Resistenz im Verlust der ER Expression vermutet [47]. Studien zeigten jedoch in nur 17 – 28 % der Patientinnen mit sekundärer endokriner Resistenz ein Verlust der ER Expression auf [48]. Eine vermindert ER Expression stellt damit nicht die Erklärung einer endokrinen Resistenz der Patientinnen dar, sondern andere Mechanismen, wie Mutationen des ESR1 Gens, sind mögliche Gründe [47].

Die ersten ESR1 Mutationen wurden vor zwei Jahrzehnten in PDX-Modellen (patient derived xenograft) beschrieben [49, 50]. In den letzten Jahren konnten durch Next Generation Sequenzierung (NGS) Driver-Mutationen in dem ESR1 Gen aufgezeigt werden, die als Folge eine endokrine Resistenz bedingen können [51, 52]. Seitdem sind zahlreiche ESR1 Mutationen bekannt, welche mit endokrinen Resistenzen assoziiert sind [51, 52]. Im Gegensatz zu endokrin unbehandelten Tumoren, in denen ESR1 Mutationen selten nachgewiesen werden können, zeigen sich ESR1-Mutationen häufig in endokrin vorbehandelten Tumoren sowie Metastasen [53].

1.3.4.2. Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Veränderungen der Genexpression, Amplifikationen sowie Mutationen von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie beispielsweise FGFR, HER2, IGFR, VEGFR und EGFR, können ebenfalls zu einem Verlust der endokrinen Sensitivität führen. Die bidirektional vernetzten Signalwege zwischen ER und Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind sehr gut beschrieben [54, 55].

Etwa 9 % aller Mammakarzinome zeigen Amplifikationen des FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) Gens sowie 4 % eine Amplifikation des FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) Gens. In Metastasen ist das FGFR1 Gen häufiger amplifiziert als das FGFR2 Gen. *In vitro* Studien zeigten eine endokrine Resistenz hormonsensitiver Zelllinien bei FGFR1 Amplifikation auf [56]. Ein früher Progress ER positiver Tumoren ist mit einer Amplifikation des FGFR Gens assoziiert [57].

Der Humane Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) ist in ungefähr 10 % der ER positiven Mammakarzinome überexprimiert [58]. Eine Amplifikation und/oder Überexpression geht mit einer geringen Ansprechrate einer endokrinen Therapie in ER positiven Mammakarzinomen einher [58-61].

40 – 60 % ER positiver Mammakarzinome exprimieren IGFR1 (insulin-like growth factor receptor 1) im Vergleich zu 10 – 20 % ER negativer Mammakarzinome [62]. Die Expression korreliert mit der Präsenz von ER und PR [63]. Präklinische Studien deuten darauf hin, dass eine endokrine Resistenz durch eine verstärkte Aktivierung des IGFR1 Signalweges ausgelöst werden könnte und damit eine Blockade dieses Signalweges die Wirkung von Zweitlinien-Therapeutika verstärken würde [64, 65]. Zudem führte der Einsatz verschiedener endokriner Therapien zu einer Veränderung der IGFR1 Expression [66-68]. Unter Tamoxifen sowie AI Behandlung zeigte sich eine Herunterregulation der IGFR1 Expression, wohingegen eine Therapie mit Östrogenen eine Hochregulation in Mammakarzinomen bedingte [69, 70].

Präklinische Studien offenbarten, dass die Interaktion zwischen ER und EGFR (Epidermal growth factor receptor) mit einer endokrinen Resistenz einher gehen kann [71]. Die Arbeitsgruppe um Cerra et al. konnte eine inverse Korrelation zwischen EGFR und ER/PR Status darlegen. Eine Dauertherapie unter Fulvestrant führte zu einem Verlust der ER Expression sowie einer Hochregulation von EGFR [72]. Amplifikationen von EGFR und damit verbundene höhere EGFR Expressionen können in tripple-negativen Mammakarzinomen beobachtet werden [73].

Auch eine hohe Expression des VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factors) ist mit einer endokrinen Resistenz assoziiert [74].

1.3.4.3. Wachstumsfaktor-Signalkaskade (PI3K/AKT/mTOR/FOXO)

Nicht nur Veränderungen der Genexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren können eine endokrine Resistenz bedingen, sondern auch eine verstärkte Aktivierung der Wachstumsfaktor-Signalkaskade. Der PI3K/AKT/mTOR/FOXO Signalweg ist an vielen Prozessen wie bspw. der Proliferation, dem Zellwachstum und der Angiogenese beteiligt. Änderungen der Expression sowie Mutationen können zu einer Überaktivierung der Signalkaskade führen.

In etwa 40 % der Mammakarzinome kann eine Mutation des PI3KCA Gens detektiert werden [75-79]. Dabei werden PIK3CA-Mutationen am häufigsten bei ER positiven/HER2 negativen Tumoren beobachtet. Am häufigsten sind Exon 9 und Exon 20 des Gens betroffen. Das PI3KCA Gen kodiert PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) [80].

Auch Mutationen und Veränderungen der Genexpression der Downstream-Effektoren AKT (protein kinase B), mTOR (mechanistic target of rapamycin) und FOXO (forkhead box protein) können endokrine Resistenzen bedingen (114). Mutationen von AKT wurden in 3 % der Mammakarzinome beschrieben [81-83]. Diese waren nur in ER positiven Tumoren zu finden [81, 83]. Die Arbeitsgruppe um Westin et al. offenbarte, dass eine verstärkte Aktivierung von

mTOR eine Resistenz gegenüber Tamoxifen bedingt. Auch eine Dysregulation der FOXO Proteine spielt eine zentrale Rolle in der Ausbildung endokriner Resistenzen [84]. Dysregulationen der Transkriptionsfaktoren von FOXO sind mit einer Tamoxifen-Resistenz assoziiert [85]. Ein Verlust der inhibitorischen Effekte von PTEN (phosphatase and tensin homolog) führte zu einer Resistenz gegenüber einer endokrinen Therapie [86]. In bis zu 5 % der Mammakarzinome findet sich eine PTEN Mutation, die zu einer Dysregulation der Signalkaskade führen kann [82, 87].

1.3.4.4. **Zellzyklus**

Veränderungen an Zellzyklus-Kontrollpunkten können auch zu Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien führen [88]. Der Zellzyklus wird durch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) initiiert. Die Phosphorylierung von Rb erfolgt durch Bindung des Cyclin D1 (CCDN1)/CDK4/CDK6 (cyclin-dependent kinase 4/6) Komplexes. Im Vergleich zu anderen molekularen Subtypen weisen ER positive Mammakarzinome eine höhere Expression von Cyclin D1 auf [53, 89]. Eine durchgehend erhöhte Cyclin D1 Expression sowie Rb Phosphorylierung ist mit einer endokrinen Resistenz bei ER positiven Mammakarzinomen assoziiert [88].

1.3.4.5. **Autophagie**

Die Makro-Autophagie dient zum Abbau von Zellorganellen und Proteinen und konnte als ein zentraler Mechanismus zur Erhaltung der endokrinen Sensitivität offenbart werden (15). Beispielsweise ist eine verstärkte Aktivierung des UPR (unfolded protein response) Signalweges mit einer endokrinen Resistenz assoziiert [90-93].

1.3.4.6. **Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)**

Zahlreiche *in vitro* Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen EMT (siehe Kapitel 1.3.6) und einer endokrinen Resistenz. Dabei entwickelten Zelllinien-Zellen, die zur EMT angeregt wurden, eine endokrine Resistenz [94-98]. Zudem spielen Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Induktion der EMT. Dhasarathy und Kollegen berichteten über die Herunterregulation von ER durch den EMT induzierenden Transkriptionsfaktor SNAIL [94].

1.3.4.7. **Heterogenität**

Malignome weisen eine genetische Heterogenität auf. Diese Heterogenität drückt sich auf verschiedenen Ebenen aus: dem Genom, dem Transkriptom sowie dem Proteom. Innerhalb eines heterogenen Tumors bestehen Subklone, die im Gegensatz zu monoklonalen Tumoren

ein unterschiedliches Ansprechen bzw. eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Therapien aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorheterogenität ein weiterer bedeutender Faktor für das Versagen endokriner Therapien ist [45]. Dabei konnte eine inter- sowie intra-tumorale Heterogenität hinsichtlich endokriner Resistenzmechanismen offenbart werden [99].

1.3.5. *Metastasierung*

Die Metastasierung (von griech. „metastasis“ = Umstellung, Wanderung) beschreibt einen komplexen mehrstufigen Prozess, bei dem Tumorzellen den Primärtumor verlassen und in andere Bereiche des Körpers migrieren. Der Prozess der Metastasierung findet nur bei malignen Neoplasien statt und bildet die größte klinische Herausforderung in der Krebstherapie. Bei schätzungsweise 50 % der Patienten treten bei Erstdiagnose bereits Metastasen auf [100]. 90 % krebsbedingter Todesfälle sind auf Metastasen zurückzuführen [5].

1.3.5.1. **Metastatische Kaskade**

Der komplexe mehrstufige Prozess der Metastasierung wird als metastatische Kaskade bezeichnet (Abbildung 4) [101]. Grundsätzlich kann die metastatische Kaskade in vier Schritte eingeteilt werden: die Invasion, die Intravasation, die Zirkulation und die Extravasation [101, 102].

Der erste Schritt der metastatischen Kaskade besteht in der Migration sowie Invasion. Diese beinhaltet die Fähigkeit zur Lösung von Tumorzellen aus dem epithelialen Zellverband durch Verlust der Zell-Zell-Adhäsion sowie die anschließende Penetration der Basalmembran und des Stromas. Dieser Prozess wird möglicherweise durch die Epithelial-Mesenchymale Transition (siehe Kapitel 1.3.6) und durch verschiedene Mediatoren wie Zelladhäsions-Moleküle (z.B. E-Cadherin), Integrine, Proteasen (z.B. Matrix-Metallproteinasen) sowie Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, EGF, CSF-1) unterstützt [103-105]. Im Stroma kommt es zur Interaktion zwischen den Tumorzellen und Stromazellen (z.B. Fibroblasten, Adipozyten, mesenchymale Stammzellen, Makrophagen) [106]. Das invasive Verhalten wird von den meisten Zellen durch Mediatoren wie Wnt, TGF- β und FGF verstärkt [107]. Die sich anschließende Intravasation in das Blutgefäß- bzw. Lymphgefäßsystem wird wahrscheinlich durch molekulare Veränderungen der Gefäßwände sowie die Interaktion mit Mediatoren unterstützt. VEGF fördert als Angiogenese Faktor bei Tumoren die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) [108]. Die gebildeten Blutgefäße bestehen häufig noch aus unorganisierten Zellverbindungen, welche zu durchlässigen instabilen Gefäßwänden führen können [109]. Tumorzellen können wahrscheinlich über diese instabilen Gefäßwände in das Gefäßsystem eindringen [110, 111].

Tumorzellen, die in das Blutgefäßsystem eingetreten sind, werden als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet. CTCs zirkulieren im Blut als Einzelzellen, als Cluster sowie an Thrombozyten aggregiert [112]. Während der Zirkulation im Blut müssen CTCs viele Hindernisse wie das Kapillarsystem sowie die Immunabwehr des Körpers überwinden. Die genaue Anzahl von CTCs im Blutgefäßsystem von Tumorpatienten ist schwierig zu determinieren. *In vivo* Studien zeigten jedoch, dass pro Gramm Tumormasse mehrere Millionen Tumorzellen in das Blut abgegeben werden [113]. Von diesen Zellen scheint jedoch nur ein sehr geringer Anteil zur Ausbildung von Metastasen befähigt zu sein [114]. In der Phase der Extravasation müssen die CTCs in der Lage sein, das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem zu verlassen, sich in dem Kapillarbett entsprechender Organe bzw. Lymphknoten einzunisten (Homing) und einzuwandern (Extravasation). In engeren Gefäßen wie des Kapillarbett erleichtert die geringere Fließgeschwindigkeit der CTCs die Anlagerung an das Gefäßendothel [115]. Verschiedene Adhäsionsmoleküle (z.B. N-Cadherin, E-Selektin), chemotaktische Signale durch Integrine sowie lokale Entzündungsprozesse spielen bei der Adhäsion und Extravasation eine zentrale Rolle [116, 117]. Gegenstand derzeitiger Forschung sind Untersuchungen ob CTCs, welche eine EMT durchlaufen haben, nach Extravasation eine Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) durchlaufen und sich dadurch erneut an Zellverbände anlagern [118]. CTCs, die eine neue Nische gefunden und das Blutsystem verlassen haben, werden als disseminierte Tumorzellen (DTCs) bezeichnet. Diese können in einen Ruhezustand verfallen (Dormancy), kleine Mikrometastasen formen (<2 mm) oder zu detektierbaren Makrometastasen (>2 mm) heranwachsen [114]. Die Tumorzell dormanz stellt möglicherweise einen Schutz der DTCs gegenüber systemischen Therapien dar. Studien konnten zeigen, dass DTCs im Stadium der Dormanz auch mehrere Jahre nach Erstdiagnose zu Rezidiven führen können [119, 120]. Die genauen Mechanismen der lokalen Proliferation sind noch nicht ausreichend erklärt. Bereits 1889 postulierte Stephen Paget die „Seed and Soil“ Hypothese [121]. Diese besagt, dass die Interaktion von Tumorzellen (seed) mit dem Mikromilieu (soil) die zentrale Rolle in der Bildung von Metastasen spielt. Derzeitige Studien deuten darauf hin, dass DTCs, die zu Metastasen proliferieren können, Ähnlichkeiten zu Krebsstammzellen haben. Die Reaktivierung erfolgt dabei möglicherweise durch Signale, welche die Proliferation von Stammzellen regulieren [122].

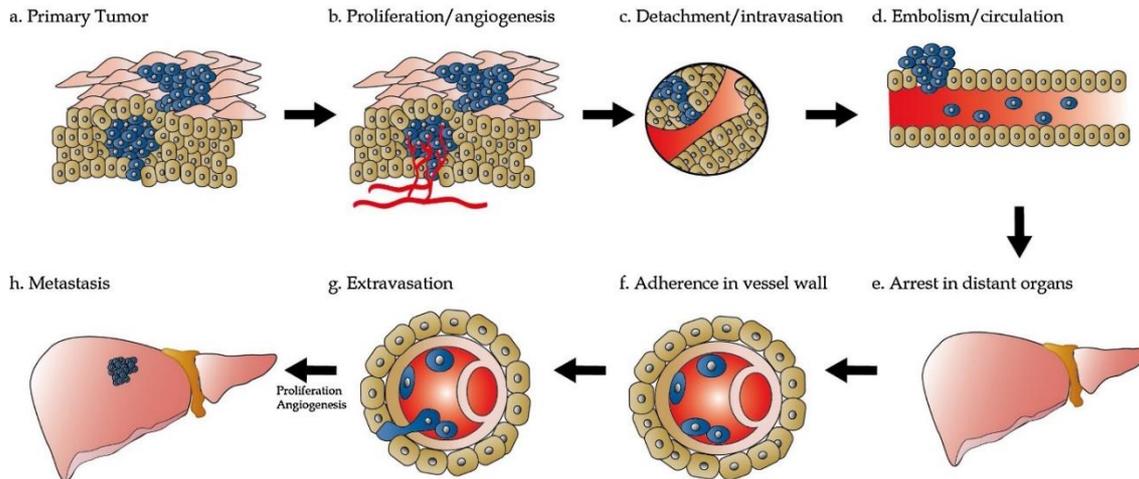


Abbildung 4: Die metastatische Kaskade (Li *et al.*, 2018 [123]): Tumorzellen gelangen in den Blutstrom (Invasion) und sind dort Scherkräften sowie der Immunabwehr ausgesetzt. Überlebende zirkulierende Tumorzellen können sich unter bestimmten Bedingungen an das Endothel anlagern (Homing) und das Blutgefäßsystem verlassen (Extravasation). Dort können sie entweder Proliferieren und Metastasen bilden oder in einen Ruhezustand (Dormancy) fallen.

1.3.6. *Epithelial-Mesenchymale Transition*

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen reversiblen zellbiologischen Prozess, bei dem ein Übergang von epithelialen Zellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften stattfindet (Abbildung 5). Die EMT spielt bei drei bedeutenden Prozessen eine Rolle: der embryonalen Morphogenese, der Wundheilung sowie der in Kapitel 1.3.5.1 beschriebenen metastatischen Kaskade [105, 124, 125].

Die EMT kann durch Wachstumsfaktoren (FGF, EGF, TGF- β), Interleukin-6, Nikotin, miRNAs, epigenetische Veränderungen, Hypoxie, Alkohol und UV-Licht induziert werden [126-129]. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren wie SNAIL, TWIST, E12, ZEB1 und ZEB2 aktiviert [129]. Diese Transkriptionsfaktoren unterdrücken direkt oder indirekt die Expression epithelialer Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin, EpCAM, MUC1, Zytokeratine) und führen zur Heraufregulation mesenchymaler Marker (z.B. N-Cadherin und Vimentin) [130, 131]. Die EMT ist mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie mit Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontaktverlusten verbunden. Der Umbau des Zytoskeletts resultiert in einer spindelförmigen Zellmorphologie sowie einem Polaritätsverlust der Zelle und fördert dadurch die Zellmigration.

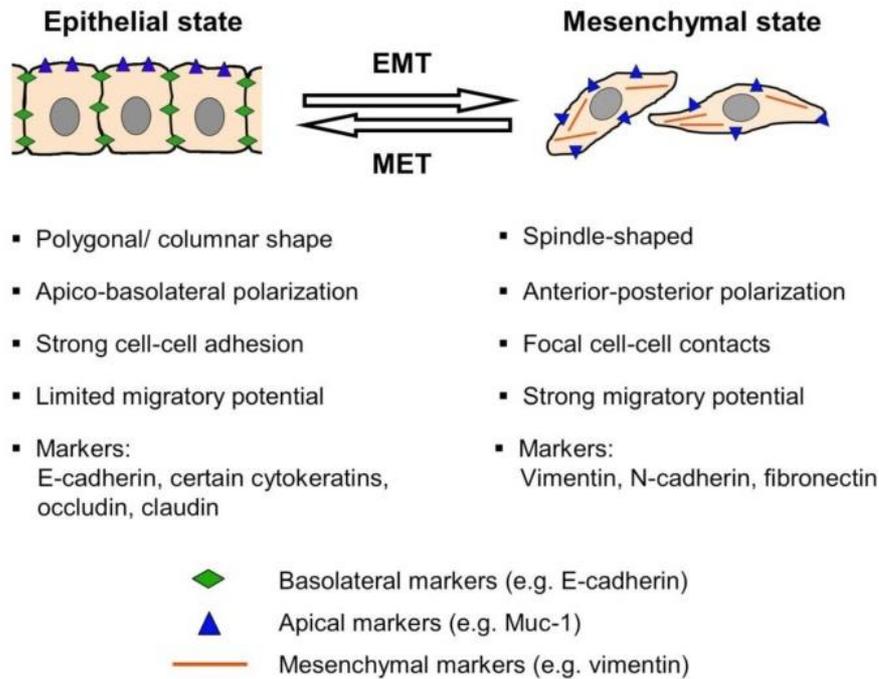


Abbildung 5: Charakteristika epithelialer and mesenchymaler Zell-Zustände (Maier *et al.*, 2010 [132]): EMT: Epithelial-Mesenchymale Transition; MET: Mesenchymal-Epitheliale Transition.

1.3.7. *Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)*

Bereits 1869 wurden CTCs von Thomas Ashworth als „...*cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death...*” beschrieben [133]. Definitionsgemäß beinhalten CTCs derzeit folgende Kriterien, welche für die Anreicherung und Detektion genutzt werden: Zytokeratin positiv, DAPI positiv, ein verschobenes Kern/Zytoplasma-Verhältnis zu Gunsten des Zellkerns, Negativität für den Leukozytenmarker CD45 sowie eine intakte Zell-ähnliche Morphologie (Durchmesser 4 μm bis 40 μm). Jedoch könnten auch elongierte und polynukleäre Zellen als CTCs klassifiziert werden [134-136]. Analog zur intra- und intertumoralen Heterogenität von Mammakarzinomen und Metastasen stellen CTCs eine heterogene Population dar. Sie besitzen das Potential, unter entsprechenden Bedingungen zu Mikro-/Makrometastasen proliferieren zu können (siehe Kapitel 1.3.5.1). *In vivo* Studien zeigten, dass pro Gramm Tumormasse (etwa 10^9 Zellen) ungefähr 3×10^6 Tumorzellen in das Blut pro Tag abgegeben werden [113]. Jedoch sterben die meisten CTCs während der Zirkulation im Blutstrom. In Mammakarzinom-Patientinnen beträgt die Halbwertszeit von CTCs etwa zwischen 0,5 und 2,5 h [137]. In 1 ml Blut können zwischen 1 und 10 CTCs in unter 6×10^6 Leukozyten, 2×10^8 Thrombozyten und 4×10^9 Erythrozyten nachgewiesen werden [134, 138]. Nur etwa 0,01 % lebender CTCs haben das Potenzial zur Invasion mit anschließender Proliferation zu Mikro-/Makrometastasen [139]. Im Vergleich zu Gewebebiopsien ist der

Nachweis von Tumorzellen im Blut als *liquid biopsy* für Patienten weniger belastend und erlaubt dadurch einfache serielle Bestimmungen.

1.3.7.1. Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs

Die Anzahl von CTCs ist mit etwa einer CTC pro 10^6 mononukleärer Zellen relativ gering [134, 138]. Ihre geringe Anzahl im Blut sowie die größtenteils noch unbekanntenen molekularen Eigenschaften erschweren die Anreicherung und Detektion. In den letzten Jahren wurden viele Methoden und Plattformen entwickelt, um CTCs anzureichern. Derzeit sind über 50 verschiedene Technologien zur Anreicherung und Detektion beschrieben. Diese können in Marker-unabhängige sowie Marker-abhängige Verfahren unterteilt werden.

Marker-unabhängige Verfahren basieren auf Dichte-abhängigen Anreicherungen (Ficoll-Paque® [140, 141]), Größen-abhängigen Systemen (Diagnostische Leukapherese [142, 143], Parsortix™-System [144] (siehe Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.2.4) oder ISET® [145]) oder einer Anreicherung mit Hilfe negativer Selektion über den RosetteSep™ CTC Cocktail.

Marker-abhängige Verfahren beinhalten eine Anreicherung über Oberflächenmarker. Das Oberflächenprotein EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) ist derzeit der am häufigsten genutzte Oberflächenmarker zur positiven Selektion von CTCs einer Patientenprobe. EpCAM wurde erstmals 1979 bei Kolonkarzinomen als Tumor-assoziiertes Protein beschrieben und ist in vielen Karzinomen überexprimiert [146]. Eine Marker-abhängige Anreicherung/Detektion mittels EpCAM nutzen viele Verfahren wie beispielsweise das CellSearch®-System [147], der AdnaTest [148, 149], der CTC-iChip [150] sowie das Isoflux™-System [151].

Im Folgenden werden nur die für diese Arbeit relevanten Technologien näher beschrieben. Das CellSearch®-System ist derzeit von der U.S. amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) als einziges Testverfahren zum Nachweis von CTCs bei Patientinnen mit Mammakarzinom zugelassen. Die CellSearch®-Methode basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung von EpCAM-exprimierenden Zellen über Antikörper, die mit Eisenpartikeln (Ferrofluiden) konjugiert sind [152]. Die Methode ist ausführlich in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Die Anreicherung und Detektion von CTCs mittels CellSearch®-System stellt derzeit den Standard in der CTC-Forschung dar. Nachteile dieser Methode beinhalten die CTC Analyse aus lediglich 7,5 ml Patientenblut sowie der auf EpCAM basierende Marker-abhängige CTC-Nachweis. Dem Gegenüber stellt die Diagnostische Leukapherese (DLA) eine Methode zur Marker-unabhängigen Anreicherung von CTCs dar, die zudem eine Untersuchung eines größeren Blutvolumens auf CTCs ermöglicht (siehe Kapitel 2.2.2.2). Dadurch können auch Zellen angereichert werden, die eine niedrige bzw. keine EpCAM Expression durch EMT-

assoziierte Veränderungen zeigen (siehe Kapitel 1.3.4.6). Ein weiteres Marker-unabhängiges Verfahren ist das ParsortixTM-System, welches CTCs durch eine patentierte Mikrofluidik-Technologie anreichert. Das Prinzip basiert auf einer Größen-abhängigen Separation mit Hilfe einer speziellen Filter-Kassette (siehe Kapitel 2.2.2.4).

Die Identifikation von CTCs erfolgt im Anschluss durch unterschiedliche Methoden: immunzytochemische Methoden, molekulare Methoden, funktionale *in vitro* oder *in vivo* Methoden. Am häufigsten erfolgt die Identifikation anhand immunzytochemischer Verfahren sowie morphologischer Untersuchungen. Die CellSearch®-Methode klassifiziert Zellen als CTCs, die eine intakte Morphologie und damit einen Zellkern aufweisen (DAPI positiv), pan-Zytokeratin positiv und negativ für den Leukozytenmarker CD45 sind [147]. Immunzytochemische Verfahren werden häufig zur Identifikation von CTCs nach Marker-unabhängigen Anreicherung, wie z.B. des ParsortixTM-Systems, eingesetzt. Des Weiteren können CTCs auch über Tumor-assoziierte Transkripte mit Hilfe der qRT-PCR nachgewiesen werden. Durch die geringe Anzahl von CTCs und der Instabilität von mRNAs stellen diese Analysen jedoch eine große Herausforderung dar. Im Jahre 2005 konnten erstmals in CTC-Pools Tumor-assoziierte Transkripte identifiziert werden [153]. In weiteren Studien wurden Tumor-assoziierte Transkripte wie EpCAM, MUC1, HER2, Keratin 19 oder EMT Marker zur Detektion von CTCs verwendet [149, 154, 155].

1.3.7.2. Einzelzellanalysen von CTCs

Molekulare Untersuchungen von CTCs auf Einzelzellebene könnten wichtige Einblicke in die inter-zelluläre Heterogenität von CTCs geben. Aufgrund der sehr geringen Menge an DNA (etwa 6 pg pro Zelle) sowie RNA (etwa 10 pg pro Zelle) stellen molekulare Analysen auf Einzelzellebene eine große Herausforderung dar. 2013 wurde die erste Studie zu Mutationsanalysen einzelner CTCs bei Patienten mit Kolonkarzinom publiziert [156]. Im gleichen Jahr führte die Arbeitsgruppe um Ni et al. erfolgreich die ersten Whole-Exom-Sequenzierungen einzelner CTCs durch [157]. Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner CTCs konnten aufgrund der relativ instabilen mRNA bisher nur in wenigen Studien durchgeführt werden. Die ersten mRNA-Sequenzierungen einzelner CTCs wurden 2012 an einem Patienten mit Melanom durchgeführt [158]. Weitere Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner CTCs wurden mit Hilfe eines dual-kolorimetrischen RNA-in situ Hybridisierungs-Assays sowie durch RT-PCR Analysen erstellt [150, 159]. Der Bedarf nach optimierten semi-automatisierten Arbeitsabläufen zur besseren Abbildung der interzellulären Heterogenität, aus Kombination von Technologien zur Anreicherung, Isolation sowie

Charakterisierung von CTCs auf Einzelzellebene, ist hoch.

1.3.7.3. Kultivierte CTCs – CTC Zelllinien

Molekulare sowie funktionale Analysen aus CTC generierter Zelllinien könnten wichtige Informationen für das Verständnis der Zellbiologie, der Tumorzell dissemination, der Resistenzbildung sowie der Identifikation neuer Zielmoleküle für personalisierte Therapien liefern. CTCs müssen für die Herstellung von CTC-Zelllinien in Kultur genommen werden. In der gegenwärtigen Literatur sind Kurzzeitkultivierung mehrfach beschrieben worden. Im Gegensatz dazu gibt es nur einzelne Fallvorstellungen, in denen eine Langzeitkultivierung von CTCs gelang. Dabei konnte bisher eine CTC-Zelllinie aus einem Patienten mit Kolonkarzinom erfolgreich etabliert werden, welche für 16 Monate kultiviert werden konnte [160]. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom sind zwei CTC-Zelllinien beschrieben [161, 162].

1.3.7.4. Klinische Relevanz von CTCs bei Patientinnen mit Mammakarzinom

Trotz früher Diagnosestellung sowie adäquater Therapie offenbart sich in etwa 20 – 30 % der Patientinnen mit Mammakarzinom im weiteren Verlauf eine Metastasierung [163]. In 40 – 80 % der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom können CTCs nachgewiesen werden. Derzeit werden über 200 klinische Studien (<https://clinicaltrials.gov/>, Stand August 2018) zur Rolle von CTCs durchgeführt. Beim primären sowie metastasierten Mammakarzinom konnte die klinische Relevanz von CTCs als prognostischer Faktor eindeutig belegt werden. Klinische Studien untersuchen derzeit, inwiefern CTCs in dem Therapiemonitoring sowie in der Therapieoptimierung eine klinisch relevante Rolle spielen könnten. Die klinische Relevanz von CTCs bei Patientinnen mit primärem und metastasiertem Mammakarzinom wird im Folgenden erläutert und ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Klinische Relevanz von CTCs bei Patientinnen mit primärem und metastasiertem Mammakarzinom (modifiziert nach [164]).

Potential	Primäres MammaCA	Metastasiertes MammaCA
Prognose	Ja; CTCs sind signifikant mit dem krankheitsfreien Überleben sowie Gesamtüberleben assoziiert	Ja (Evidenz Level I); hohe CTC Zahlen korrelieren mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben sowie Gesamtüberleben (Cut-off:

		5 CTCs/7,5 ml PB)
Therapiemonitoring	Unklar; Nachweis von CTCs zwei Jahre nach Abschluss der CTX ist prädiktiv für ein schlechteres Gesamtüberleben; widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der CTC Anzahl und Ansprechen neoadjuvanter CTX	Wahrscheinlich relevant: Hohe CTC Zahlen nach Beginn einer Erstlinien-CTX können einen Progress angemessen vorhersagen; jedoch profitieren Patienten nicht von einem Wechsel zu einem anderen Regime (Klinische Studien: SWOG 0500, CirCe01)
Therapieentscheidung	Wahrscheinlich relevant; Evidenz ausstehend (Klinische Studien; TREAT CTC, aktiv, Rekrutierung abgeschlossen)	Wahrscheinlich relevant; Evidenz ausstehend (Klinische Studien: STIC CTC METABREAST, DETECT III/IVa/IVb/V)

1.3.7.5. CTCs als prognostischer Faktor

In der metastasierten Situation wurde der prognostische Wert von CTCs erstmals durch eine prospektive Studie der Arbeitsgruppe um Cristofanilli et al. beschrieben [147]. Dabei zeigte sich bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben bei einem Nachweis von mehr als 5 CTCs pro 7,5 ml Blut [147]. Mittlerweile konnte durch eine Vielzahl klinischer Studien diese prognostische Relevanz unter Verwendung des CellSearch®-Systems und des Cut-off Levels von 5 CTCs/7,5 ml Blut bestätigt werden [165, 166]. Gegenwärtig wird deshalb in den Empfehlungen der AGO Kommission Mamma ein CTC Nachweis mittels CellSearch®-System als mögliche Option für die Prognoseabschätzung mit der Empfehlung „+“ bewertet [38]. In einzelnen prospektiven und retrospektiven Studien wurde zudem der Einfluss des molekularen Primärtumor-Subtyps auf die prognostische Relevanz von CTCs untersucht. Wallwiener et al. zeigten, dass die prognostische Relevanz von CTCs unabhängig des zu Grunde liegenden molekularen Subtyps besteht [167].

Auch in der primären Situation konnten mehrere Studien die prognostische Relevanz des Nachweises von CTCs auf das krankheitsfreie Überleben sowie Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Mammakarzinom aufzeigen [168-171]. In der SUCCESS Studie offenbarten

21,5 % der Patientinnen postoperativ bzw. vor Beginn einer Chemotherapie CTCs [168]. Nach drei Jahren zeigte sich bei diesen CTC positiven Patientinnen ein signifikant verringertes krankheitsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben im Vergleich zu CTC negativen Patientinnen [168]. Inwieweit die prognostische Relevanz von einem entsprechenden molekularen Subtyp des Primärtumors abhängt, gilt es noch in der adjuvanten Situation genauer zu untersuchen. Beispielsweise zeigten Boutrus et al., dass CTCs für den *basal-like* oder *HER2 enriched* Subtyp jedoch nicht für luminale Subtypen prognostisch relevant sind [172]. Im Gegensatz dazu offenbarten Giordano et al. eine prognostische Relevanz für alle Subtypen außer des *HER2 enriched* Subtypes [173].

1.3.7.6. CTCs im Rahmen des Therapiemonitorings

Bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom konnten Cristofanilli et al. zeigen, dass eine Persistenz von CTCs unter einer laufenden Erstlinien Therapie mit einer besonders ungünstigen Prognose assoziiert ist [147, 174]. Analog konnte in der amerikanischen Studie SWOG (Southwest Oncology Group) S0500 die prognostische Relevanz des Nachweises sowie der Persistenz von CTCs unter Chemotherapie bestätigt werden. Jedoch brachte der frühe Wechsel einer Therapie bei Tumorzellpersistenz keinen Vorteil für die Patientinnen [175]. Analog dazu untersucht derzeit die CirCé01 Studie (NCT01349842), inwiefern Patientinnen bei steigenden CTC Zahlen unter Therapie von einem möglichen therapeutischen Wechsel profitieren könnten [176].

In der adjuvanten Situation ist die klinische Rolle von CTCs im Rahmen des Therapiemonitorings aufgrund der noch jungen Datenlage derzeit unklar, sodass Therapieentscheidungen basierend auf der CTC Anzahl nur in begründeten Einzelfällen gestellt werden sollten. Der Nachweis von CTCs zwei Jahre nach Abschluss einer adjuvanten Chemotherapie zeigte sich prädiktiv für ein schlechteres Gesamtüberleben [177]. Hinsichtlich der Rolle von CTCs in der neoadjuvanten Situation stellt sich die Studienlandschaft derzeit noch unklar dar [178-180].

1.3.7.7. CTCs im Rahmen der Therapieentscheidung

Bei Metastasierung wird die erneute Bestimmung therapierelevanter Marker empfohlen wie z.B. HER2, ER und PR. Meistens steht jedoch in der metastasierten Situation keine Biopsie der Metastasen zur Verfügung. Da sich Metastase und Primärtumor hinsichtlich relevanter therapeutischer Zielmoleküle unterscheiden können, werden Biomarker zur Untersuchung des aktuellen Status der Erkrankung benötigt. CTCs spiegeln den Phänotyp der Zellen mit dem

Potential der hämatogenen Disseminierung wieder, sodass diese in Echtzeit wichtige Informationen hinsichtlich therapeutischer Zielsequenzen sowie inter- und intratumoraler Heterogenität liefern können. Demnach könnte durch die Charakterisierung von CTCs eine mögliche Therapieoptimierung erfolgen.

In der metastasierten Situation konnten zahlreiche Studien eine inter- und intratumorale Heterogenität hinsichtlich des HER2 Status zeigen [99, 181, 182]. Meng et al. konnten in Patientinnen mit HER2 negativem Primarius HER2 positive CTCs nachweisen [183]. Diese Patientinnen wiesen nach Behandlung mit einer HER2 gerichteten Therapie (Trastuzumab) eine Tumorremission auf. Die Frage, inwieweit Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom klinisch von einer Systemtherapie gegen CTCs profitieren können, wird gegenwärtig in den DETECT Studien (<http://www.detect-studien.de/>) untersucht. DETECT III untersucht den Einsatz einer Therapie mit Lapatinib bei Patientinnen mit HER2 negativem Primarius und HER2 positiven CTCs [181]. Als Ergänzung steht DETECT IV (NCT02035813) bei metastasiertem HER2-negativem Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom sowie HER2 positiven CTCs zur Verfügung. Die DETECT V CHEVENDO Studie (NCT02344472) untersucht die duale HER2-gerichtete Therapie (Trastuzumab und Pertuzumab) in Kombination mit entweder einer endokrinen Therapie oder einer Chemotherapie bei Patientinnen mit metastasiertem HER2-positivem, Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom.

In der adjuvanten Situation wird die Therapie abhängig von der Histochemie des Primärtumors gestellt. Inwiefern CTCs dabei eine Rolle spielen könnten wird gegenwärtig in der „TREAT CTC“ (NCT01548677) Studie untersucht [184]. Dabei werden Patientinnen mit HER2 negativem Primarius und HER2 positiven CTCs hinsichtlich einer gegen HER2-gerichteten Therapie (Trastuzumab) randomisiert.

Zusammenfassend sprechen die derzeitigen Studien für eine prognostische Relevanz von CTCs in der primären sowie metastasierten Situation. Zudem könnte die molekulare Charakterisierung von CTCs wichtige zusätzliche Informationen zur CTC Anzahl liefern. Zahlreiche Studien offenbarten eine intra- und intertumorale Heterogenität zwischen CTCs und Primärtumor hinsichtlich des Phäno- und Genotyps. Deshalb könnte der Nachweis sowie die anschließende molekulare Charakterisierung von CTCs eine zentrale Rolle für das Therapiemonitoring sowie der Therapieoptimierung bei Mammakarzinom-Patientinnen spielen.

1.4. Zielstellung der Arbeit

Das Mammakarzinom ist ein heterogenes Krankheitsbild mit verschiedenen histologischen und molekularen Subtypen. Gegenwärtig basiert die Indikation und Auswahl einer Therapie auf Charakteristika des Primärtumors. Etwa 70 % aller Primärtumore exprimieren Hormonrezeptoren und gelten damit als endokrin sensitiv [33, 34]. Jedoch ist die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie durch primäre sowie sekundäre Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien limitiert [41, 42]. Zahlreiche mögliche Resistenzmechanismen wurden beschrieben, darunter auch der Einfluss intra- und intertumoraler Heterogenität [99]. Der Primärtumor besteht oft aus vielen verschiedenen Subklonen, die eine mögliche Ursache für eine Therapieresistenz darstellen sowie eine unterschiedliche Neigung zur Metastasierung besitzen können. Bereits früh im Krankheitsverlauf zeigen Mammakarzinom-Patientinnen eine hämatogene Dissemination von Tumorzellen. Die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) gelten als Vorläuferzellen von Metastasen. Die prognostische Relevanz von CTCs konnte in zahlreichen klinischen Studien aufgezeigt werden [147, 165, 166]. Darüber hinaus könnten sequentielle CTC-Analysen die Möglichkeit bieten, endokrine Therapien in Echtzeit zu monitorieren sowie gegebenenfalls zu optimieren. Da CTCs eine sehr heterogene Population darstellen, könnte speziell die Charakterisierung einzelner CTCs wichtige Informationen hinsichtlich der inter-zellulären Heterogenität, therapeutischer Zielsequenzen sowie endokriner Resistenzmechanismen liefern. Die Detektion, Isolation und molekulare Charakterisierung einzelner CTCs stellt jedoch aufgrund ihrer Seltenheit eine große Herausforderung dar.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Erstellung von Multi-Marker-Genexpressionsprofilen einzelner CTCs zur Untersuchung der intra-individuellen Heterogenität hinsichtlich relevanter endokriner therapeutischer Zielstrukturen sowie möglicher endokriner Resistenzmechanismen bei metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen mit Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien. Teilziele dieser Arbeit waren:

1) Technische Aspekte

1.1) die Etablierung einer Multi-Marker-Genexpressionsanalyse auf Einzelzellebene bestehend aus Transkripten, die mit dem Phänotyp (epithelial, mesenchymal) einer Zelle sowie mit endokrinen Resistenzmechanismen assoziiert sind

1.2) die Untersuchung des Einflusses von Fixierung und Permeabilisierung auf die Erstellung von Genexpressionsprofilen

2.) Wissenschaftliche Aspekte

2.1) Genexpressionsanalysen einzelner CTCs nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kit

2.2) Genexpressionsanalysen einzelner CTCs nach Anreicherung mittels Diagnostischer Leukapherese und Parsortix™-Systems

2.3) Genexpressionsanalysen einzelner kultivierter CTCs nach Anreicherung mittels Diagnostischer Leukapherese und Parsortix™-Systems

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Zellen

Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Hersteller
Zelllinien			
MCF-7	Mensch	Zellen eines Pleuraergusses aus einer Patientin mit metastasiertem Adenokarzinom der Brust	ATCC, Manassas, USA
MCF-7/TAMR1	Mensch	Zellen eines Pleuraergusses aus einer Patientin mit metastasiertem Adenokarzinom der Brust	Merck Chemikalien, Darmstadt, Deutschland
MDA-MB-231	Mensch	Adenokarzinom der Brust	ATCC, Manassas, USA
Primäre Zellen			
Kultivierte CTCs	Mensch	Blut einer Patientin mit metastasiertem Adenokarzinom der Brust	Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik, Düsseldorf, Deutschland

2.1.2. Kulturmedien

Medium	Komponenten	Menge/Konzentration
Komplettmedium für MCF-7 und MDA-MB-231	DMEM/F12 ohne Phenolrot mit	

	L-Glutamin	2.5 mM
	FCS	1%
	Insulin	6 ng/ml
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	DMEM/F12 ohne Phenolrot	
	mit	
Komplettmedium für MCF-7/TAMR1	L-Glutamin	2.5 mM
	FCS	1 %
	Insulin	6 ng/ml
	Tamoxifen	1 uM
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	RPMI 1640 mit	
Komplettmedium zur CTC Kultivierung	B27	1x
	hEGF	20 ng/ml
	FGF2	20 ng/ml
	Penicillin/Streptomycin	1 %

2.1.3. *Chemikalien*

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) Ratiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
BSA	PAA, Cölbe, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Decon	Decon Laboratories Limited, Sussex, UK
Dimethylsulfoxid, DMSO (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dithiothreitol, DTT (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ethanol, >99 % (C ₂ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyd (CH ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
hEGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FGF2	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol (2-Propanol, C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH ₄ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natrium Desoxycholsäure (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat, SDS, 10 % (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nonidet P 40 Substrat, 1%, (NP-40)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
ProteinaseK	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Recombinantes humanes Insulin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti®-Quant (Bradford-Reagenz)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA, 1x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasser, Nuklease-frei	Qiagen, Venlo, Niederlande

2.1.4. *Antikörper*

Primäre Antikörper	Spezies	Klon	Methode	Hersteller
β-Aktin	Kaninchen	Sc-1616	WB	Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA

EpCAM-FITC	Maus	VU1D9	IF	Stemcell™ Technologies, Köln, Deutschland
ER α	Kaninchen	SP1	WB, IF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pan-Zytokeratin	Maus	AE1/AE3	IF	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD 45-AF 647	Maus	3S-Z5	IF	Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Vimentin-AF 488	Maus	RV202	IF	BD Biosciences, San Jose, USA

Sekundärantikörper	Spezies	Klon	Methode	Hersteller
Anti-Kaninchen-AF 488	Ziege	polyklonal	IF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Maus-AF 488	Ziege	polyklonal	IF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Sc-2004	WB	Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA

weitere Fluorophore	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (Höchst)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5. *Kits*

Bezeichnung	Hersteller
CelluLyser Micro Lysis and cDNA Synthesis Kit	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
TATAA PreAmp GrandMaster® Mix	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
TATAA GrandPerformance Cancer Panel PreAmp Primer Mix	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
TATAA GrandPerformance Assays	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden

TATAA Probe GrandMaster® Mix	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ Coomassie Plus Bradford Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien
CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Control Kit	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien

2.1.6. *Molekulargewichtsmarker*

Marker	Hersteller
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.7. *TATAA Probe/Primer Assays*

Bezeichnung/Gen	Hersteller
GAPDH	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
EpCAM	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
MUC1	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
KRT19	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
CDH2	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
SNAI1	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
VIM	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
Twist1	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
ALDH	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
CD_44 all	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
CD24L4	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
Myc	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
ESR1	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
ESR2	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
PGR	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
EGFR	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden

VEGFR1	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
VEGFR2	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
IGFR	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
VEGFA	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
PI3K	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
AKT2	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
mTOR	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
FOXO	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
PTEN	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
CCND1	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
HDAC2	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
ERBB2	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
GAPDH	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
ACTB	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden
UBC	TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden

2.1.8. *Verwendete Lösungen und Puffer*

Lösung/Puffer	Komponenten	Menge/Konzentration
Proteinanalysen		
1x RIPA Lyse Puffer pH 7,6	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1 %
	Natriumdesoxycholat	0,5 %
	SDS	0,1 %
	+ Protease- /Phosphatase-Inhibitor	
10x SDS Laufpuffer	Tris	0,25 M
	SDS	1 % (w/v)
	Glycin	1,92 M
1x Blotting Puffer	Tris	0,25 mM
	Glycin	0,2 M
	Methanol	20 % (v/v)

	Tris	20 mM
1x TBS-T (Waschpuffer)	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1 % (v/v)
weitere Puffer	Hersteller	
CELLTRACKS® AUTOPREP® Instrument Puffer	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien	

2.1.9. *Geräte*

Gerät	Hersteller
Aesculap anatomische Pinzette	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Brutschrank HERACELL 150i	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
CELLSEARCH®	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien
CellCelector™	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena, Deutschland
CellCelector™ Flowbox	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena, Deutschland
CellCelector™ Magnet-Adapter	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena, Deutschland
CELLTRACKS ANALYZER II®	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien
ChemiDoc™ MP-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophorese Kammer Mini- PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss Miskroskopie GmbH, Jena, Deutschland
Laborwaage METTLER PM 480 Delta Range®	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Laborwaage METTLER Toledo AG 204	Mettler-Toledo, Columbus, USA

LightCycler® 480 II System	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Luminometer Victor3 1420	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Magnetrührer Ikamag RED®	Jahnke und Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland
Mikroplatten-Reader Anthos Reader HAT2	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Mikroskop Leica DM IRB	Leica Camera, Wetzlar, Deutschland
Thermozykler PegStar	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermoschüttler Peqlab Parsortix™	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland ANGLE, Surrey, UK
pH-Meter Ultra Basic	Denver Instrument, NY, USA
Pipetten (1-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler Swip	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
SDS-PAGE Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spectra Optia® Systems	Terumo BCT, Inc., Lakewood, USA
Spectra Optia® MNC collection set	Terumo BCT, Inc., Lakewood, USA
Spannungsgerät PowerPac™ Universal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 2100	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Trans-Blot® Semi-Dry, Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge ROTOFIX 32A	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.10. *Software*

Software	Hersteller
GraphPad PRISM 5	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.51d	NIH, Bethesda, USA

Microsoft Excel 2017	Microsoft Corporation, Redmond, USA
CELLTRACKS® AUTOPREP® System	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien
ZENlite	Carl Zeiss Miskroskopie GmbH, Jena, Deutschland
MeV 4.9	http://mev.tm4.org/ (open source)
Past 3.2	https://folk.uio.no/ohammer/past/index.html (open source, University of Oslo)

2.1.11. *Verbrauchsmaterialien*

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
ALS MagnetPick™ Adapter	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena Deutschland
ALS MagnetPick™ Objektträger	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena Deutschland
B-27™ 50 x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CellSave® Preservation Tubes	Menarini-Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien
CellCelector™ Glaskapillaren 20 um, 40 um	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena Deutschland
CellCelector™ magnetische Objektträger	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena Deutschland
CELLSTAR® 96-well Zellkulturplatte	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
CELLSTAR® Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
CELLSTAR® Falcon Röhrchen	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
Costar® Stripette®	Corning, New York, USA
DAKO Antibody Diluent	DAKO, Glostrup, Dänemark
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Glostrup, Dänemark
DAKO Protein Blocking Solution	DAKO, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königsholfe, Deutschland
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Einwegpipetten, steril	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Filter Easy strainer™	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
FrameStar®384-well Platte	4titude® Ltd, Surrey, USA
Immun-Blot® PVDF Transfer Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Kryo-Röhrchen	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
Objektträger	VWR International, Radnor, USA
Parsortix™ Kassette	ANGLE, Surrey, UK
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
PCR-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Gefäße	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
TipOne® Pipettenspitzen	STARLAB International, Hamburg, Deutschland
Ratiolab® Blottingpapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spritzenfilter 0,2 um	VWR international, Radnor, USA
SuperBlock Blocking Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zählkammer „Neubauer Improved“	Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. *Zellbiologische Methoden*

2.2.1.1. **Zelllinien: MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231**

Bei der adhärennten MCF-7 Zelllinie handelt es sich um eine Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinom-Zelllinie, die 1970 aus einem Pleuraerguss einer weißen (kaukasischen) 69-jährigen Frau mit einem metastasiertem duktalem Mammakarzinom isoliert wurde [185]. Die adhärennte MCF-7/TAMR1 Zelllinie ist eine Tamoxifen resistente Zelllinie, die durch Langzeitkultivierung unter Tamoxifen aus der Zelllinie MCF-7/S0.5 etabliert wurde.

Bei der adhärennten MDA-MB-231 Mammakarzinom-Zelllinie handelt es sich um eine trippelnegative Zelllinie (claudin low) mit mesenchymalen Phänotyp, die aus dem Pleuraerguss einer weißen (kaukasischen) 51-jährigen Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom in den 1970er Jahren isoliert wurde [186].

2.2.1.2. **Kultivierung und Passagieren von Zelllinien**

Die adhärennten Zelllinien wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und in 5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre unter sterilen Bedingungen im Brutschrank in ihren entsprechenden Kulturmedien kultiviert.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig mit frischem Medium bei ca. 80 % Zelldichte ein bis zwei Mal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank für 2 - 5 min inkubiert. Dies führte zur Ablösung der adhärennten Zellen von der Zellkulturflasche. Durch Zugabe von 5 ml frischen vorgewärmtem Medium wurde die Trypsin-EDTA Wirkung abgestoppt. Nach fünf minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm unter RT wurde das entstandene Zellpellet mit vorgewärmtem Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen entsprechend der Dichteverhältnisse gesplittet oder für weitere Versuche nach Zellzahlbestimmung in Zellkulturschalen oder auf Deckgläschen ausgesät.

2.2.1.3. **Kryokonservierung und Rekultivierung**

Die Versuchsdurchführung der Kryokonservierung erfolgte unter der Sterilbank. Dazu wurden die Zellen, wie in 2.2.1.2 beschrieben, abgelöst und bei 1100 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium (90 % Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Über

Nacht erfolgte im ersten Schritt das Einfrieren der Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittels Einfrierbox, die eine graduelle Abkühlung von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ermöglicht. Die Kryo-Röhrchen wurden am Folgetag zur Langzeit-Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) überführt.

Für die Re-Kultivierung wurden die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss konnte die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit frischem Kulturmedium überführt und weiter kultiviert werden.

2.2.1.4. Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl pro Mikroliter diente die „Neubauer improved“ Zählkammer. Diese besteht aus neun großen Quadraten, von denen die 4 Eckquadrate mit je 16 kleinen Quadraten ausgezählt wurden. Die Eckquadrate haben jeweils eine Kantenlänge von 1 mm mit einer sich daraus resultierenden Fläche von 1 mm^2 .

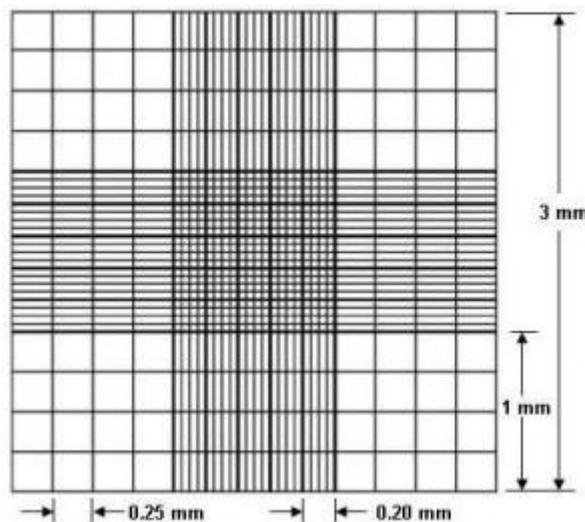


Abbildung 6: Neubauer improved Zählkammer (<http://proscitech.com.au/cataloguex/img/s/sv520-n.jpg>)

Für die Zellzahlbestimmung wurde nach Ernte ein Aliquot der Zellsuspension entnommen. Die Zellsuspension wurde in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau versetzt und die Lebendzellzahl der 4 Eckquadrate mäanderförmig unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellzahl je μl ergibt sich aus folgender Berechnung:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{Mittelwert der gezählten Zellen pro Eckquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.1.5. Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Für die Fixierung von Zellkulturzellen wurde nach der Zell-Ernte ein Aliquot der Zellsuspension entnommen. Nach Bestimmung der Zellzahl und Waschen der Zellen mit PBS wurden 5000 Zellen in Reaktionsgefäße mit 7 ml vorgewärmten PBS überführt. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Überführung der Zellsuspension in CellSave® Preservation Tubes. Die CellSave® Preservation Tubes wurden für 48 h bei 4 °C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Mikromanipulation von Einzelzellen (siehe Kapitel 2.2.2.6) bzw. die Permeabilisierung.

Native oder bereits fixierte Zellkulturzellen wurden mit Hilfe von Triton X-100 permeabilisiert. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 8 min bei RT in PBS/Triton X-100 (0,1 %) Lösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS die Mikromanipulation von Einzelzellen (siehe Kapitel 2.2.2.6).

2.2.2. Gewinnung von CTCs

Zur Gewinnung von CTCs wurde venöses Blut oder Proben, welche mittels Diagnostischer Leukapherese (DLA; siehe Kapitel 2.2.2.2) gewonnen wurden, verwendet. Peripheres Blut wurde von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom im Interdisziplinären Zentrum für ambulante Chemotherapie (IAC) des Universitätsklinikums Düsseldorf in CellSave® Preservation Tubes abgenommen.

Die Gewinnung und Aufarbeitung der DLA-Proben von Patientinnen erfolgte am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) sowie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Dr. Johannes Fischer und Herrn Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein.

Entsprechende Ethikanträge sowie Genehmigungen der zuständigen Ethikkommission liegen für die durchgeführten Probenentnahmen und Untersuchungen vor. Vor Probenentnahme erfolgte die schriftliche Einwilligung der Patienten zur Verwendung des gewonnenen Materials für Forschungszwecke.

2.2.2.1. Anreicherung und Detektion von CTCs mit dem CellSearch®-System

Das CellSearch®-System ist ein standardisiertes semi-automatisiertes Verfahren zur Anreicherung mit immunzytochemischen Nachweis von CTCs. Es ist bisher das Einzige von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Testverfahren zum Nachweis von CTCs bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Den Patientinnen wurden 7,5 ml Blut über eine periphere Nadel oder eine Venenverweilkanüle in CellSave® Preservation Tubes abgenommen und innerhalb von 96 h entsprechend der Herstellervorgaben mit Hilfe des

CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits prozessiert (Abbildung 7). Dieses beinhaltet ein Capture-Reagenz zur Separation und Anreicherung von CTCs sowie Fluoreszenz-Reagenzien, die eine Detektion möglich machen. Das auf Ferrofluiden basierende Capture-Reagenz besteht aus Nanopartikeln mit einem magnetischen Kern. Diese sind von einer polymeren Schicht von Antikörpern mit Bindungskapazität für das Oberflächenmolekül EpCAM umgeben. Zur Detektion von CTCs erfolgt nach immunomagnetischer Bindung und Separation die Zugabe von Fluoreszenz-Reagenzien: Phycoerythrin-konjugierte Antikörper gegen Zytokeratin 8, 18 und 19; ein Allophycocyanin-konjugierter Antikörper gegen CD45 zur Differenzierung von CTCs zu Leukozyten; den Kernfarbstoff DAPI sowie Puffer zur Permeabilisierung der Zellmembran. Mit Hilfe des semi-automatisierten Mikroskop-Systems CellTracks® Analyzer II erfolgte die Analyse der detektierten Ereignisse. Die Auswertung positiver Ereignisse erfolgte durch eine zytologisch erfahrene Person. Im Rahmen des Qualitätsmanagements erfolgte die regelmäßige Kontrolle der Proben-Verarbeitung mit Hilfe des CellSearch® Circulating Tumor Cell Control Kits.

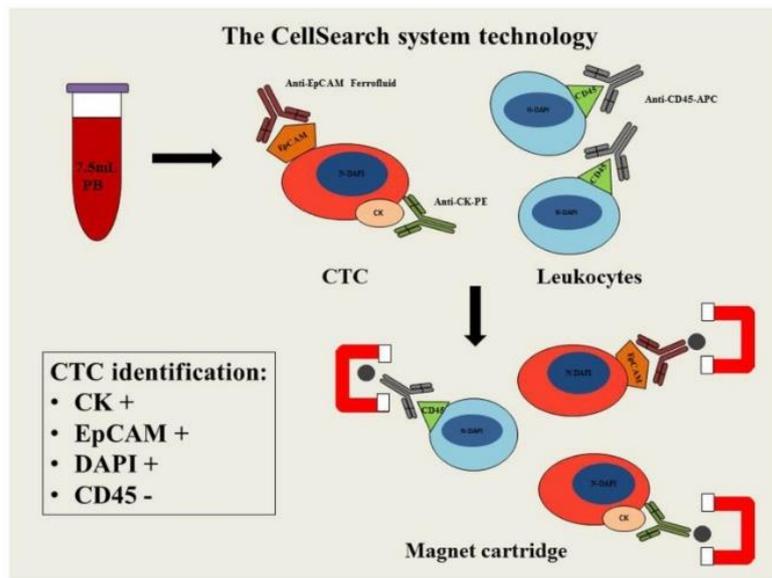


Abbildung 7: Prinzip der Anreicherung und Detektion von CTCs mit Hilfe des CellSearch®-Systems (Truini *et al.*, 2014 [187]).

2.2.2.2. Anreicherung mit Hilfe der Diagnostischen Leukapherese (DLA)

CTCs werden normalerweise in Patientenproben peripheren Bluts detektiert. Da in den Patientenproben CTCs nur in sehr geringer Anzahl zu finden sind, könnte die Analyse eines größeren Blutvolumens einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl und Detektionsraten von

CTCs haben. Eine Möglichkeit stellt die Nutzung der Diagnostischen Leukapherese (DLA) dar [142].

Die DLA ist ein Verfahren zur extrakorporalen Separation von Zellen deren Dichte im Bereich zwischen 1,05 und 1,088 g/l liegt. Zu dieser Zellpopulation zählen mononukleäre Blutzellen sowie CTCs. Analog zu der bereits in der Klinik eingesetzten therapeutischen Leukapherese erfolgt die DLA mit dem Unterschied, dass eine Gabe von GCSF zur Mobilisierung von Stammzellen nicht erforderlich ist. Es wird durchschnittlich 2,6 l Blutvolumen prozessiert (0,8-6,2 l), sodass die Dauer der DLA ca. 1 h beträgt. Die DLA wurde mit Hilfe des Spectra Optia® Systems am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Während der DLA wird der Patientin über einen peripheren venösen Zugang Blut entnommen und in ein steriles Schlauch-System geleitet (Abbildung 8). Das Blut fließt über das Schlauchsystem in den Zellseparator, in dem die Separation der einzelnen Blutzellen mittels Zentrifugation anhand ihrer Dichte erfolgt. Ein Gerinnen des Vollblutes wird durch die Zugabe von ACDA (Acid Citrate Dextrose solution A) verhindert. Durch die DLA wurden pro Patient zwischen 30 und 50 ml Probenmaterial gewonnen. Unter sterilen Bedingungen wurden Aliquots der entsprechenden DLA-Probe erstellt. Für die weiteren Versuche wurden Aliquots mit 10^8 mononukleären Zellen verwendet.

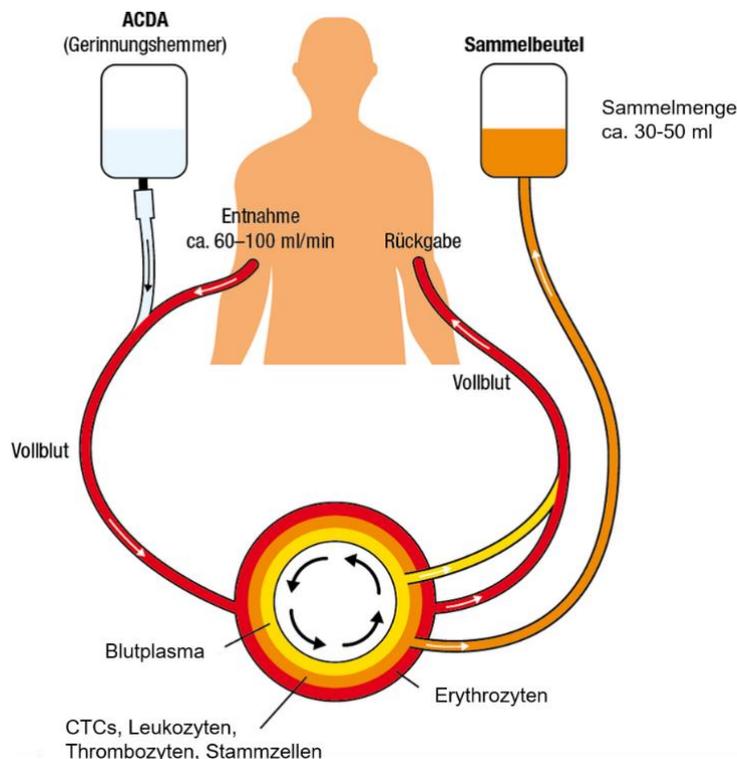


Abbildung 8: Ablauf der Diagnostischen Leukapherese (DLA) zur Anreicherung von CTCs mit Hilfe des Spectra Optia® Systems (modifiziert nach <https://www.cellex.me/de/blutstammzellspende/arten-der-entnahme/periphere-stammzellentnahme>): Das Grundprinzip basiert auf einer extrakorporalen Blutzellseparation. Vollblut wird durch Zentrifugation in seine Bestandteile aufgeteilt. Durch die Zugabe des Gerinnungshemmers ACDA wird eine Gerinnung im Schlauchsystem verhindert. Die CTC-haltige Schicht (Dichte zwischen 1,05 und 1,088 g/l) wird separiert und in einem Sammelbeutel aufgefangen. Die restlichen Blutbestandteile werden dem Patienten wieder zurückgeführt. ACDA = Acid Citrate Dextrose solution A, CTCs=circulating tumor cells.

2.2.2.3. Kryokonservierung von DLA Proben

Zur Elimination unerwünschter Thrombozyten erfolgte die Zentrifugation bei 200 x g für 10 min bei 4 °C. Im Anschluss wurde der weiße Thrombozyten-haltige Überstand abgenommen. Nach Hinzugabe von 2 ml Einfriermedium (45 % RPMI 1640, 45 % HSA, 10 % (v/v) DMSO) erfolgte im ersten Schritt das Einfrieren der Zellen bei -80 °C mittels Einfrierbox über Nacht zur graduellen Abkühlung von -1 C°/min. Am Folgetag wurden die DLA-Proben zur Langzeit-Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

2.2.2.4. Aufarbeitung von DLA Proben über das Parsortix™-System

Die Anreicherung von CTCs mit Hilfe des Parsortix™-Systems basiert auf einem patentierten semi-automatisierten Mikrofluidik-System (Abbildung 9). Mit Hilfe einer speziellen Kassette erfolgt die Anreicherung abhängig von der Zellgröße sowie der Zellflexibilität ohne Verwendung von Oberflächenmarkern. Über ein Schlauchsystem werden Proben mit einem Druck von 99 mbar durch eine Einmal-Filter-Kassette des Parsortix™-Systems gepumpt. Jede Filter-Kassette besteht aus 6,5 um großen Separations-Stufen, die den Durchfluss von größeren Zellen wie Leukozyten und Tumorzellen verhindern. Zellen kleiner 6,5 um können die Stufen passieren und werden dadurch von größeren Zellen separiert.

Im ersten Schritt erfolgte die Sterilisation mittels 100 % Ethanol sowie das anschließende Durchspülen mit Hilfe von PBS der Schlauchsysteme und der Filter-Kassette zur Entfernung von Luftblasen. Die kryokonservierten DLA-Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss erfolgte das Überführen der DLA-Probe durch einen 100 ul Filter in ein Falcon-Reaktionsgefäß. Nach Verdünnung in vorgewärmten PBS (1:20) wurde die entsprechende DLA-Probe in der Probenhalterung des Parsortix™-Systems arretiert und die Probe durch die Filter-Kassette gepumpt. Nach Inversion der Fließrichtung erfolgte die Elution, der in der Filter-Kassette angereicherten CTCs, in ein Reaktionsgefäß zur Langzeitkultivierung sowie zur Durchführung weiterer molekularer Analysen. Abschließend erfolgte eine automatische Durchspülung des Parsortix™-Systems mittels DeconReagenz zur Gewährleistung steriler Arbeitsbedingungen.

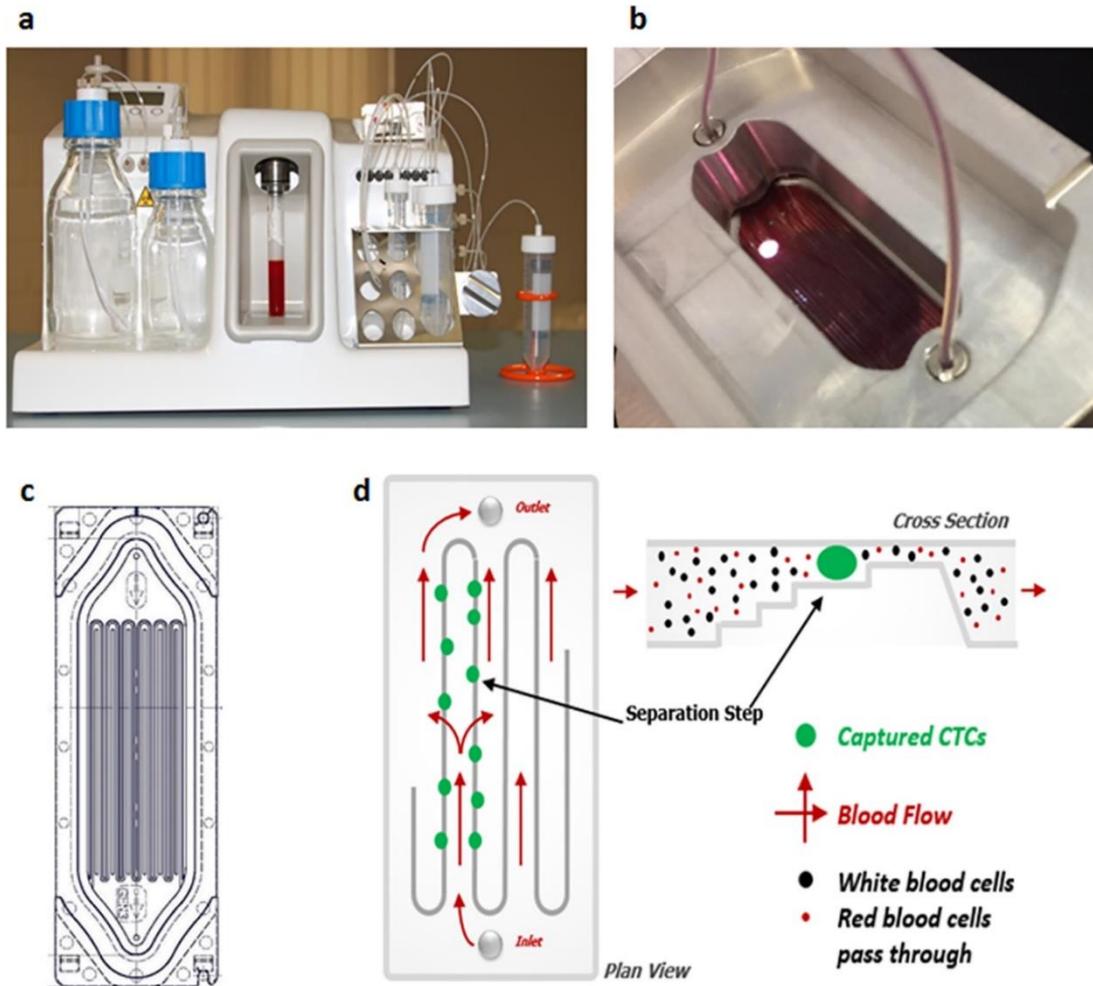


Abbildung 9: Anreicherung von CTCs mit Hilfe des Parsortix™-Systems (Xu *et al.*, 2015 [144]): (a) Aufbau des Parsortix™-Systems (b) Aufsicht der Klemme, welche die Filter-Kassette einspannt (c) Aufbau der Filter-Kassette (d) Prinzip der Anreicherung von CTCs.

2.2.2.5. Langzeitkultivierung von CTCs

Nach der CTC Anreicherung aus DLA-Proben über das Parsortix™-System wurde die Probe in 4 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Es erfolgte die Kultivierung in Kulturmedium als Zellsuspension im Brutschrank unter sterilen Bedingungen in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C mit einem CO₂ Gehalt von 5 % und einem O₂ Gehalt von 4 %. Alle drei Tage wurde das Kulturmedium gewechselt.

2.2.2.6. Isolation von Einzelzellen mittels Mikromanipulation

Mit Hilfe des semi-automatisierten CellCelector™-Systems wurden Einzelzellen detektiert und isoliert (Abbildung 10). Dabei erfolgte nach Detektion anhand morphologischer und immunzytochemischer Kriterien die semi-automatische Mikromanipulation einzelner Zellen.

Die Probe wurde auf einen ALS MagneticPick™ Objektträger aufgetragen, der in einem ALS MagneticPick™ Adapter des Mikromanipulator-Systems arretiert ist. Im Anschluss wurde die senkrecht eingesetzte Glaskapillare des Mikromanipulators in einer Höhe zwischen 15 und 25 µm über der Objektträgerfläche kalibriert. Mittels 20x Objektiv wurde die Probe bei Durchlicht sowie in entsprechenden Fluoreszenzkanälen mäanderförmig durchmusterter. Nach Auswahl der zu isolierenden Zelle, erfolgte nach Vorlegen von 9 µl PBS-Puffer in die Kapillare die Aspiration der Zelle in 20 nl Volumen. Die Zellen wurden im Anschluss in PCR-Reaktionsgefäße, gefüllt mit 50 µl PBS, 10 mm über dem Boden abgelegt. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden im Anschluss für 5 min bei 1000 rpm in einer Mikrotischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand bis auf 1 µl Restvolumen abgenommen. Die Zellen wurden anschließen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

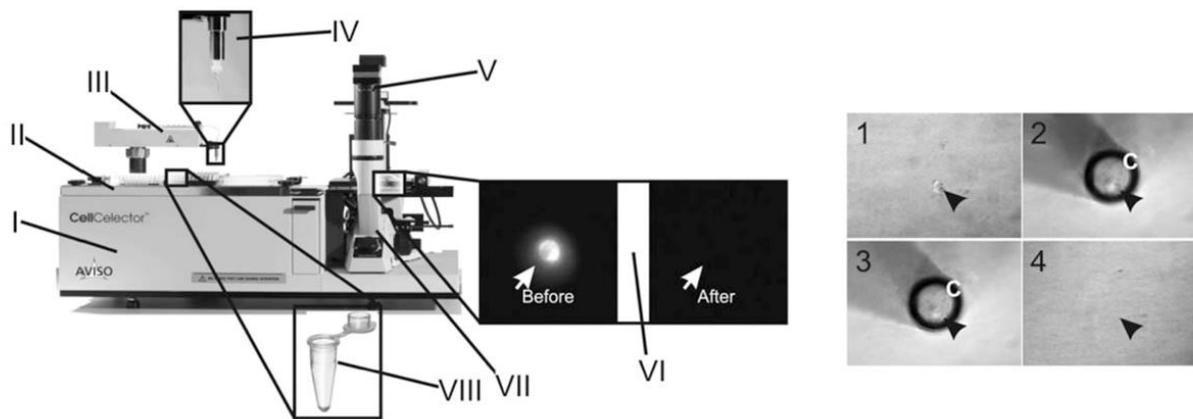


Abbildung 10: CellCelector™-Mikromanipulator (Neumann *et al.*, 2016 [188]) : Das CellCelector™-System besteht aus einem Mikromanipulator (I), einem Roboterarm mit einer 25 µl Hamilton-Spritze (III) sowie einem Kapillarhalter (IV), ein motorisierter Kreuztisch zur Probenablage (VII), ein Ablagetisch zur Arretierung von Reaktionsgefäßen sowie für Puffer- und Sterilisationsreservoirre (II, VIII) und ein invertiertes Mikroskop mit einer CCD Kamera (V).

2.2.3. RNA-Expressionsanalysen von Einzelzellen und gepoolten Einzelzellen

2.2.3.1. RNA-Extraktion

Die RNA der Zellproben wurde mit Hilfe des *CelluLyser™ Micro lysis buffers* extrahiert. Bei der Zelllyse mittels des *CelluLyser™ Micro lysis buffers* wurde ein Vorverdau mittels ProteinaseK durchgeführt. Dafür wurde 2 µl ProteinaseK (2mg/ml) in die entsprechenden

Reaktionsgefäße mit den abgelegten Einzelzellen bzw. gepoolten Zellen zugefügt. Der ProteinaseK-Verdau erfolgte im PCR-Cycler nach folgendem Programm:

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für den ProteinaseK-Verdau

Schritt	Dauer	Temperatur
1.	45 min	40 °C
2.	5 min	95 °C
3.	∞	4°C

Im Anschluss wurde die weitere Lyse unter Hinzugabe von 3 ul *CelluLyser™ Micro lysis buffers* durchgeführt. Die RNA wurde bei Bedarf bei -80 °C eingelagert.

2.2.3.2. cDNA Synthese

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des cDNA Synthesis Kits durchgeführt. Die cDNA wurde mittels einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängigen DNA-Polymerase) hergestellt. Der Reaktionsansatz ergibt sich aus folgender Zusammensetzung:

Tabelle 4: Reaktionsansatz des cDNA Synthesis Kits.

Substanz	Volumen (ul)
Nuklease freies Wasser	2,5
TATAA GrandScript RT Reaction Mix (5x)	2
TATAA GrandScript RT Enzyme	0,5
Endvolumen	5

Ein Gesamtvolumen von 5 ul wurde mit Hilfe von Nuklease-freiem Wasser erzielt. Die cDNA Synthese erfolgte im PCR-Cycler nach folgendem Programm:

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen des cDNA Synthesis Kits.

Schritt	Dauer	Temperatur
1.	5 min	22 °C
2.	30 min	42 °C
3.	5 min	85 °C
4.	∞	4 °C

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert.

2.2.3.3. Präamplifikation

Zur Analyse der RNA-Profile von Einzelzellen bzw. kleiner Anzahl gepoolter Zellen wurde eine Präamplifikation der zu untersuchenden Gene mit Hilfe des PreAmp GrandMaster® Mix durchgeführt. Der Reaktionsansatz ergibt sich aus folgender Zusammensetzung:

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die Präamplifikation.

Substanz	Volumen (ul)
TATAA PreAmp Grand Master Mix (2x)	10
GrandPerformance Cancer Panel PreAmp Primer Mix	2
Nuklease freies Wasser	6
cDNA	2
Endvolumen	20

Ein Gesamtvolumen von 20 ul wurde mit Hilfe von Nuklease-freiem Wasser erzielt. Die Präamplifikation erfolgte im PCR-Cycler nach folgendem Programm:

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen der Präamplifikation.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
1.	1 min	95 °C	1 x
2.	15 s	95 °C	17 x
3.	2 min	60 °C	17 x
4.	1 min	72 °C	17 x

Im Anschluss erfolgte das direkte Einfrieren der Proben bei -80 °C.

2.2.3.4. quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Im Anschluss wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR-Technologie die mRNA Expression mit Hilfe spezifischer Hydrolyse-Sonden des TATAA CTC Grand Performance Assays quantifiziert (Abbildung 11). Bei den Hydrolyse-Sonden handelt es sich um sequenzspezifische Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) sowie einem minor groove binder (MGB) markiert wurden.

Die Hydrolyse-Sonde lagert sich an die komplementäre Zielsequenz (Annealing) zwischen Forward und Reverse Primern an. Der MGB dient zur Stabilisierung der hybridisierten Hydrolyse-Sonde. Durch die enge räumliche Beziehung zum NFQ wird das Fluoreszenzsignal des Reportes aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) supprimiert. Die Sonde wird während der Amplifikation durch die 5'-Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase hydrolysiert. Die Hydrolyse der Sonde führt zur räumlichen Trennung des Reporter-Fluorophors vom NFQ. Dadurch entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zu den Amplifikationszyklen zunimmt. Die Messung erfolgt in jedem Amplifikationszyklus in der exponentiellen Phase am Ende der Elongation. Dabei korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität proportional mit der Quantität der Amplikons.

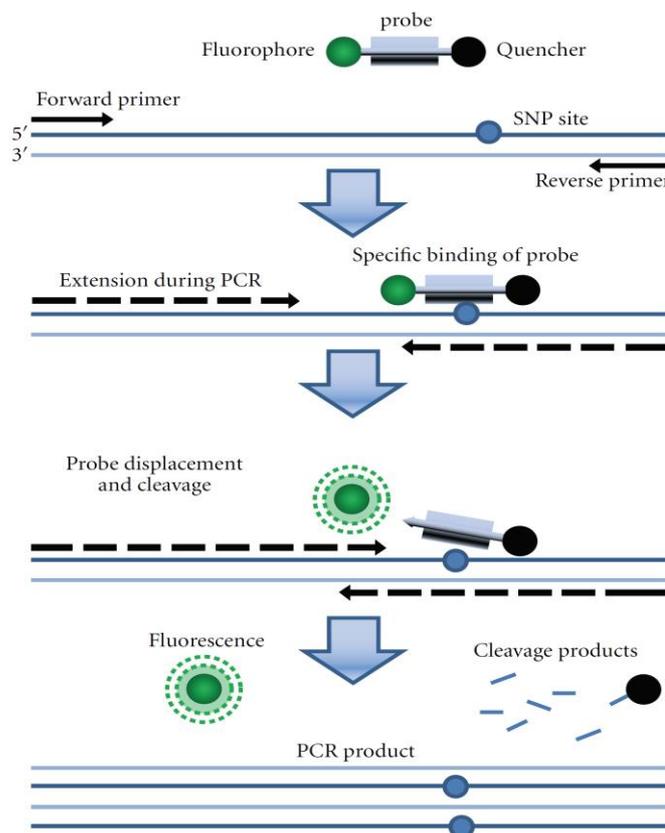


Abbildung 11: Funktionsprinzip der qRT-PCR (modifiziert nach Bass *et al.*, 2010 [189]).

Für die Expressionsanalyse wurden Sonden der Firma TATAA verwendet. Als Reporter-Fluorophor diente FAM. Der Reaktionsansatz ergibt sich aus folgender Zusammensetzung:

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die qRT-PCR.

Substanz	Volumen (ul)
TATAA Grand Master Mix (2x)	5
Probe Primer Assay	0,4
Nuklease freies Wasser	2,6
cDNA Präamplifikation (1:10 mit H ₂ O verdünnt)	2
Endvolumen	10

Die quantitative Real Time PCR erfolgte im LightCycler® 480 II System nach folgendem Programm:

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
1.	60 s	95 °C	1 x
2.	5 s	95 °C	45 x
3.	60 s	60 °C	45 x

Die PCR erfolgte mit Hilfe der LightCycler® Software 4.1. Die Messwerte aus dem Analysen-Manager wurden quantitativ nach der Delta-Ct-Methode ausgewertet. Die Ct-Werte (cycle of threshold) entsprechen Zyklen, in denen sich die gemessenen Fluoreszenzen zum ersten Mal signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz abheben. Je niedriger der gemessene Ct-Wert, desto mehr Zielsequenz war in den Proben vorhanden.

Die Auswertung der Daten für Einzelzellanalysen erfolgte nach Herstellervorgaben [190]. Es wurde ein $Ct_{Cut\ off}$ von 35 festgelegt, sodass alle detektierte Ct-Werte größer 35 gleich 35 gesetzt wurden. Zudem wurde bei bestehender heterogener Zellpopulationen ein Ct-Wert für fehlende Ct Werte gleich 37 festgelegt. Die Bestimmung der zu untersuchenden mRNA Menge (Delta-Ct) gelang durch die relative Quantifizierung (RQ) zum $Ct_{Cut-off}$. Bei gepoolten Zellen erfolgte zur Normierung die Teilung der Anzahl der Transkripte durch die entsprechende Anzahl der gepoolten Zellen. Im Anschluss erfolgte die Bildung des Logarithmus zur Basis 2. Die Berechnung wurde wie folgt durchgeführt:

ΔCt	$= Ct_{35} - Ct_{Zielgen}$
RQ	$= 2^{\Delta Ct}$ oder $= 2^{\Delta Ct} / \text{Anzahl der Zellen (bei gepoolten Zellen)}$
Log	$= \log_2(RQ)$

Abschließend erfolgte die Zentrierung des Gens auf den Mittelwert des entsprechenden Genpools.

2.2.4. *Methoden zur Proteinanalyse*

2.2.4.1. **Zellyse**

Die adhärennten MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen wurden mittels 5 ml PBS in den Kulturschalen gewaschen und anschließend nach Zusatz von 2 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Nach Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1100 rpm mit Abnahme des Überstands. Im Anschluss wurden die Zellpellets mit 100 μ l RIPA-Lysepuffer resuspendiert und für 20 min bei 4 °C und 750 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Eine im Anschluss durchgeführte 20 min Zentrifugation bei 14000 rpm führte zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile des Zellysats. Nach Überführung des Überstands in neue Reaktionsgefäße wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert.

2.2.4.2. **Proteinbestimmung mittels BCA-Assay**

Zur quantitativen, unselektiven, photometrischen Bestimmung der Proteine diente das Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Der BCA-Test (Bicinchoninsäure-Test) basiert unter alkalischen Bedingungen auf der Bildung von Cu^{2+} Komplexen mit Proteinen [191]. Die Komplex-Bildung hat eine Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^+ zur Folge. Die Menge der vorhandenen Proteine ist dabei direkt proportional zur Menge des reduzierten Kupfers. Nach Zugabe von Bicinchoninsäure entsteht ein violetter Farbstoff. Als Kalibrierung diente eine Eichkurve mit 1-14 μ l BSA. Den entsprechenden 2,5 μ l Proteinproben wurden je 200 μ l Detektions-Reagenz (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) zugefügt. Als Kalibrierung diente die Zugabe von BSA zur Standardprobe bzw. der jeweilige Lysispuffer zur Leerprobe. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße kurz geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert. Im Photospektrometer erfolgte die Messung des Extinktionskoeffizienten bei 540 nm.

2.2.4.3. **SDS-PAGE**

Das Auftrennen der Proteine wurde mit Hilfe der vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) anhand ihrer unterschiedlichen

Molekülgrößen durchgeführt. Das anionische Detergens SDS führt durch Aufspaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur zu einer Ausbildung linearer Protein-SDS-Komplexe (Denaturierung). Die gebildeten Protein-SDS-Komplexe zeigen ein gleiches Ladungs/Masse Verhältnis und eine gleichmäßig negative Oberflächenladung auf. Die Separation der Proteine basiert demnach nur auf der relativen Größe der Polypeptidketten im Polyacrylamidgel.

Bei der vertikalen, diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei verschiedene Gele, Trenngel und Sammelgel, verwendet. Diese führen durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften (pH-Werte und Porengröße) zur Konzentrierung bzw. anschließenden Trennung der Proteine. Zuerst wurde ein Mini-PROTEAN® TGX™ Fertiggel in die Elektrophoresekammer installiert und die Apparatur mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Zu 25 ug Protein wurden 5 ul SDS-Ladepuffer hinzugegeben, 3 min bei 95 °C denaturiert und im Anschluss die Probe auf das Gel aufgetragen. Zudem wurde als Größenstandard ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt.

2.2.4.4. Blotting

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische wurden auf eine PVDF-Membran mittels diskontinuierlicher Semi-Dry Blotting Technik übertragen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (10 mA über Nacht bei 4 °C) vertikal zur Laufrichtung des Gels kam es zur Übertragung der Proteinbanden auf die Immun-Blot® PVDF-Membran. Abbildung 12 kann den Aufbau des Blots entnommen werden:

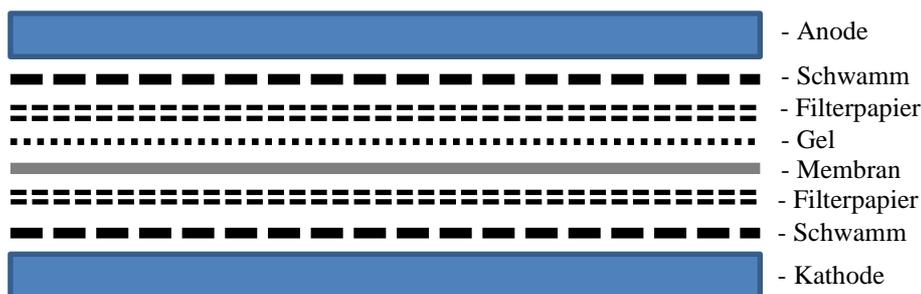


Abbildung 12: Aufbau der Western Blot Apparatur: Zwei Lagen in Blotting Puffer getränkte Filterpapiere wurden auf die Anode gelegt. Auf die mit Methanol und Blotting Puffer äquilibrierte Immun-Blot® PVDF-Membran wurde das Polyacrylamidgel gelegt. Vor die Kathode wurden zwei Filterpapiere, die in Blotting Puffer getränkt wurden, gelegt.

2.2.4.5. Western Blot

Mit entsprechenden spezifischen primären Antikörpern wurden die geblotteten Proteine auf der Immun-Blot® PVDF-Membran identifiziert. Dafür wurde die Membran mit TBS-T kurz

gewaschen und im Anschluss für 1 h auf dem Schüttler mit Blocking Puffer (TBS-T mit 5 % Milchpulver) zur Blockade unspezifischer freier Proteinbindungsstellen inkubiert. Über Nacht erfolgte bei 4 °C die Inkubation des primären Antikörpers. Am Folgetag wurde die Immun-Blot® PVDF-Membran drei Mal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation bei RT der Immun-Blot® PVDF-Membran mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Immun-Blot® PVDF-Membran mit TBS-T und Auftragen von ECL Reagenz erfolgte die Detektion mittels ChemiDoc™ MP-Systems.

2.2.5. *Immunzytochemie*

Die Immunzytochemie dient der Sichtbarmachung und Lokalisation von Proteinen in Zellen. Sie beruht auf der direkten oder indirekten Methode, wobei der Protein-Nachweis durch affinitätsabhängige Antikörper-Epitop Komplexbildung erfolgt. Bei der direkten Methode erfolgt der Nachweis durch einen spezifischen Antikörper für das zu untersuchende Protein, an den ein Fluorochrom/Enzym gekoppelt ist. Bei der indirekten Methode dient ein primärer Antikörper zur Bindung an das Epitop. An dem sekundären Antikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, befindet sich das gekoppelte Fluorochrom/Enzym. Durch Lichtemission der an die Antikörper gekoppelten Fluorophore oder enzymatischer Farbreaktion werden die Proteine quantitativ sowie qualitativ detektiert (Abbildung 13).

Immunzytochemische Untersuchungen wurden mit Hilfe von Zytospins oder in Zellsuspensionen durchgeführt.

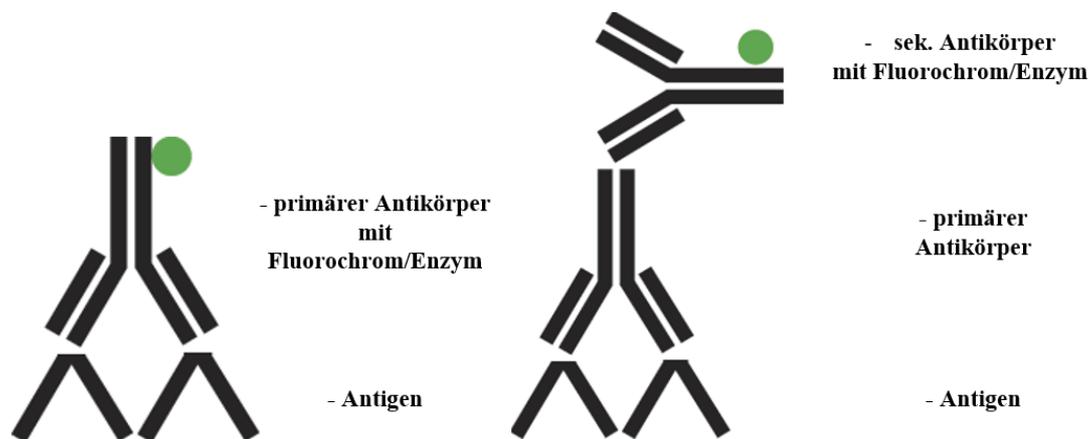


Abbildung 13: Direkte und indirekte Methode (modifiziert nach: <https://cmrf.research.uiowa.edu/immunochemistry>)

2.2.5.1. Anfertigung von Zytospins

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden von den zu analysierenden Zellen Zytospins hergestellt. Die Zellen wurden dazu mit Trypsin-EDTA trypsiniert und gewaschen. Nach Bestimmung der gewünschten Zellzahl wurde jeweils 300 µl Zell-Suspension in einen auf einem Objektträger befestigten Trichter gegeben. Mit Hilfe einer Zytospinzentrifuge wurden die Zellen für 8 min bei 200 x g zentrifugiert und dadurch auf den Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden bei RT über Nacht getrocknet und am Folgetag entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.5.2. Immunzytochemische Analysen auf Zytospins (EpCAM, VIM, ER, Zytokeratin)

Die Zytospin-Präparate wurden für 7 min in 4 % Formalin fixiert. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TBS-T. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch 7 min Behandlung mit 0,1 % Triton X-100/PBS Lösung permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Blockierung unspezifischer Protein-Bindungsstellen mittels DAKO Protein Blocking Solution. Die erste Inkubation mit einem spezifischen Antikörper, welcher in DAKO Antibody Diluent verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 8 °C. Am Folgetag wurden die ungebundenen Antikörper durch einen Waschschrift mit PBS entfernt. Anschließend wurde der artenspezifische Sekundärantikörper 1 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Eine Färbung des Nukleus erfolgte durch Anlagerung von DAPI an AT-reiche Regionen der DNA. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und Trocknung der Zytospin-Präparate bei RT wurden diese mit dem DAKO Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Die Detektion und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 und dem 20x bzw. 40x Zeiss Objektiv.

2.2.5.3. Immunzytochemische Analysen in Zellsuspension (EpCAM, CD45)

Für Einzelzellanalysen erfolgten immunzytochemische Analysen in Zellsuspension. Dafür wurde im ersten Schritt die Zellsuspension bei 800 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation mit spezifischen in DAKO Antibody Diluent verdünnten Primärantikörpern (Volumen 300 µl) bei RT. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Detektion und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 und dem 20x bzw. 40x Zeiss Objektiv. Eine Färbung des Zellkerns erfolgte durch Hinzugabe von NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (ca 1:25).

2.2.5.4. Proliferationstest (MTT Assay)

Der MTT Test ist ein quantitativ kolorimetrischer Test zur Messung der Proliferation lebender Zellen anhand ihrer mitochondrialen Stoffwechselaktivität. Der gelbe wasserlösliche Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird durch intrazelluläre Dehydrogenasen der Mitochondrien vitaler Zellen zu violetter wasserunlöslichen Formazan reduziert (Abbildung 14). Die Menge der entstandenen violetten Formazan-Kristalle kann nach Zugabe eines Lösungsmittels mit Hilfe eines Photometers quantitativ bestimmt werden. Die detektierte Farbveränderung verhält sich direkt proportional zur Zellzahl.

Die Durchführung des MTT Assays erfolgte in 96-well Platten. Hierfür wurden 5000 Zellen pro Well in 200 ul Kulturmedium +/- Tamoxifen ausgesät und für drei Tage im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 ul vorgewärmter MTT-Lösung (1:10 Verdünnung mit DMEM/F12 ohne Phenolrot) für 3 h im Brutschrank inkubiert. Die MTT-Lösung wurde sorgfältig entfernt und 100 ul DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugegeben. Nach 1 stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Messung der Extinktion mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesegerätes bei einer Wellenlänge von 540 nm.

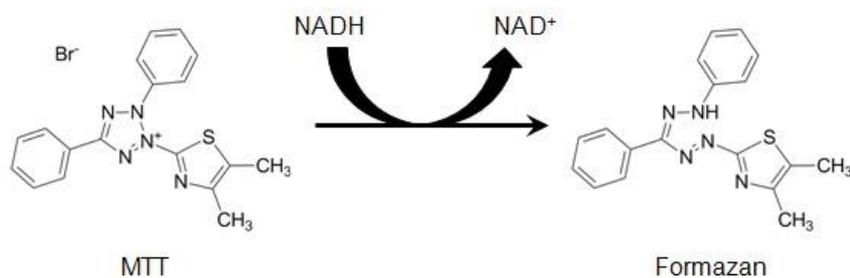


Abbildung 14: MTT Proliferationstest (Riss *et al.*, 2013 [192]): MTT wird mit Hilfe von NADH durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan reduziert.

2.2.6. Auswertung der Daten

Die Erfassung der Daten erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM; „standard error of the mean“). Dabei gibt n die Anzahl der unabhängigen Versuchswiederholungen und m die Anzahl der insgesamten Messwerte an. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % (p-Wert < 0,05) angesehen und in den Graphen mit einem (*) markiert. Ein Signifikanzniveau kleiner 0,01 wurde mit zwei Sternen (**) bzw. kleiner 0,001 mit drei Sternen (***) markiert. Mit dem Programm GraphPad

Prism erfolgten die statistischen Analysen der durchgeführten Versuche. Die Unterschiede zweier oder mehrerer verschiedener Merkmalsgruppen wurden mit dem Student's t-Test bzw. dem ANOVA-Bonferroni-Test analysiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Zellmorphologie verwendeter Zelllinien

In dieser Studie wurde das Genexpressionsprofil einzelner CTCs zur Untersuchung der intra-individuellen Heterogenität hinsichtlich relevanter endokriner therapeutischer Zielstrukturen sowie möglicher endokriner Resistenzmechanismen bei metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen mit Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien analysiert. Die Charakterisierung einzelner CTCs könnte wichtige Informationen hinsichtlich der interzellulären Heterogenität, therapeutischer Zielsequenzen sowie endokriner Resistenzmechanismen liefern. Der erste Fokus der Arbeit lag dabei auf der Etablierung einer Multi-Marker-Genexpressionsanalyse am Zelllinienmodell. Dafür wurde die MCF-7 Zelllinie als Modell eines Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms verwendet. Die Tamoxifen-resistente MCF-7/TAMR1 Zelllinie diente als Zellmodell eines Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms mit erworbener endokriner Resistenz. Die mesenchymale MDA-MB-231 Zelllinie wurde als Zellmodell für ein triple-negative Mammakarzinom verwendet.

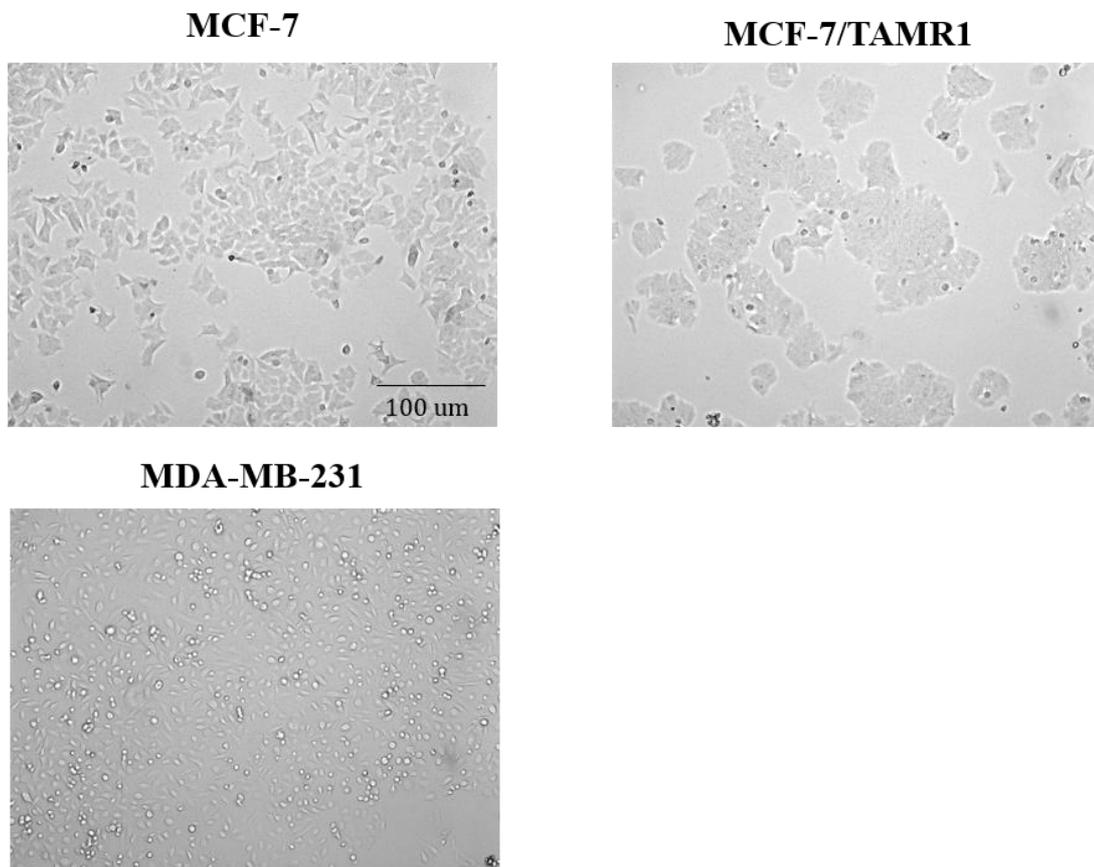


Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen von MCF-7 Zellen, MCF-7/TAMR1 Zellen und MDA-MB-231 Zellen (10x Durchlicht).

3.2. Immunzytochemische Analyse der EpCAM, Vimentin und ER α Expression in MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen

Die Proteinexpression von EpCAM, Vimentin und ER α wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht (Abbildung 16). Dabei zeigte sich eine hohe Expression von EpCAM in MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen im Vergleich zu MDA-MB-231 Zellen. Vimentin wurde in MDA-MB-231 Zellen höher exprimiert im Vergleich zu MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen. MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen zeigten eine insgesamt vergleichbare Expression von ER α bei einer deutlichen inter-zellulären Heterogenität auf. MDA-MB-231 Zellen waren ER α -negativ.

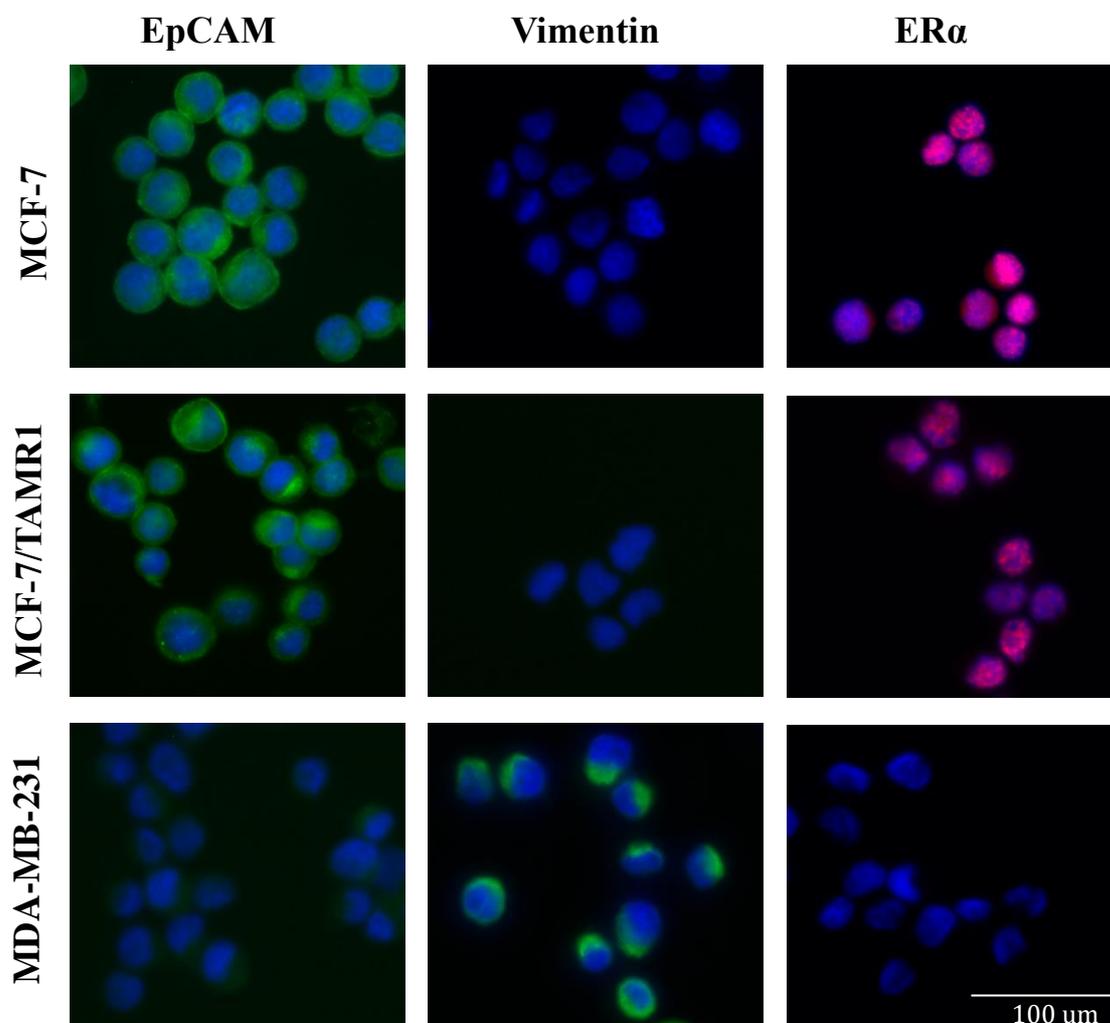


Abbildung 16: Immunzytochemische Darstellung der EpCAM, Vimentin und ER α Expression in MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen (Vergrößerung 20x). blau=DAPI Färbung, grün = EpCAM und Vimentin Färbung, rot = ER α Färbung

3.3. Proteinexpressionsanalyse von ER α in MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen

Die Proteinexpression von ER α wurde für die MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen mittels Western Blot analysiert. Die Signale für Aktin dienten zur Kontrolle gleicher Proteinladungsmengen und entsprechender Normalisierung.

Im Western Blot konnte eine vergleichbare Expression von ER α in MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen nachgewiesen werden. In MDA-MB-231 zeigte sich keine ER α Expression. In Abbildung 17 ist exemplarisch ein Western Blot von zwei unabhängigen Experimenten mit identischen Ergebnissen dargestellt.

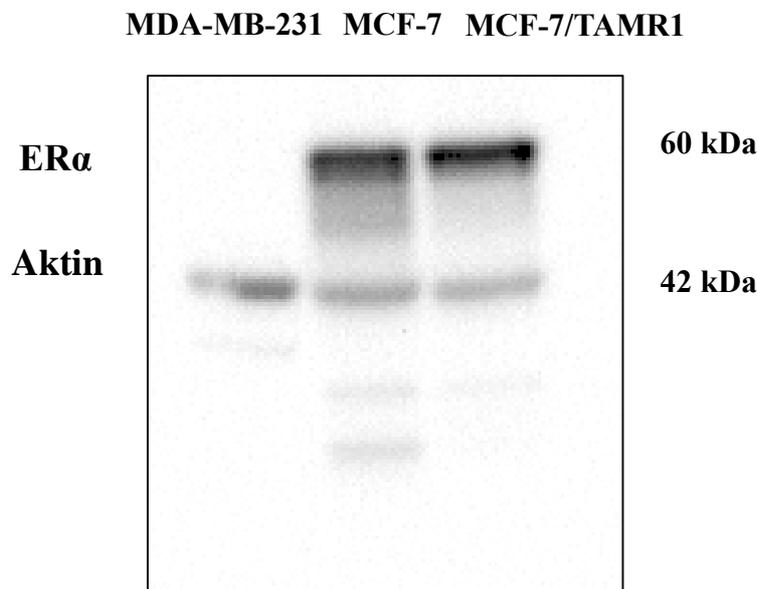


Abbildung 17: Proteinexpressionsanalyse von ER α in MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen: Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet. (*overlay*, n=2)

3.4. Zellproliferation von MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen unter Tamoxifen Behandlung

Zur Analyse der erworbenen Tamoxifen-Resistenz von MCF-7/TAMR1 Zellen wurde die Zellproliferation mittels MTT-Assay in MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen mit und ohne Behandlung mit Tamoxifen untersucht. Die quantitative Auswertung zeigte, dass MCF-7 Zellen unter Behandlung mit Tamoxifen im Vergleich zu MCF-7/TAMR1 Zellen signifikant niedriger proliferieren (Abbildung 18).

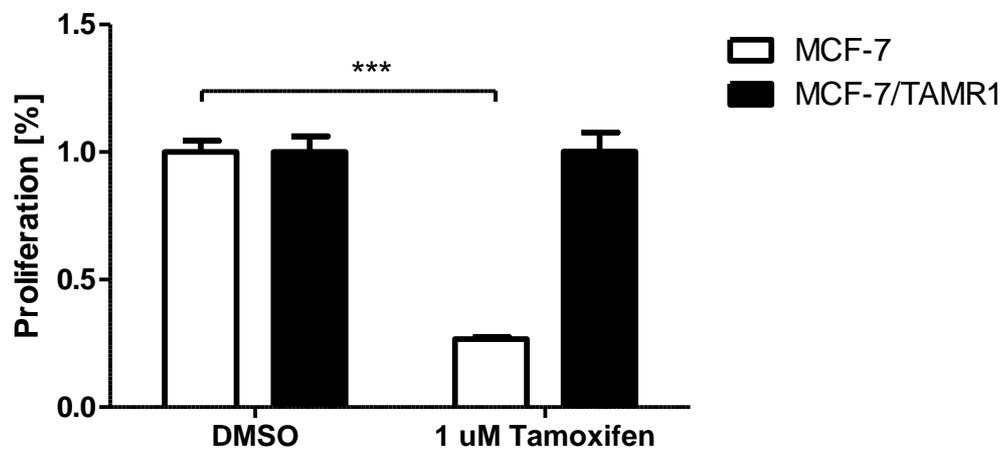


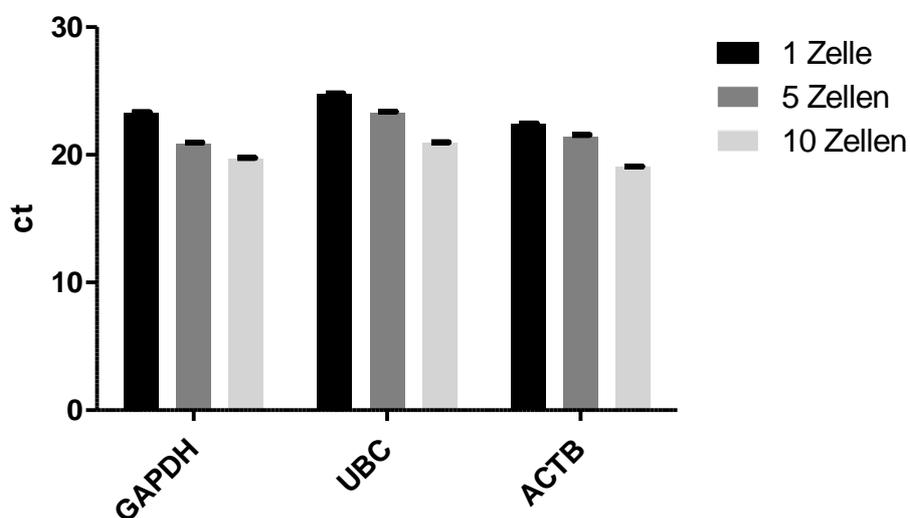
Abbildung 18: Zellproliferation in MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen nach Behandlung mit Tamoxifen. Die Zellen wurden in DMEM Medium ohne Phenolrot mit Tamoxifen (1 uM) oder DMSO (0,01 %) kultiviert. Die Proliferation wurde nach drei Tagen mittels MTT-Assay gemessen. Die detektierten Werte wurden zu DMSO behandelten Zellen normalisiert. ***, $P < 0,001$ (Student`s t-Test) (n=3)

3.5. Genexpressionsanalysen in einzelnen und gepoolten MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen

3.5.1. Genexpressionsanalyse der Referenzgene GAPDH, UBC und ACTB in einzelnen und gepoolten nativen MDA-MB-231 Zellen

Es konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die Referenzgene GAPDH, UBC und ACTB bis auf Einzelzellebene in nativen MDA-MB-231 Zellen detektiert werden können (Abbildung 19 A). Die durchgeführte Regressionsanalyse offenbarte einen nahezu linearen Zusammenhang aller Referenzgene hinsichtlich der verschiedenen Anzahl der verwendeten Zellen (Abbildung 19 B). Dabei zeigte sich ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,93 bei GAPDH, von 0,99 bei UBC und von 0,96 bei ACTB. Bei ACTB konnten im Vergleich zu UBC und GAPDH niedrigere Ct-Werte gemessen werden, sodass für weitere RNA-Qualitätsanalysen auf Einzelzellebene ACTB als Marker verwendet wurde.

A



B

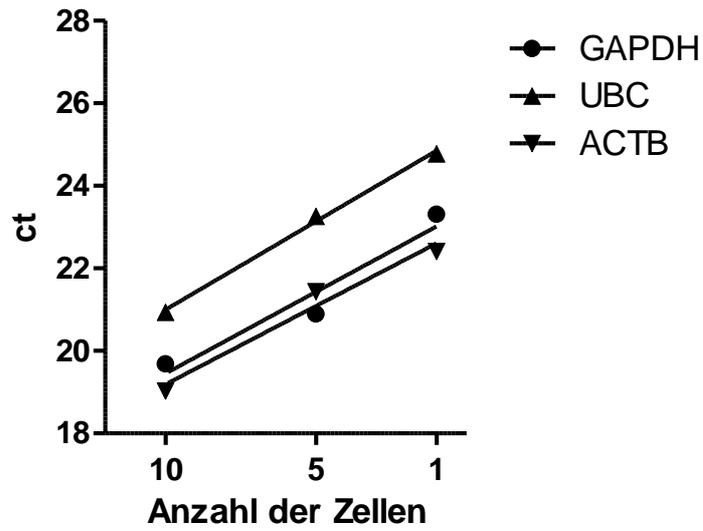


Abbildung 19: (A) Vergleich der detektierten Schwellenwerte (Ct) der Referenzgene GAPDH, UBC und ACTB von 1, 5 und 10 nativen MDA-MB-231 Zellen. (B) Lineare Regressionsanalyse der detektierten Schwellenwerte (Ct) der Referenzgene GAPDH, UBC und ACTB von 1, 5 und 10 nativen MDA-MB-231 Zellen. (m=3, n=1)

3.5.2. *KR19 und ACTB als Marker zur RNA-Qualitätskontrolle von einzelnen nativen MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen*

Um auf Einzelzellebene eine Multi-Marker-Genexpressionsanalyse durchzuführen zu können, wurde neben einer intakten Morphologie der Einzelzellen als weitere Kriterien hohe Transkriptionswerte von ACTB sowie des Zytokeratins 19 (KR19) verwendet. Als Schwellenwert für die Durchführbarkeit wurden dabei Ct-Werte von KR19 und ACTB unter 30 festgelegt. Einzelzellen mit nicht detektierbaren Ct-Werten bzw. Ct-Werte von ACTB und KR19 größer 30 wurden für weitere Multi-Marker-Genexpressionsanalysen ausgeschlossen. Es zeigte sich in 75 % der Einzelzellen ein Ct-Wert kleiner 30 für ACTB und KR19. In 25 % der Einzelzellen wurden nicht detektierbare Ct-Werte bzw. Ct-Werte größer 30 für ACTB und KR19 gemessen (Abbildung 20).

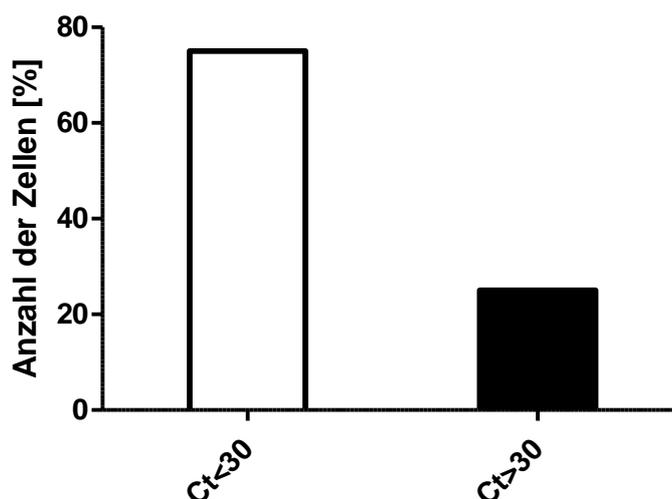


Abbildung 20: Vergleich der gemessenen Schwellenwerte (Ct < 30 vs. Ct > 30) für ACTB und KR19 einzelner nativer MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen. (n=8)

3.5.3. *Multi-Marker-Genexpressionsanalyse einzelner und gepoolter MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen*

Einzelne MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen, welche eine intakte Morphologie sowie eine gute RNA-Qualität in den Kontrolluntersuchungen aufzeigten, wurden in die Multi-Marker-Genexpressionsanalyse eingesetzt. Zudem wurden Multi-Marker-Genexpressionsanalysen von jeweils 5 gepoolten MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen durchgeführt. Die Genexpressionsprofile sind als Heatmap und Dendrogramm in Abbildung 21 dargestellt. In einzelnen Zellen sowie gepoolten Zellen aller drei Zelllinien konnten 13,3 % der analysierten Gene nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man die Genexpressionsprofile einzelner und gepoolter MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen, so zeigten die drei Zelllinien eine teils deutliche Abgrenzung zueinander. Die MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen zeigten eine gemeinsame Gruppenbildung und grenzten sich klar von den MDA-MB-231 Zellen ab. Die analysierten Einzelzellen der jeweiligen Zelllinie wiesen vorwiegend vergleichbare Genexpressionsprofile wie die entsprechenden 5 gepoolten Zellen auf. Im Vergleich zu MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen offenbarten MDA-MB-231 Zellen eine größere inter-zelluläre Heterogenität.

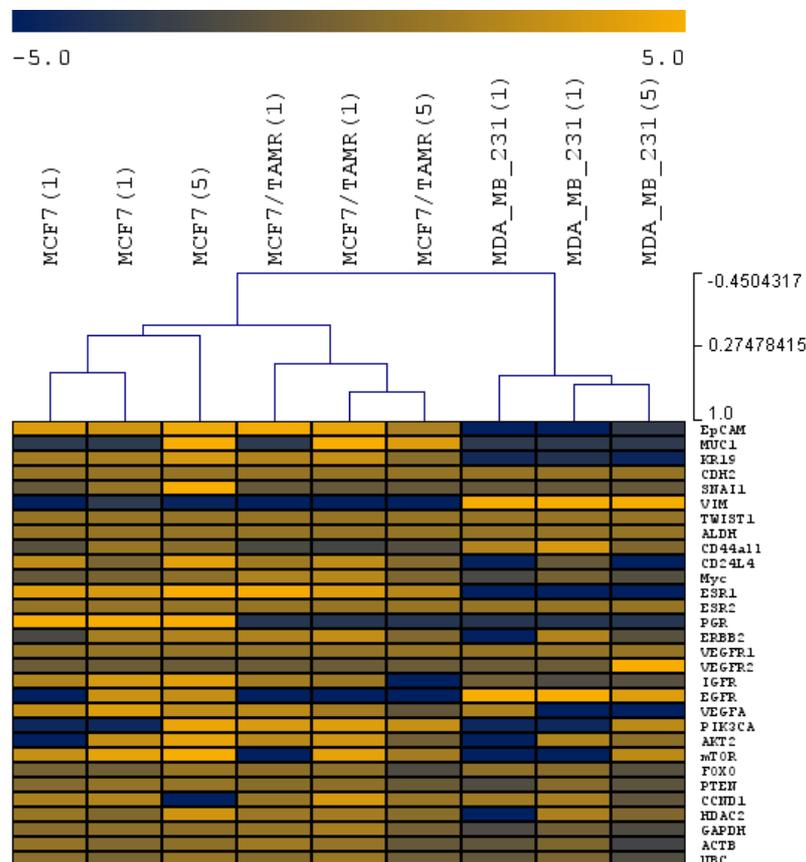


Abbildung 21: Vergleich der relativen Genexpression von Einzelzellen und 5 gepoolten Zellen der MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zelllinien mittels Heatmap und Dendrogram. Die abgebildeten Daten wurden auf den Mittelwert zentriert. Die durchschnittliche Expression eines Gens beträgt 0. Gelbe Felder entsprechen einer Hochregulation der Genexpression im Vergleich zum Mittelwert des Gen-Pools, wohingegen blaue Felder eine Herunterregulation aufzeigen (siehe Skala). (m=3, n=3 pro Zelllinie)

3.5.3.1. Signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen

Nach Gegenüberstellung einzelner und gepoolter MCF-7 Zellen mit MDA-MB-231 Zellen, konnten signifikante Genexpressionsunterschiede identifiziert werden. Die Auswertung phänotypischer und endokriner Marker bestätigte den epithelialen, endokrin-responsiven Phänotyp von MCF-7 Zellen im Vergleich zu dem mesenchymalen, nicht endokrin-responsiven Phänotyp der MDA-MB-231 Zelllinie (Abbildung 22).

Es zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von EpCAM und Keratin 19 in MCF-7 Zellen im Vergleich zu MDA-MB-231 Zellen. MDA-MB-231 Zellen offenbarten eine signifikant höhere Expression von Vimentin im Vergleich zu MCF-7 Zellen. Zudem zeigten MCF-7 Zellen eine signifikant höhere Genexpression von CD24 als MDA-MB-231 Zellen. Die Auswertung endokriner Marker belegte eine signifikant erhöhte Expression des Östrogenrezeptors, des Progesteronrezeptors sowie des IGFR (Insulin Growth Factor Rezeptors) in MCF-7 Zellen im Vergleich zu MDA-MB-231 Zellen.

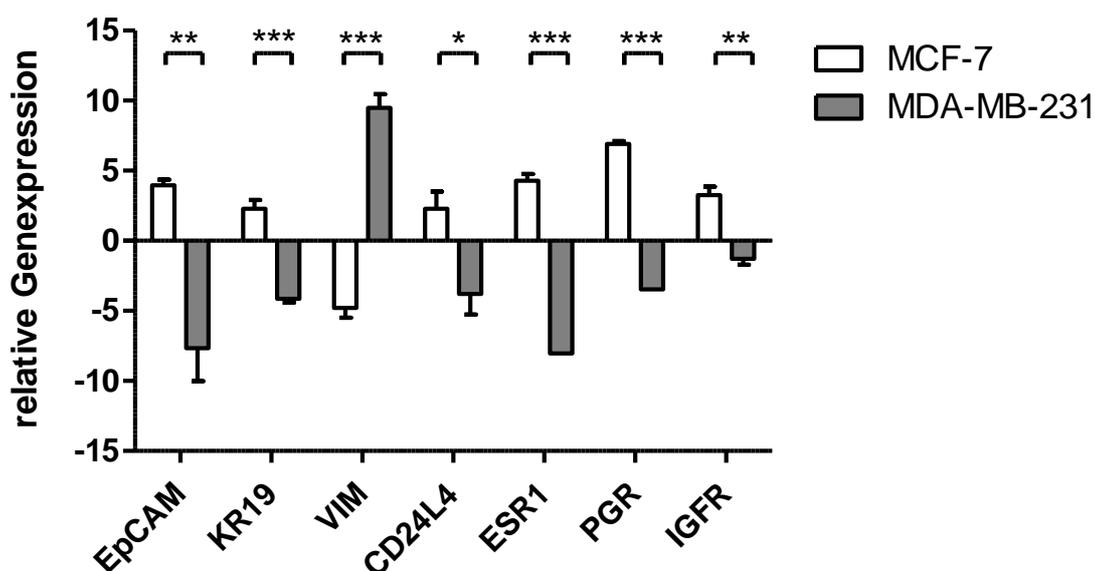


Abbildung 22: Vergleich statistisch signifikanter Genexpressionsunterschiede von Einzelzell Analysen und 5 gepoolten Zellen der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Student's t-Test) (m=3, n=3 pro Zelllinie)

3.5.3.2. Signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen

Die Gegenüberstellung einzelner und gepoolter MCF-7 Zellen zu MCF-7/TAMR1 Zellen offenbarte auf Transkriptionsebene eine signifikant geringere Genexpression des Progesteronrezeptors in MCF-7/TAMR1 Zellen im Vergleich zu MCF-7 Zellen (Abbildung 23).

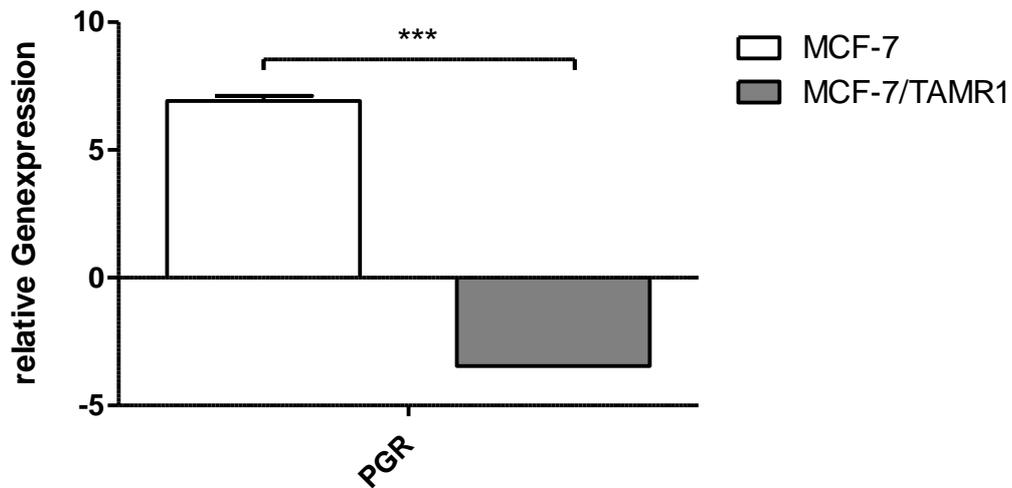


Abbildung 23: Vergleich statistisch signifikanter Genexpressionsunterschiede von Einzelzell Analysen und 5 gepoolten Zellen der MCF-7 und MCF-7/TAMR1 Zellen. *** P < 0,001 (Student's t-Test) (m=3, n=3 pro Zelllinie)

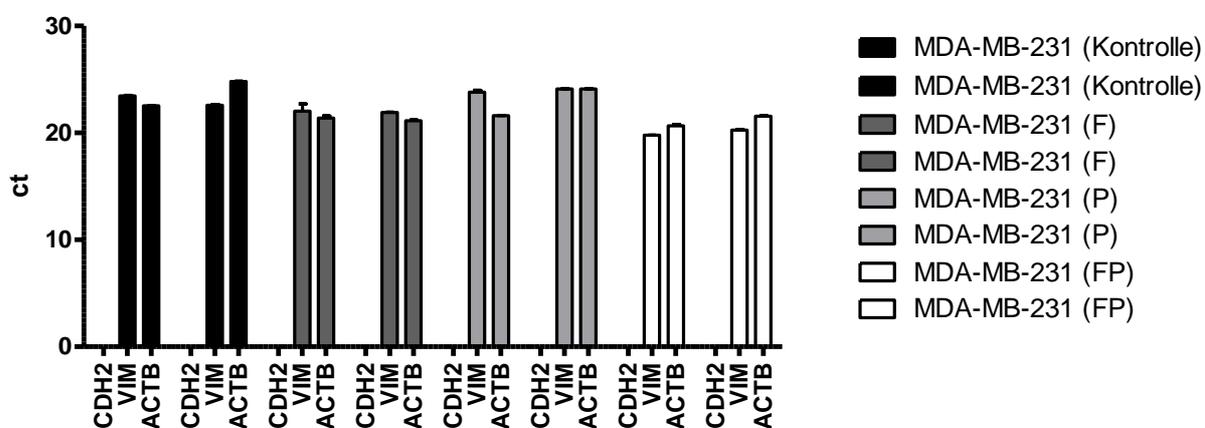
3.6. Einfluss von Fixierung und/oder Permeabilisierung auf die Einzelzell-Genexpressionsanalysen von MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden in CellSave® Preservation Tubes und/oder mit Triton X-100 permeabilisiert. Der Einfluss von Fixierung und/oder Permeabilisierung auf die Detektion Zelllinien-spezifischer Transkripte sowie eines Referenzgenes auf Einzelzellebene wurde im Anschluss anhand einer Genexpressionsanalyse einzelner MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen untersucht.

3.6.1. Genexpressionsanalyse von *CDH2*, *VIM* und *ACTB* nach Fixierung und/oder Permeabilisierung einzelner MDA-MB-231 Zellen

Nach Fixierung (F) oder Permeabilisierung (P) sowie der Kombination aus beidem (FP) konnten spezifische Transkripte in einzelnen MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden. Dabei diene Cadherin 2 (*CDH2*) als negative interne Kontrolle, Vimentin (*VIM*) als spezifische positive interne Kontrolle und *ACTB* als Referenzgen (Abbildung 24 A). Nach Quantifizierung der relativen mRNA-Expression zeigten sich nach Fixierung, Permeabilisierung sowie Fixierung/Permeabilisierung kein signifikanter Unterschied der *VIM* oder *ACTB* Expression im Vergleich zu einzelnen unbehandelten MDA-MB-231 Zellen (Kontrolle) (Abbildung 24 B).

A



B

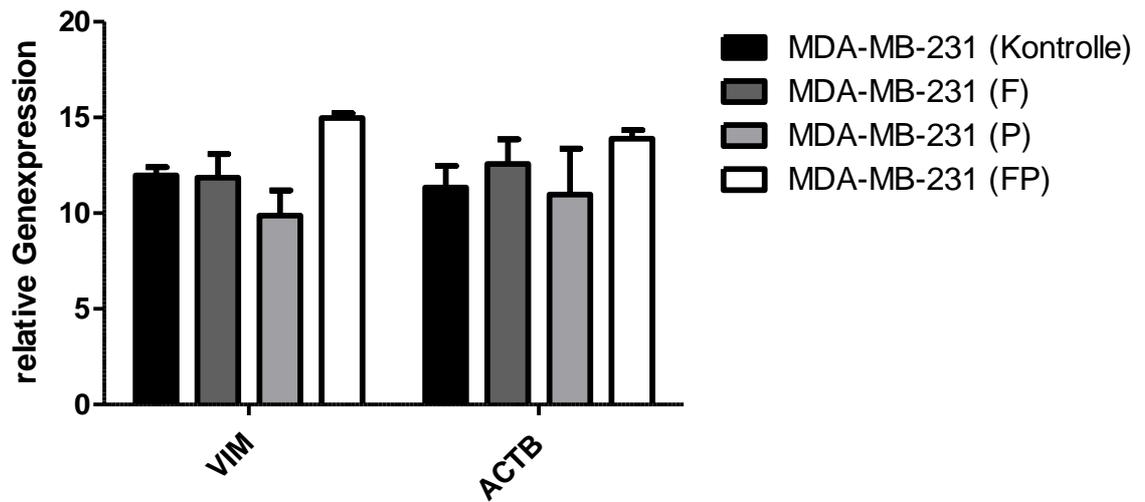
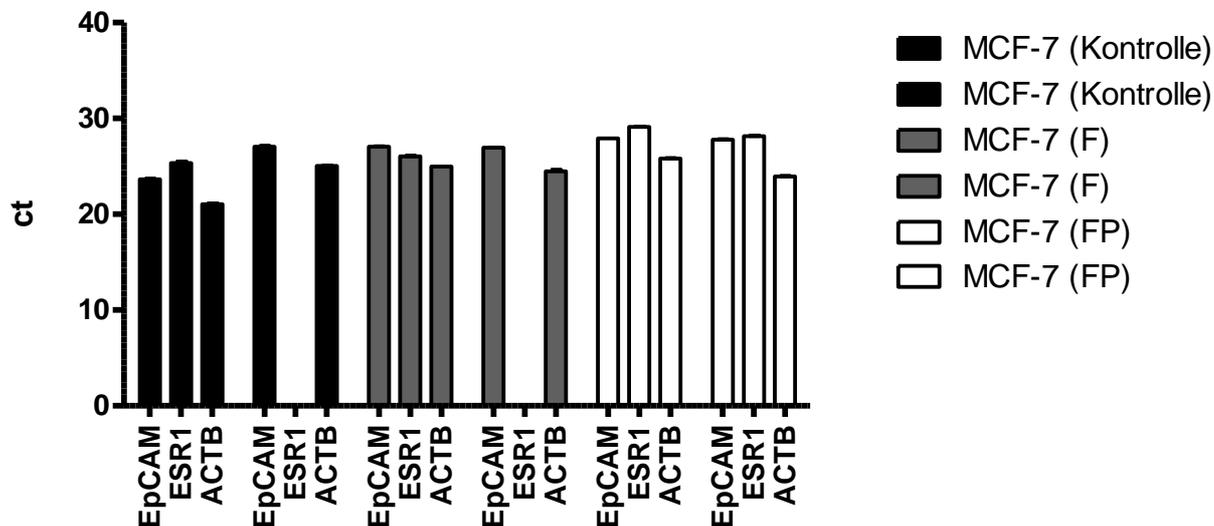


Abbildung 24: (A) Schwellenwerte der transkribierten Gene CDH2, VIM und ACTB in unbehandelten MDA-MB-231 Einzelzellen (Kontrolle), nach Fixierung (F), nach Permeabilisierung (P) und der Kombination aus beidem (FP). (B) Die relative Quantifizierung der VIM- und ACTB-Expression in MDA-MB-231 Einzelzellen nach Fixierung (F), Permeabilisierung (P) und der Kombination aus beidem (FP) zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. (ANOVA-Bonferroni). (m=3, n=2)

3.6.2. Genexpressionsanalyse von *EpCAM*, *ESR1* und *ACTB* nach Fixierung und/oder Permeabilisierung einzelner MCF-7 Zellen

Die Genexpressionsanalyse einzelner MCF-7 Zellen offenbarte nach Fixierung (F) oder der Kombination aus Fixierung und anschließender Permeabilisierung (FP) nachweisbare Transkripte von *EpCAM*, *ESR1* und *ACTB*. *EpCAM* diente dabei als positive interne Kontrolle, *ESR1* als heterogen exprimiertes, zellspezifisches Transkript sowie *ACTB* als Referenzgen. In zwei einzelnen MCF-7 Zellen konnte keine *ESR1* Genexpression nachgewiesen werden. Eine Isolation von Einzelzellen nach alleiniger Permeabilisierung war aus technischen Gründen (zu starke Zelladhärenz) nicht möglich (Abbildung 25 A). Es zeigte sich nach Bestimmung der relativen Genexpression kein signifikanter Unterschied in der *EpCAM* oder *ACTB* Expression hinsichtlich fixierter oder fixiert und permeabilisierter MCF-7 Einzelzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 25 B).

A



B

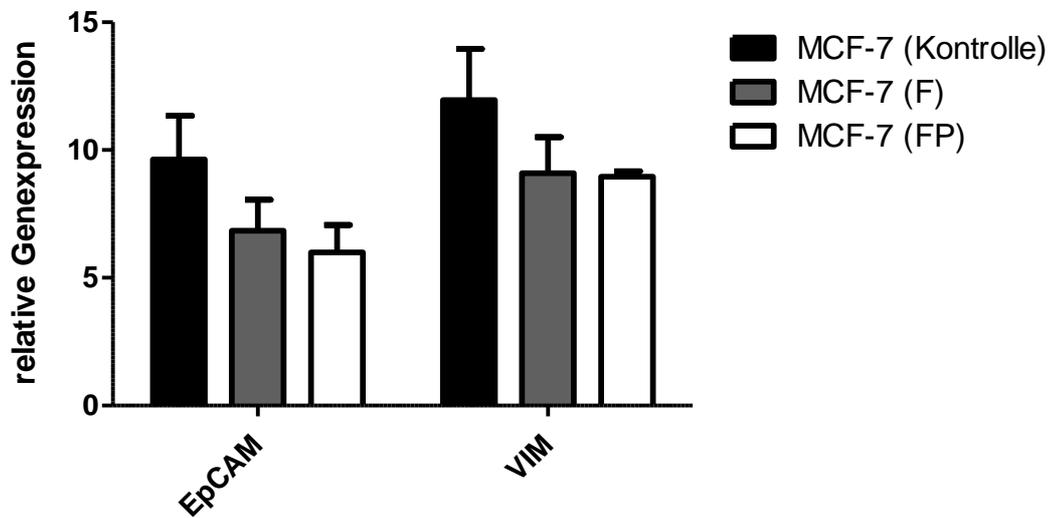


Abbildung 25: (A) Schwellenwerte der transkribierten Gene EpCAM, ESR1 und ACTB in unbehandelten MCF-7 Einzelzellen (Kontrolle), nach Fixierung (F) sowie Fixierung und Permeabilisierung (FP). (B) Die relative Quantifizierung der EpCAM- und ACTB-Expression in MCF-7 Einzelzellen nach Fixierung (F) sowie Fixierung und Permeabilisierung zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. (ANOVA-Bonferroni). (m=3, n=2)

3.7. Genexpressionsanalysen einzelner und gepoolter Zellen nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kits

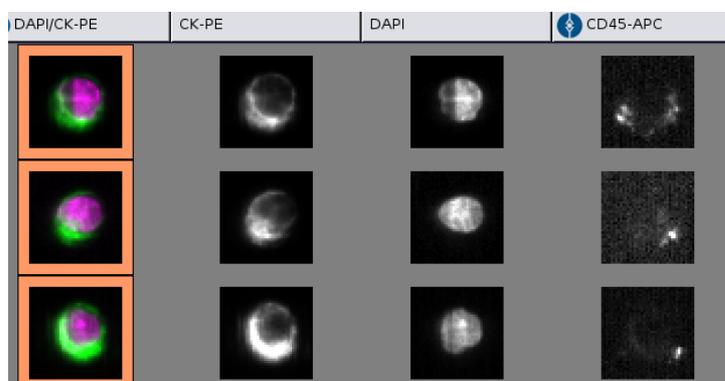
3.7.1. Genexpressionsanalyse einzelner und gepoolter MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kits

MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen wurden in 7,5 ml Blut eines gesunden Spenders gespikt und in CellSave® Preservation Tubes fixiert. Die Anreicherung und Detektion der MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen erfolgte mit Hilfe des CellSearch® Systems unter Verwendung des CellSearch® CTC Kits (Abbildung 26 A, C). Nach Mikromanipulation von Einzelzellen und Pools von 5 Zellen erfolgte die Genexpressionsanalyse.

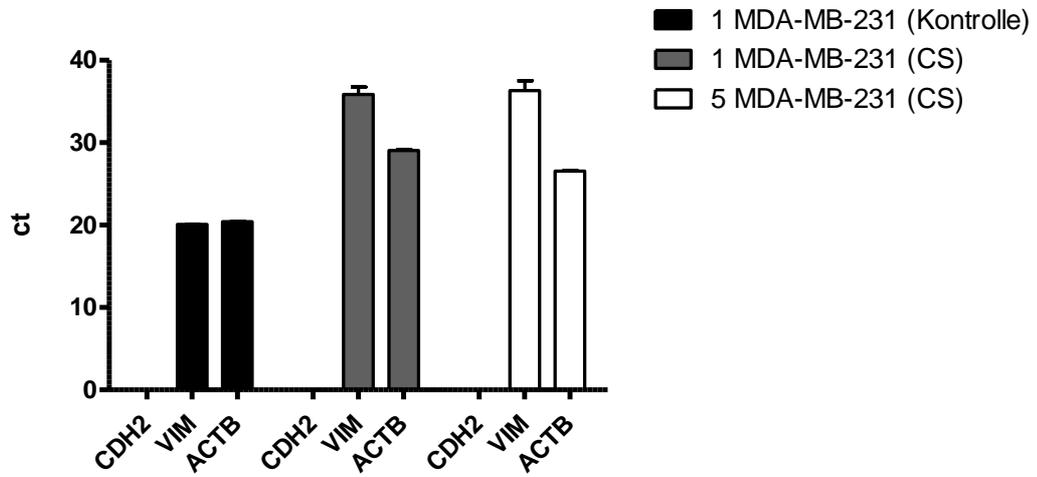
Im Vergleich zur Kontrolle offenbarte sich durch die hohen Ct-Werte eine stark verminderte Genexpression von Vimentin und auch des Referenzgens ACTB nach Anreicherung und Detektion mittels des CellSearch® CTC Kits einzelner sowie gepoolter MDA-MB-231 Zellen. Es zeigte sich, wie zu erwarten, bei den MDA-MB-231 Zellen kein Nachweis einer CDH2 Expression (interne negative Kontrolle) (Abbildung 26 B). Bei einzelnen sowie gepoolten MCF-7 Zellen konnte nach Prozessierung mittels CellSearch® CTC Kits keine EpCAM sowie keine ESR1 Expression im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Zudem zeigte sich nach Prozessierung mittels CellSearch® CTC Kits eine stark verminderte ACTB Expression, abgebildet durch die hohen Ct-Werte, von einzelnen sowie gepoolten MCF-7 Zellen (Abbildung 26 D).

A

MDA-MB-231 Zellen

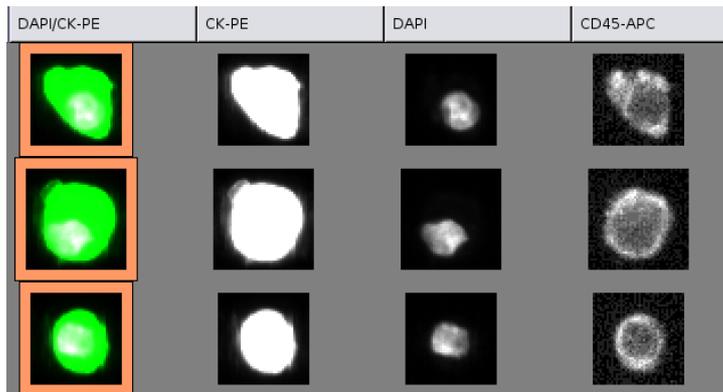


B



C

MCF-7 Zellen



D

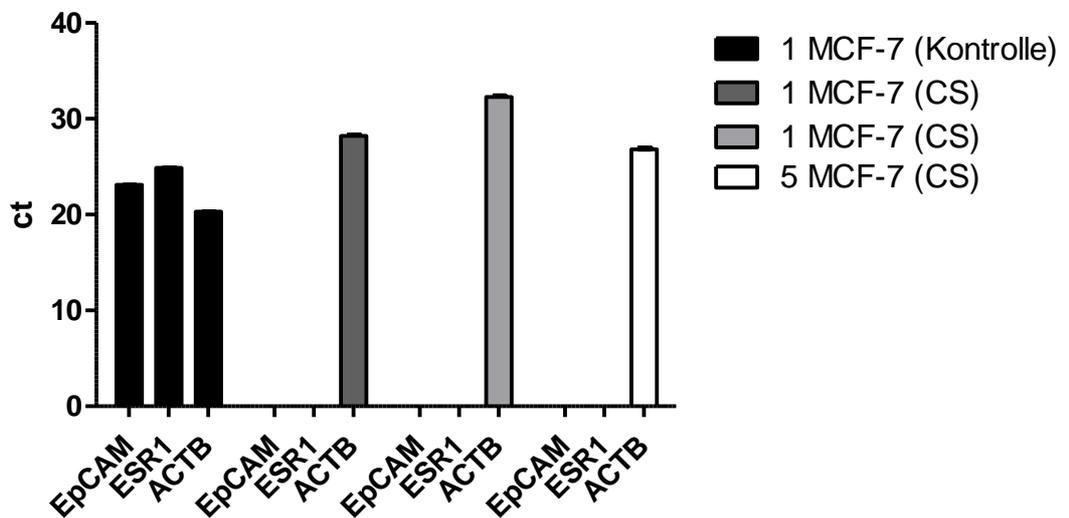
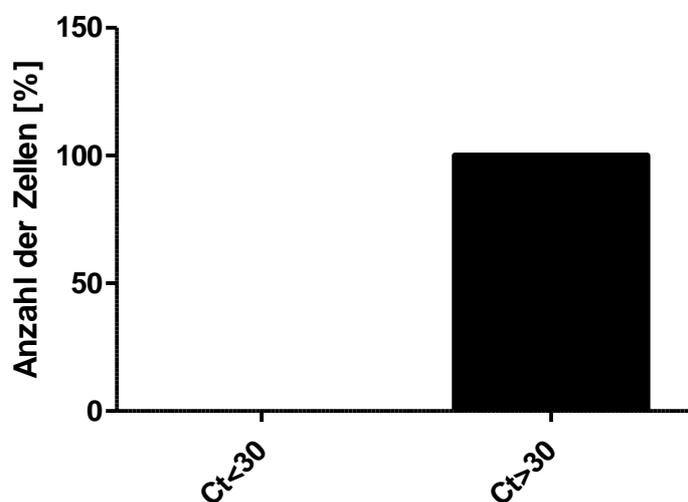


Abbildung 26: (A) Repräsentative Zytokeratin positive und CD45 negative MDA-MB-231 Zellen, die mittels CellSearch®-Systems aus dem Blut angereicht und detektiert wurden. (B) Detektierte Schwellenwerte von CDH2, VIM und ACTB von einer nativen MDA-MB-231 Kontroll-Zelle sowie einer einzelnen und 5 gepoolten MDA-MB-231 Zellen, die unter Verwendung des CellSearch® CTC Kits angereicht und detektiert wurden. (C) Repräsentative Zytokeratin positive und CD45 negative MCF-7 Zellen, die mittels CellSearch®-Systems aus dem Blut angereicht und detektiert wurden. Ein gesättigtes PE-Signal (Zytokeratin) bedingt das falsch-positive Signal im APC-Kanal (CD45) (technisches Artefakt). (D) Detektierte Schwellenwerte von EpCAM, ESR1 und ACTB einer nativen MCF-7 Kontroll-Zelle sowie einzelner und 5 gepoolter MCF-7 Zellen, die unter Verwendung des CellSearch® CTC Kits angereicht und detektiert wurden.

3.7.2. *RNA-Qualitätskontrolle einzelner und gepoolter CTCs nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kits*

Für Genexpressionsanalysen einzelner und gepoolter CTCs wurden nach Anreicherung und Detektion mittels CellSearch® CTC Kits und anschließender Mikromanipulation insgesamt 29 CTCs isoliert. Es offenbarte sich keine CTC mit einer ausreichenden RNA-Qualität (Ct-Wert von KR19 und ACTB < 30), sodass keine Multi-Marker-Genexpressionsanalysen durchgeführt werden konnten (Abbildung 27 A). Exemplarisch sind für 8 einzelne CTCs bzw. 5 gepoolte CTCs einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom die Ct-Werte abgebildet. Dabei konnte in einzelnen CTCs weder EpCAM noch KR19 Transkripte detektiert werden. Zudem zeigten sich relativ hohe Ct-Werte für das Referenzgen ACTB. In der Genexpressionsanalyse 5 gepoolter CTCs waren am Rande der möglichen Detektion hohe Ct-Werte von EpCAM und KR19 nachweisbar (Abbildung 27 B).

A



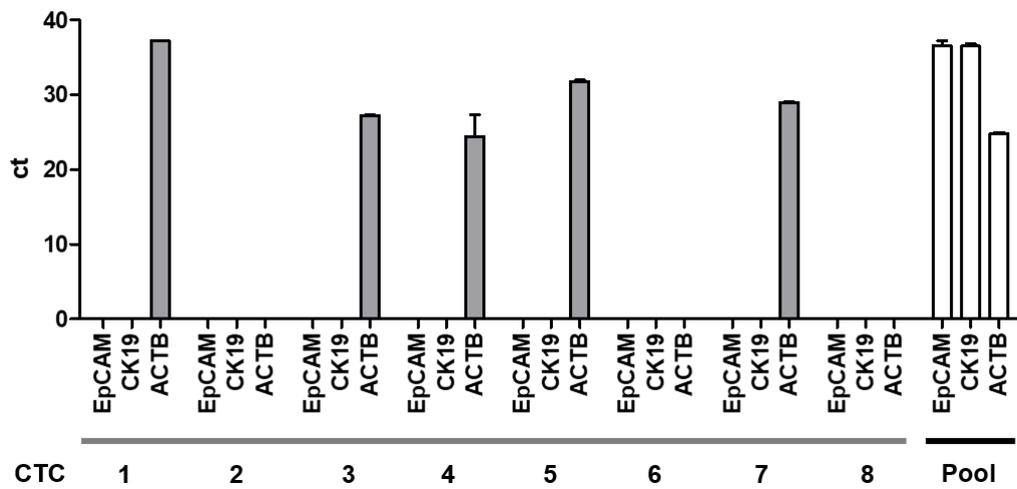


Abbildung 27: (A) Vergleich der gemessenen Schwellenwerte (Ct<30 vs. Ct>30) von ACTB und KR19 einzelner CTCs, die mittels CellSearch® CTC Kits und CellSearch®-Systems angereichert wurden. (n=29) (B) Exemplarische Darstellung der detektierten Ct-Werte von EpCAM, CK19 und ACTB von 8 einzelnen CTCs (grau) sowie 5 gepoolter CTCs (schwarz) einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom.

3.8. Genexpressionsanalysen einzelner CTCs sowie kultivierter CTCs nach Anreicherung mittels Diagnostischer Leukapherese (DLA) und Parsortix™-Systems

Die Isolierung und molekulare Charakterisierung von CTCs wird durch deren geringe Anzahl im Blut erschwert. Ein möglicher Lösungsansatz stellt die Nutzung der Diagnostischen Leukapherese dar, da die Analyse eines größeren Blutvolumens entscheidenden Einfluss auf die Anzahl und Detektionsraten von CTCs haben könnte. Die Isolation einzelner CTCs mittels Mikromanipulation aus einer kryokonservierten DLA-Probe erfolgte nach Anreicherung mittels Parsortix™-Systems und immunzytologischer Färbung. Zudem wurden einzelne kultivierte CTCs, die aus der gleichen kryokonservierten DLA-Probe nach Anreicherung mittels Parsortix™-Systems kultiviert wurden, isoliert. Nach Mikromanipulation einzelner unkultivierter sowie kultivierter CTCs wurden Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene durchgeführt.

3.8.1. *Klinisch-pathologische Charakteristika der Mammakarzinom-Patientin, aus deren Blut die DLA-Probe gewonnen wurde*

Die klinisch-pathologischen Charakteristika und die entsprechenden Therapien der Patientin, aus deren Blut die DLA-Probe gewonnen wurde, sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 sowie in Abbildung 28 zusammengestellt. Die Erstdiagnose eines primär lobulären multizentrischen Mammakarzinoms der rechten Brust wurde bei der Patientin im August 2007 im Alter von 65 Jahren gestellt. Der Hormonrezeptor-Status war für ER und PR positiv bei negativem HER2 Status. Im Jahre 2014 traten die ersten ossären Metastasen auf mit beginnender Knochenmarkskarzinose sowie im weiteren klinischen Verlauf die Metastasierung in Blase und Leber. Die DLA-Probe wurde bei der Patientin nach ossärem Progress sowie nach Diagnose einer neu aufgetretenen hepatischen Metastase gewonnen.

Tabelle 10: Diagnose und klinisch-pathologische Charakteristika des Primarius

Primarius: Erstdiagnose 08/2007	
Alter	65
Lokalisation	rechts
Subtyp	lobulär
TNM Stadium	pT2 (mult.) pN0 (sn0/2) G2 R0 L0 V0

Hormonrezeptorstatus:	
ER	positiv
PR	positiv
HER2	negativ

Tabelle 11: Diagnose und klinisch-pathologische Charakteristika der Metastasen

Metastasen - Erstdiagnosen
07/2014 ossäre Metastasen
02/2016 Blaseninfiltration: Biopsat ER-positiv, PR-negativ
08/2016 Knochenmarkskarzinose und Lebermetastasen

Der Therapieverlauf der Patientin ist im Folgenden abgebildet:

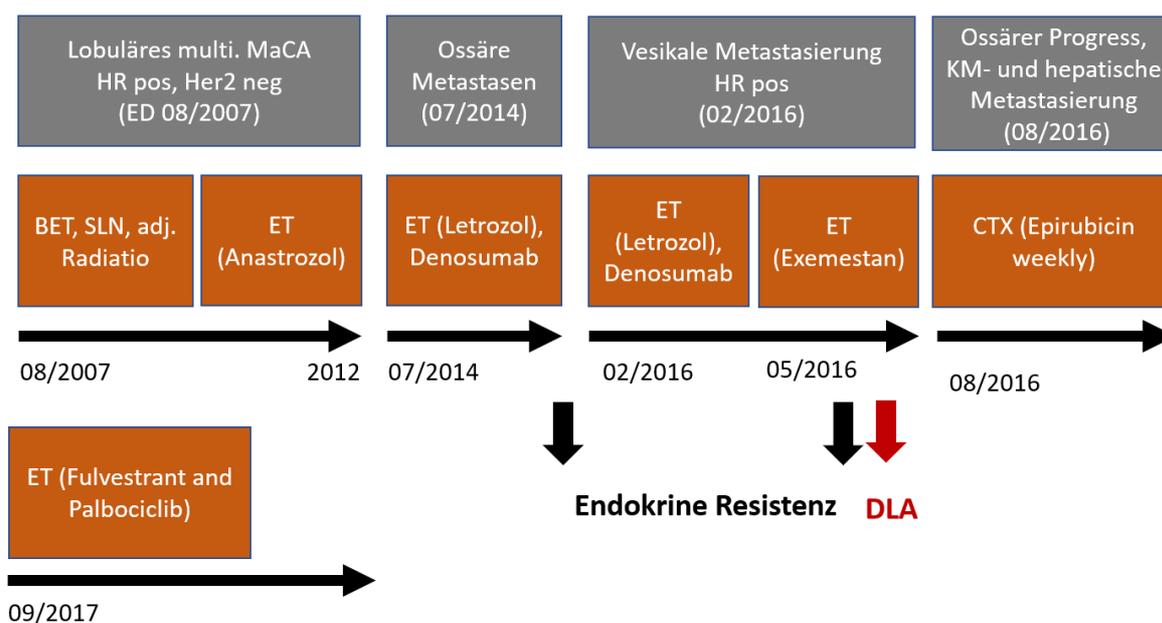


Abbildung 28: Diagnosen mit Therapieverlauf der Patientin. Der Zeitpunkt der DLA mit Probengewinnung ist durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Die schwarzen senkrechten Pfeile zeigen den Zeitpunkt einer endokrinen Resistenz.

3.8.2. Immunzytochemische Analyse der ER α Expression einzelner CTCs nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systems

Die Proteinexpression von ER α einzelner CTCs wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systems untersucht. Dabei zeigte sich eine intra-individuelle Heterogenität der ER α Expression. Neben ER-positiven CTCs konnten auch ER-negative CTCs detektiert werden (Abbildung 29).

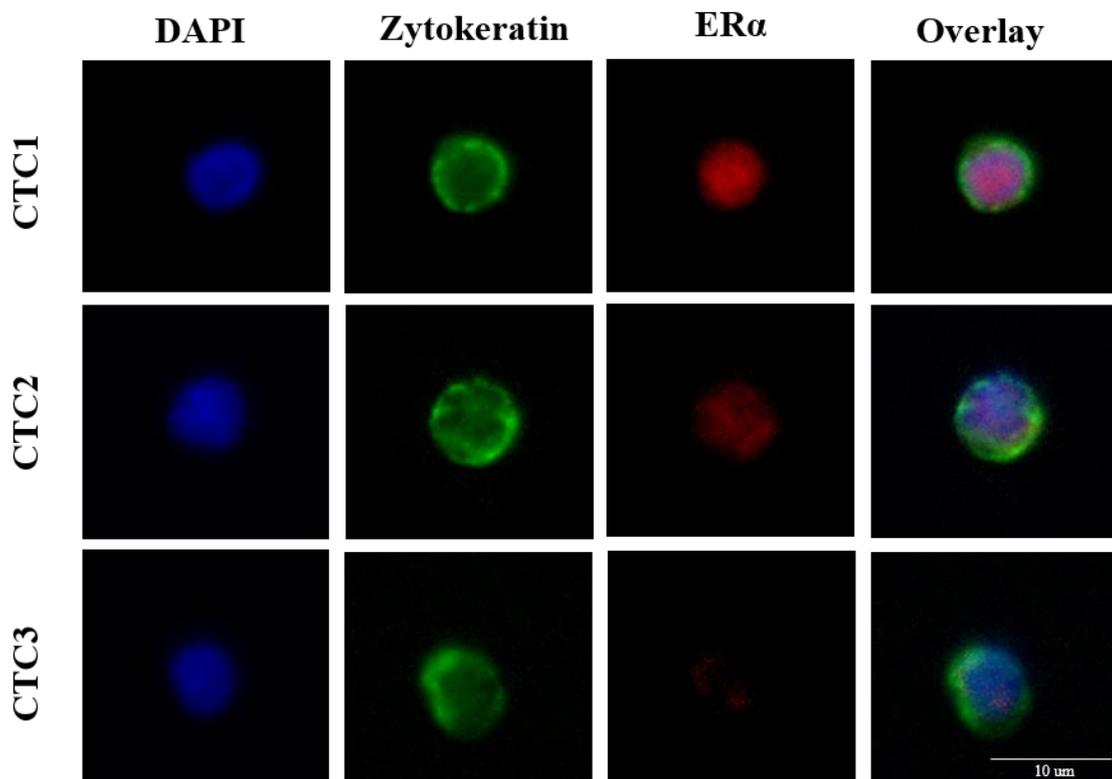


Abbildung 29: Immunzytochemische Darstellung der ER α -Expression in CTCs (Vergrößerung 40x). blau=DAPI Färbung, grün = Zytokeratin Färbung, rot = ER α Färbung

3.8.3. *RNA-Qualitätskontrolle einzelner CTCs nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systems*

Für die Genexpressionsanalysen einzelner CTCs wurden nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systems 23 morphologisch intakte CTCs mit Hilfe des Mikromanipulators isoliert. Es offenbarte sich in 30 % (n=7) der CTCs ein Ct-Wert kleiner 30 von ACTB und KR19. In 70 % (n=16) der CTCs wurden Ct-Werte größer 30 von ACTB und KR19 gemessen. Davon konnten in 8 % (n=2) der CTCs keine detektierbaren Transkripte von ACTB und KR19 nachgewiesen werden (Abbildung 30).

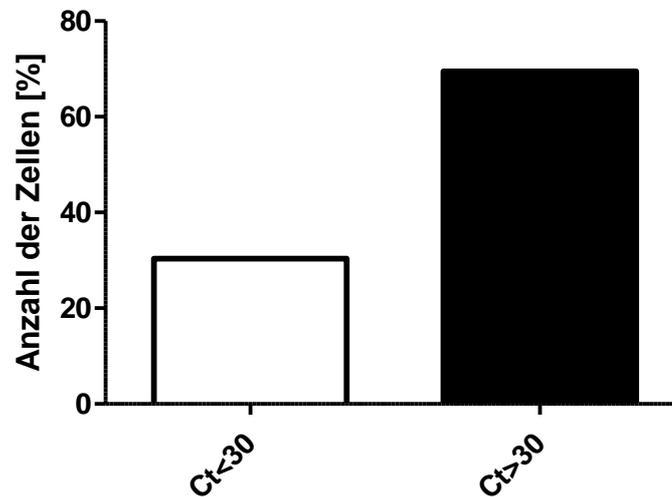


Abbildung 30: (A) Vergleich der gemessenen Schwellenwerte (Ct<30 vs. Ct>30) von ACTB und KR19 einzelner CTCs, die mittels DLA und ParsortixTM-Systems angereichert wurden. (n=23)

3.8.4. *Multi-Marker-Genexpressionsanalyse einzelner CTCs nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systemen*

Für die Multi-Marker-Genexpressionsanalyse wurden CTCs mit intakter Morphologie sowie einer guten RNA-Qualität in den Kontrolluntersuchungen verwendet. Die Analysen von 7 einzelnen CTCs sind als Heatmap und Dendrogramm in Abbildung 31 dargestellt. Betrachtet man die Genexpressionsprofile einzelner CTCs, so weisen diese eine intra-individuelle Heterogenität bzgl. der untersuchten Transkripte auf. In den 7 CTCs konnten 77 % der Marker detektiert werden. Das Dendrogramm offenbarte zwei Cluster, die auf unterschiedliche CTC-Subgruppen hindeuten. Da die Transkriptionsintensitäten für CTC7 im Gegensatz zu den anderen CTCs generell niedriger sind, wurde diese als eigene Subgruppe betrachtet.

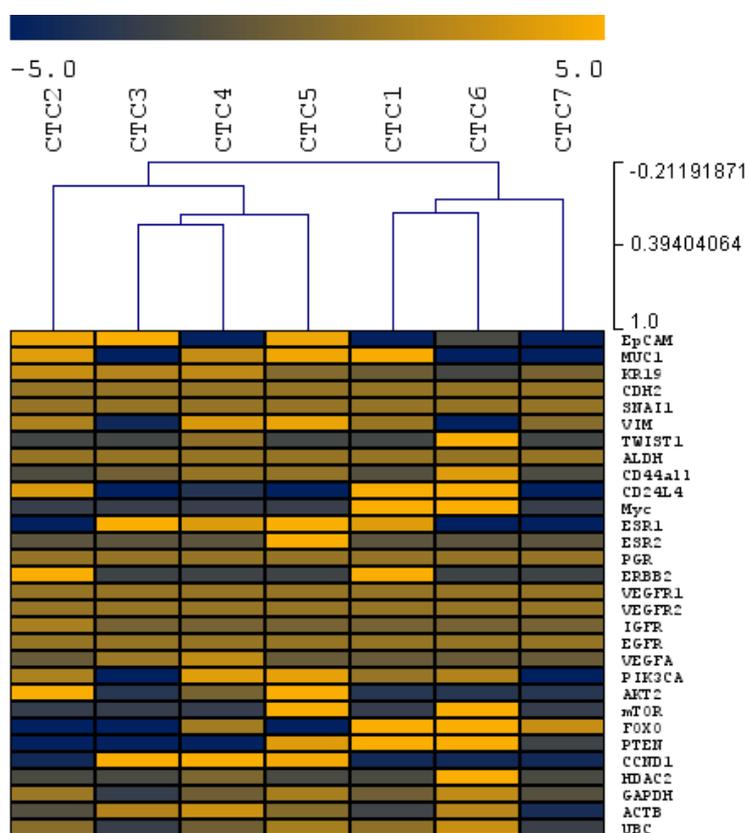


Abbildung 31: Vergleich der Genexpressionsprofile einzelner CTCs mittels Heatmap und Dendrogramm, die durch Nutzung der DLA und des ParsortixTM-Systems angereichert wurden. Die abgebildeten Daten wurden auf den Mittelwert zentriert. Die durchschnittliche Expression eines Gens beträgt 0. Gelbe Felder entsprechen einer Heraufregulation der Genexpression im Vergleich zum Mittelwert des Gen-Pools, wohingegen blaue Felder eine Herunterregulation aufzeigen (siehe Skala). (m=3, n=7)

3.8.4.1. Analysen zur intra-individuellen Heterogenität einzelner CTCs

Die Genexpressionsanalysen einzelner CTCs offenbarten eine hohe Plastizität sowie intra-individuelle Heterogenität hinsichtlich phänotypischer und endokriner Marker. 16 % der untersuchten Marker wurden in allen 7 CTCs exprimiert. Von 23 % der analysierten Marker konnten keine Transkripte detektiert werden. 61 % der Marker waren in den CTCs der Patientin heterogen exprimiert. Die Heterogenität der untersuchten phänotypischen und endokrinen Marker sowie der Referenzgene ist in Abbildung 32 dargestellt.

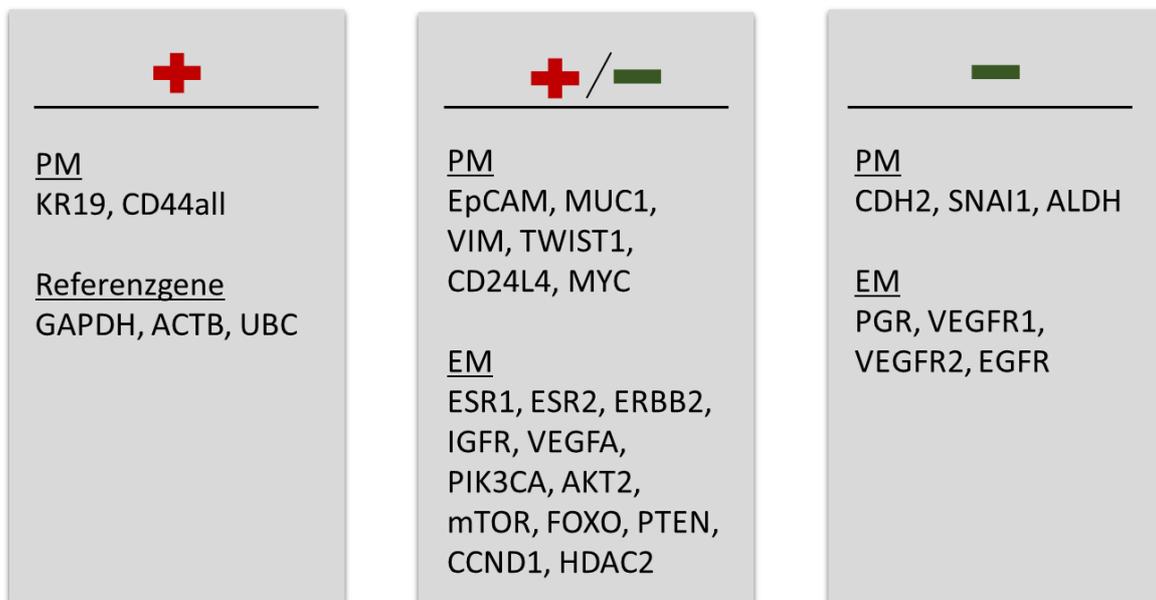


Abbildung 32: Intra-individuelle Heterogenität einzelner CTCs hinsichtlich phänotypischer (PM) und endokriner Marker (EM). 5 Gene waren ubiquitär exprimiert (+). 18 Gene zeigten eine intra-individuelle Heterogenität (+/-). 7 Marker konnten nicht detektiert werden (-).

3.8.4.2. Signifikante Genexpressionsunterschiede der CTC-Subpopulationen

Unter Verwendung der hierarchischen Clusteranalyse (vergl. Abbildung 31) etablierten sich 2 CTC-Subgruppen (CTC 2, 3, 4, 5 vs. CTC 1, 6). Die abgebildeten Transkriptionsprofile unterschieden sich signifikant zwischen den beiden CTC-Subgruppen. Im Vergleich zur Subgruppe II zeigten CTCs der Subgruppe I eine signifikant verminderte Expression des Stammzell-Markers CD24L4 und des Protoonkogens MYC. Zudem wies Subgruppe I eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors FOXO sowie des Tumorsuppressor-Gens PTEN auf (Abbildung 33).

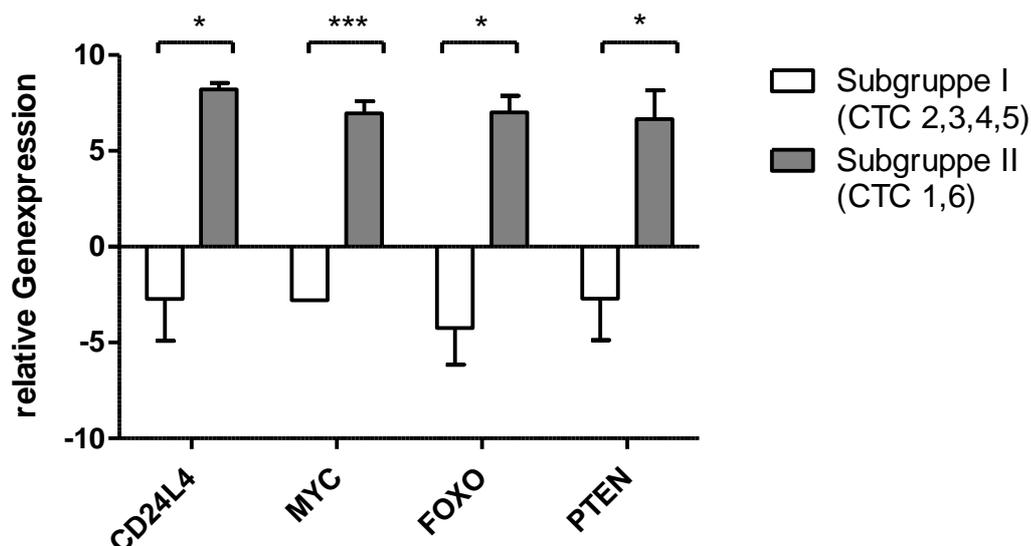


Abbildung 33: Vergleich statistisch signifikanter Genexpressionsunterschiede von CTC-Subgruppen. *, $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (Student's t-Test) ($m=3$, $n=6$)

3.8.4.3. Signifikante Genexpressionsunterschiede ER-positiver gegenüber ER-negativer CTC-Subpopulationen

Vor dem Hintergrund der erworbenen endokrinen Resistenz der untersuchten Patientin wurde eine Analyse hinsichtlich ER-positiver gegenüber ER-negativer CTC-Subgruppen durchgeführt. Dabei zeigte sich in der ER-positiven Subpopulation eine signifikant höhere Expression des CCND1 Gens, welches eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus spielt (Abbildung 34).

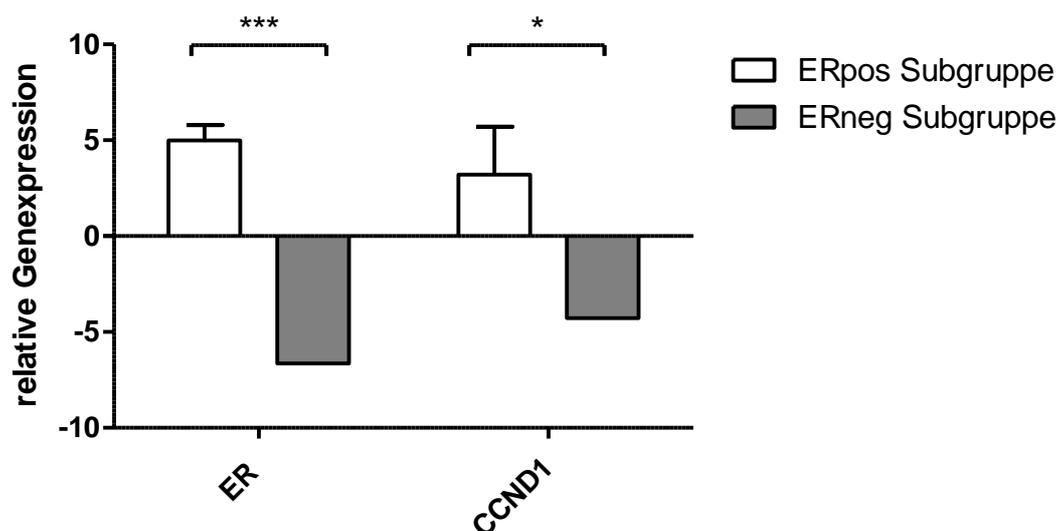


Abbildung 34: Vergleich statistisch signifikanter Genexpressionsunterschiede von der ER-positiven gegenüber der ER-negativen CTC-Subgruppe. *, $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (Student's t-Test) ($m=3$, $n=7$)

3.8.5. *RNA-Qualitätskontrolle einzelner kultivierter CTCs (cCTCs) nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM Systems*

Die Genexpressionsanalyse einzelner kultivierter CTCs (cCTCs) der Patientin erfolgte nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systems sowie anschließender Langzeitkultur. 15 cCTCs intakter Morphologie wurden mit Hilfe des Mikromanipulators isoliert. 50 % der cCTCs offenbarten einen Ct-Wert kleiner 30 von ACTB und KR19. In 50 % der cCTCs wurden Ct-Werte größer 30 von ACTB und KR19 gemessen. Dabei zeigten sich in 20 % der CTCs nicht detektierbare Ct-Werte von ACTB und KR19 (Abbildung 35).

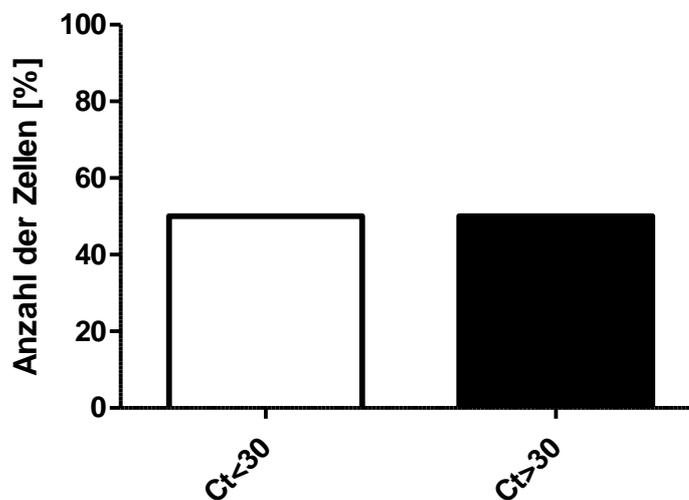


Abbildung 35: Vergleich der gemessenen Schwellenwerte (Ct < 30 vs. Ct > 30) von ACTB und KR19 einzelner cCTCs, die mittels DLA und ParsortixTM-Systems angereichert und anschließend kultiviert wurden. (n=10)

3.8.6. *Multi-Marker-Genexpressionsanalyse einzelner kultivierter CTCs nach Anreicherung mittels DLA und ParsortixTM-Systemen*

Multi-Marker-Genexpressionsanalysen wurden von einzelnen cCTCs durchgeführt, die eine intakte Morphologie sowie eine gute RNA-Qualität in den Kontrolluntersuchungen aufwiesen. Die Genexpressionsprofile von 5 einzelnen cCTCs sind als Heatmap und Dendrogramm abgebildet (Abbildung 36). In den 5 cCTCs konnten 56 % der Marker detektiert werden. Die Genexpressionsprofile einzelner cCTCs offenbarten eine intra-individuelle Heterogenität bzgl. phänotypischer und endokriner Marker. Nach hierarchischer Clusteranalyse bildeten sich zwei Cluster, die auf unterschiedliche CTC-Subpopulationen hinwiesen.

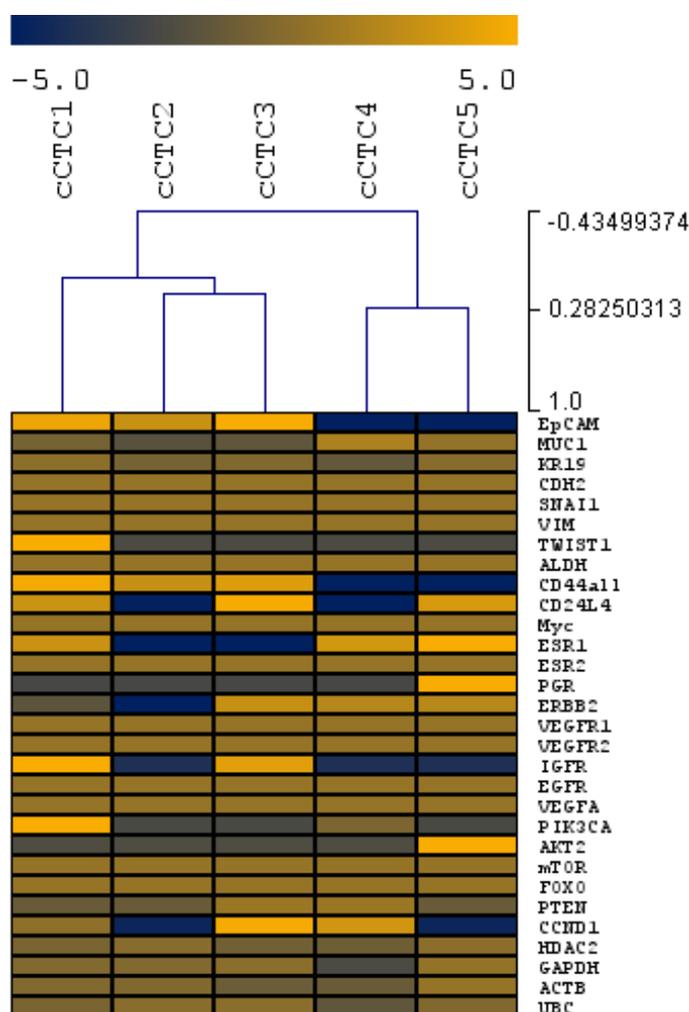


Abbildung 36: Vergleich der Genexpressionsprofile einzelner kultivierter CTCs (cCTCs) mittels Heatmap und Dendrogramm, die durch Nutzung der DLA und des ParsortixTM-Systems angereichert und anschließend kultiviert wurden. Die abgebildeten Daten wurden auf den Mittelwert zentriert. Die durchschnittliche Expression eines Gens beträgt 0. Gelbe Felder entsprechen einer Heraufregulation der

Genexpression im Vergleich zum Mittelwert des Gen-Pools, wohingegen blaue Felder eine Herunterregulation aufzeigen (siehe Skala). (m=3, n=5)

3.8.6.1. Analysen zur intra-individuellen Heterogenität einzelner kultivierter CTCs

Die Multi-Marker-Genexpressionsanalysen offenbarten eine hohe Plastizität sowie intra-individuelle Heterogenität einzelner cCTCs hinsichtlich phänotypischer und endokriner Marker. In allen 5 cCTCs wurden 20 % der untersuchten Gene exprimiert. 43 % der analysierten Marker konnten nicht detektiert werden. 37 % der Marker zeigten eine intra-individuelle Heterogenität der cCTCs. Die intra-individuelle Heterogenität der analysierten phänotypischen und endokrinen Marker sowie der Referenzgene ist in Abbildung 37 dargestellt.



Abbildung 37: Intra-individuelle Heterogenität einzelner kultivierter CTCs hinsichtlich phänotypischer (PM) und endokriner Marker (EM). 6 Gene zeigten eine ubiquitäre Expression (+). 11 Gene zeigte eine intra-individuelle Heterogenität (+/-). 13 Marker konnten nicht detektiert werden (-).

3.8.6.2. Signifikante Genexpressionsunterschiede kultivierter CTC-Subpopulationen

Unter Verwendung der hierarchischen Clusteranalyse (vergl. Abbildung 36) offenbarten sich zwei cCTC-Subgruppen (cCTC 1, 2, 3 vs. cCTC 4, 5). Die abgebildeten Transkriptionsprofile unterschieden sich signifikant zwischen den beiden cCTC-Subgruppen. cCTCs der Subgruppe I wiesen im Vergleich zur Subgruppe II eine signifikant höhere Expression des epithelialen Markers EpCAM sowie des Stammzell-Markers CD 44 auf. Zudem zeigte sich in Subgruppe I eine verminderte Expression des Onkogens MUC1 (Abbildung 38).

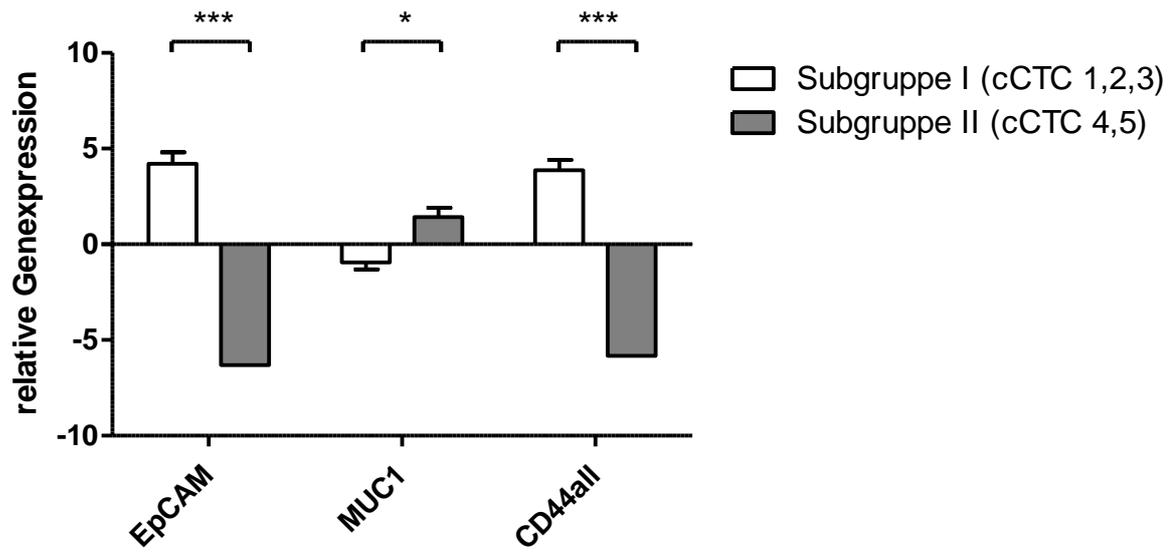


Abbildung 38: Vergleich statistisch signifikanter Genexpressionsunterschiede kultivierter CTC-Subgruppen. *, $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (Student's t-Test) ($m=3$, $n=5$)

3.9. Vergleich der Multi-Marker-Genexpressionsprofile einzelner nicht-kultivierter und kultivierter CTCs einer Patientin

Die Multi-Marker-Genexpressionsprofile einzelner unkultivierter CTCs (vergl. Abbildung 31) sowie kultivierter CTCs (vergl. Abbildung 36) wurden anhand der Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis (PCA)) verglichen. Dabei zeigte sich keine räumliche Abgrenzung nicht-kultivierter zu kultivierten CTCs, sondern eine teilweise gemeinsame Subgruppenbildung (Abbildung 39). Zudem offenbarte sich nach PCA eine größere intra-individuelle Heterogenität bei unkultivierten CTCs im Vergleich zu kultivierten CTCs.

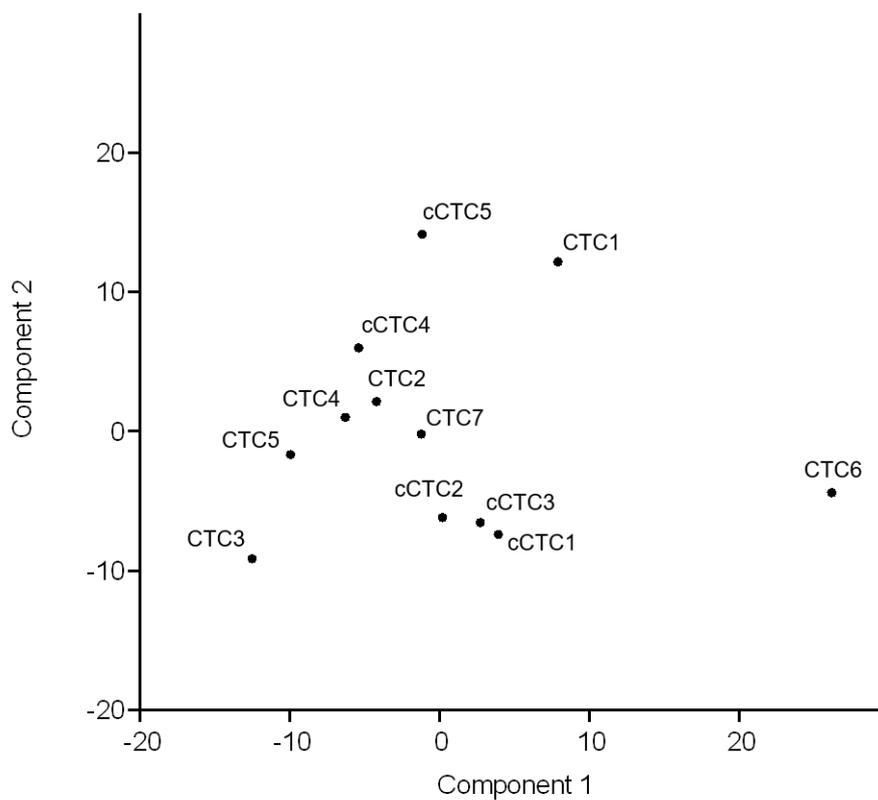


Abbildung 39: PCA einzelner nicht-kultivierter (n=7) und kultivierter CTCs (cCTCs) (n=5).

4. DISKUSSION

Das Mammakarzinom stellt eine heterogene Erkrankung dar, geprägt durch verschiedene histologische und molekulare Subtypen. Die Indikation und Auswahl einer Therapie basiert gegenwärtig auf den biologischen Eigenschaften des Primärtumors. Etwa 70 % aller Mammakarzinome exprimieren Hormonrezeptoren und gelten damit als endokrin sensitiv [33, 34]. Die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie ist jedoch durch primäre und sekundäre Resistenzen limitiert [41, 42]. Zahlreiche mögliche molekulare Resistenzmechanismen wurden beschrieben, wie Mutationen des ESR1 Gens, eine veränderte Expression von ER, veränderte Expressionen von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, eine veränderte Expression von Zellzyklusregulatoren, eine Dysregulation von ER Co-Aktivatoren, die Autophagie, die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) sowie eine verstärkte Tumorheterogenität [44, 45]. Der Primärtumor besteht oft aus verschiedenen Subklonen, die eine mögliche Ursache für eine Therapieresistenz darstellen sowie unterschiedliche Neigungen zur Bildung von Metastasen besitzen. Mammakarzinom-Patientinnen zeigen bereits früh im Krankheitsverlauf eine hämatogene Dissemination von Tumorzellen. Die im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) gelten als Vorläuferzellen von Metastasen. Im Vergleich zu Gewebebiopsien sind CTC-Analysen als „liquid biopsy“ vergleichsweise leicht zugänglich und nicht-invasiv. Zahlreiche klinischen Studien konnten die prognostische Relevanz von CTCs beim primären sowie metastasierten Mammakarzinom aufzeigen [147, 165, 166, 168-171]. Sequentielle CTC-Analysen könnten die Möglichkeit bieten, Therapien in Echtzeit zu monitoren sowie durch molekulare Charakterisierung zur Optimierung von Therapien beizutragen. CTCs stellen eine sehr heterogene Population dar, sodass die Charakterisierung einzelner CTCs wichtige Informationen hinsichtlich der Tumorheterogenität, der Expression therapeutischer Zielsequenzen sowie von Resistenzmechanismen liefern könnte. Aufgrund ihrer Seltenheit stellt die Detektion, Isolation und molekulare Charakterisierung einzelner CTCs jedoch eine große Herausforderung dar. Daher bestand das Ziel dieser Arbeit in der Erstellung von Multi-Marker-Genexpressionsprofilen einzelner CTCs zur Untersuchung der intra-individuellen Heterogenität hinsichtlich endokriner therapeutischer Zielstrukturen sowie möglicher endokriner Resistenzmechanismen bei metastasierten Mammakarzinom Patientinnen mit Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien.

4.1. Methoden zur Anreicherung, Detektion und Isolation von CTCs für Einzelzellanalysen

Viele Studien zu Untersuchungen von Mutationen in einzelnen fixierten CTCs sind nach Anreicherung mittels CellSearch®-Systems unter Verwendung von CellSave® Preservation Tubes sowie des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits beschrieben [45, 193, 194]. Im Gegensatz dazu gibt es gegenwärtig keine Publikation zu Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner fixierter CTCs nach Anreicherung mittels CellSearch®-Systems unter Verwendung von CellSave® Preservation Tubes sowie des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits (Pubmed, Medline Stand August 2018). Genexpressionsprofile nach Anreicherung mittels CellSearch®-Systems wurden nur von Gorges et al. an einzelnen lebenden CTCs unter Verwendung von EDTA-Röhrchen sowie des CellSearch® Profile Kits durchgeführt [159]. Weitere Methoden für Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner lebender CTCs stellen die Verwendung von EDTA-Röhrchen und Anreicherung mit Hilfe des CTC-iChips [150, 195, 196], des MagSweepers [197], des Parsortix™-Systems [159] oder des MINDEC Verfahrens [198] dar. In dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss einer Fixierung, wie z.B. durch Verwendung der CellSave® Preservation Tubes, sowie Permeabilisierung (Bestandteil des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits) auf Einzelzellebene untersucht. Nach Fixierung, Permeabilisierung sowie Fixierung/Permeabilisierung zeigte sich kein signifikanter Unterschied ausgewählter Transkripte einzelner MDA-MB-231 sowie MCF-7 Zellen im Vergleich zu unfixierten Kontrollzellen. Genexpressionsanalysen einzelner gespikter MDA-MB-231 sowie MCF-7 Zellen, welche mittels CellSearch®-Systems unter Verwendung von CellSave® Preservation Tubes sowie des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits angereichert wurden, wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen eine stark verminderte Genexpression ausgewählter Transkripte auf. Auch die Anreicherung und Detektion einzelner CTCs nach Verwendung von CellSave® Preservation Tubes sowie des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits offenbarte keine repräsentativen Genexpressionen. Mögliche Gründe könnten eine zweifache Fixierung während der Verarbeitung durch das CellSearch®-System sowie längere Inkubationszeiten mit Triton X-100 darstellen. Unter Verwendung des CellSearch® Profile Kits könnte zukünftig die zweifache Fixierung sowie die Permeabilisierung umgangen werden. Es könnten aus EDTA-Röhrchen, DLA Proben oder CellSave® Preservation Tubes mit Hilfe des CellSearch® Profile Kits CTCs angereichert und diese im Anschluss manuell mittels Immunhistochemie identifiziert werden.

Nachteile von CTC-Analysen mit Hilfe des CellSearch®-Systems beinhalten zudem die Analyse aus lediglich 7,5 ml Patientenblut sowie der auf EpCAM basierende CTC-Nachweis. Bislang ist kein spezifischer Marker bekannt, welcher alle CTCs einer Tumorentität charakterisiert, sodass bei Marker-abhängigen Verfahren eine Selektion von Subpopulationen erfolgt. Um die Heterogenität der CTCs sowie eine mögliche klinische Relevanz der untersuchten Charakteristika aufzeigen zu können, ist die Analyse möglichst aller CTCs als Einzelzellen notwendig. Die Diagnostische Leukapherese (DLA) stellt eine Methode zur Marker-unabhängigen Gewinnung von CTCs dar, die zudem eine Untersuchung eines größeren Blutvolumens auf CTCs ermöglicht [142]. Andree et al. konnten zeigen, dass mittels DLA sowie anschließender CTC-Analyse mit Hilfe des CellSearch®-Systems bis zu 32fach mehr CTCs in einem DLA-Aliquot gefunden werden können als in 7,5 ml peripheren Bluts derselben Patienten [143]. Deshalb wurde in dieser Studie auch eine primäre Anreicherung mittels DLA durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Marker-unabhängige, größenbasierte Anreicherung von CTCs mittels Parsortix™-Systems, die immunzytochemische Detektion und Mikromanipulation für Einzelzellanalysen.

Zudem wurden einzelne kultivierte CTCs isoliert, welche aus der gleichen kryokonservierten DLA-Probe nach Anreicherung mittels Parsortix™-Systems kultiviert wurden. Bei Mammakarzinom-Patientinnen konnten Langzeitkultivierungen von CTCs bisher nur nach Anreicherung mittels CTC-iChip [161] oder FACS etabliert werden [162].

4.2. Multi-Marker-Einzelzellanalysen

Die Indikation und Auswahl von Therapien bei Patientinnen mit Mammakarzinom basiert derzeit auf entsprechenden therapeutischen Zielstrukturen am Primärtumor. Etwa zwei Drittel aller Patientinnen erhalten bei einem HR-positiven Mammakarzinom eine zielgerichtete endokrine Therapie [33, 34], jedoch zeigen sich im Behandlungsverlauf in 20 - 25 % der Fälle endokrine Resistenzen bei klinischem Progress oder Auftreten von Metastasen [41, 42]. Dabei sollte die Re-Evaluation therapeutisch relevanter Zielstrukturen erfolgen. Jedoch steht in der metastasierten Situation häufig keine Gewebebiopsie zur Verfügung. In diesem Kontext könnten molekulare CTC Analysen auf Einzelzellebene wichtige Informationen zur Expression relevanter therapeutischer Zielmoleküle endokriner Therapien sowie zu möglichen endokrinen Resistenzmechanismen liefern.

Aufgrund der sehr geringen Menge an RNA (etwa 10 pg pro Zelle) und relativer RNA-Instabilität stellen molekulare Analysen auf Einzelzellebene eine große Herausforderung dar.

Angesichts dieser Einschränkungen gibt es eine Vielzahl von Studien, welche Transkriptionsanalysen von CTC-Zellgemischen durchführten [149, 153-155, 197]. Dabei lagen die CTCs in Zell-Pools vor, die mit Leukozyten und anderen Zellen des Blutes kontaminiert waren. Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner CTCs sind frei von Kontaminationen und könnten zusätzliche Informationen zur inter-zellulären Heterogenität von CTCs sowie von CTC-Subgruppen liefern. Aufgrund der relativ instabilen RNA konnten Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner CTCs bisher nur in einzelnen Studien durchgeführt werden [150, 159].

4.2.1. *Etablierung von Multi-Marker-Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene*

Die Etablierung einer Multi-Marker-Genexpressionsanalyse auf Einzelzellebene anhand von Zelllinien-Modellen stellt den ersten wichtigen Schritt dar. In der Studie von Steinert et al. wurden CTC-Genexpressionsprofile von Kolonkarzinom-Patienten untersucht [199]. Die Validierung erfolgte mittels der HAT-29 Kolonkarzinom-Zelllinie, wobei die Expression von EpCAM und ACTB in 1 sowie 5 und 10 gepoolten Zellen mittels qRT-PCR gemessen wurde [199]. Gorges et al. verwendeten MDA-MB-468 und SKBR3 Zellen (1, 5, 10 und 50 gepoolte Zellen). Dabei wurde die Expression von EpCAM, EGFR, HER2, KR19 und β -Aktin mittels Endpunkt-PCR bis auf Einzelzellebene gemessen [159]. In dieser Studie wurden 1 sowie 5 und 10 gepoolte MDA-MB-231 Zellen verwendet. Die Referenzgene GAPDH, UBC und ACTB konnten bis auf Einzelzellebene detektiert werden.

Die Klassifizierung einzelner Zellen mit guter RNA-Qualität stellt einen weiteren wichtigen Schritt für Multi-Marker-Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene dar. Kriterien beinhalten eine intakte Zellmorphologie sowie auch der Nachweis entsprechender „Qualitäts-Marker“ auf RNA Ebene. Interessanterweise besaßen bei Ting et al. 55 % der CTCs trotz einer intakten Morphologie eine niedrige RNA-Qualität [195]. Neben einer intakten Morphologie spielen demnach „Qualitäts-Marker“ auf RNA-Ebene eine wichtige Rolle [195]. In der Studie von Ting et al. wurde deshalb zusätzlich der Nachweis der Referenzgene GAPDH und ACTB als „Qualitäts-Marker“ verwendet. Unter Verwendung dieser Kriterien wiesen 45 % der einzelnen CTCs eine gute RNA-Qualität auf [195]. In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe zeigten 60 % der CTCs eine gute RNA-Qualität [196]. In der Arbeitsgruppe von Reijm et al. wurden nur CTC-Zellgemische von Mammakarzinom-Patientinnen nach Anreicherung mittels CellSearch® Profile Kits für Genexpressionsanalysen mit einem gemittelten Ct-Wert der Referenzgene HMBS, HPRT1 und GUSB unter 26 verwendet [200]. Unter Verwendung dieser

Kriterien konnten in 94 % der CTC-Zellgemische Transkriptionsprofile erstellt werden [200]. Lapin et al. definierten einzelne CTCs von niedriger RNA-Qualität mit fehlender Expression von Vimentin oder des pankreasspezifischen SPARC Proteins [198]. Bei 41 % der analysierten einzelnen CTCs war die RNA-Qualität niedrig, weshalb diese nicht für weitere Genexpressionsprofilanalysen verwendet wurden [198]. Powell et. al klassifizierten einzelne CTCs guter Qualität mit einem Ct-Wert des Referenzgens UBB unter 25. Zusätzlich mussten die Referenzgene ACTB und GAPDH sowie ein epithelialer Marker (KR7, KR8, KR18, und/oder KR19) nachweisbar sein [197]. 60 % einzelner CTCs lieferten dadurch eine gute RNA-Qualität [197]. Als Voraussetzung für die Durchführbarkeit der Genexpressionsanalysen einzelner CTCs mussten in der Studie von Gorges et al. neben morphologischen Kriterien ein ausreichend starkes Signal von KR19 nach Endpunkt-PCR gelelektrophoretisch nachweisbar sein [159]. KR19 wird in der Literatur standardmäßig als CTC-Marker beschrieben [201-203]. Von 55 einzelnen CTCs zeigten 39 CTCs ein starkes KR19 Signal und wurden für die Erstellung von Transkriptionsprofilen verwendet [159]. In dieser Arbeit waren die Ct-Werte bei ACTB im Vergleich zu UBC und GAPDH in Zelllinien-Zellen niedriger, sodass für weitere RNA-Qualitätsanalysen auf Einzelzellebene ACTB als Referenzgen verwendet wurde. Zusätzlich wurde der Nachweis von KR19 als weiteres Kriterium integriert. Es wurden nur Multi-Marker-Genexpressionsanalysen von Einzelzellen durchgeführt, die einen Ct-Wert von ACTB und KR19 unter 30 lieferten. Dieser Wert orientiert sich an den KR19 Ct-Werten einzelner Zelllinien-Zellen. Es zeigte sich in 75 % der Zelllinien-Einzelzellen ein Ct-Wert kleiner 30 von ACTB und KR19. 30 % der analysierten CTCs offenbarten einen Ct-Wert kleiner 30 von ACTB und KR19. Demgegenüber zeigten 50 % der kultivierten CTCs Ct-Werte kleiner 30. Dabei waren in 8 % der CTCs und in 20 % kultivierter CTCs keine Transkripte sowohl von ACTB und KR19 nachweisbar. Das Fehlen der Transkripte von ACTB und KR19 deutet darauf hin, dass entweder keine Zelle mikromanipuliert wurde oder dass Zelle oder RNA während der Prozessierung verloren gegangen sind. Möglicherweise wurde die Zellmembran der CTCs bei der Mikromanipulation beschädigt oder die einzelne CTC wurde nicht korrekt durch die Kapillare des Mikromanipulators in die Reaktionsgefäße abgelegt. Eine bisher fehlende Ablagekontrolle wird derzeit in den Arbeitsablauf etabliert.

Hinsichtlich der Auswertung detektierter Ct-Werte werden in der gegenwärtigen Literatur bei qRT-PCR Messungen auf Einzelzellebene gemessene Ct-Werte größer 35 als unspezifisch gewertet [159, 190, 197, 199]. In dieser Studie wurde deshalb analog ein Ct_{Cut-off} von 35 gewählt. Gorges et al. wählten einen Ct-Wert von 37 für nicht nachweisbare Transkripte [159]

nach den Vorgaben von Stahlberg et al. [190]. Auch in dieser Studie wurde fehlenden Transkripten ein Ct-Wert von 37 zugewiesen.

Gewöhnlich werden qRT-PCR Daten auf endogene Referenzgene wie z.B. ACTB oder GAPDH normalisiert, um Unterschiede in der RNA-Menge der analysierten Proben auszugleichen [204]. In zahlreichen Studien wurden deshalb auch Transkripte von Einzelzellen auf Referenzgene normalisiert [150, 197]. Die Transkription in Einzelzellen findet jedoch in sogenannten transkriptionellen Pulsen (*bursts*) statt, sodass unter normalen Bedingungen kein Gen eine konstante Transkriptions-Rate hat [159, 190]. Da transkriptionelle *bursts* von den meisten Genen unabhängig auftreten, wird gegenwärtig bei Einzelzellanalysen keine Normalisierung auf Referenzgene empfohlen [159, 190]. Auch in dieser Arbeit erfolgte deshalb keine Normalisierung der Ct-Werte auf Referenzgene. Bei gepoolten Zellen wurde die Anzahl der Transkripte durch die Anzahl der Zellen geteilt.

4.2.2. *Genexpressionsprofile einzelner Zelllinien-Zellen, CTCs und kultivierter CTCs*

Nach Literaturrecherche wurden neben 3 Referenzgenen 27 Gene ausgewählt, die eine klinische Relevanz als therapeutische Zielmoleküle und möglicher Resistenzmechanismen gegenüber endokrinen Therapien haben.

Powell et al. wählten 87 Krebs-assoziierte Gene sowie Referenzgene [197]. Nach Erstellung von Genexpressionsprofilen einzelner T47D, MCF-7, SKBR3 und MDA-MB-231 Zelllinien-Zellen gliederten sich 47 von 48 Zellen entsprechend ihrer Zelllinien-Entität. Zudem zeigten die Genexpressionsprofile einzelner Zelllinien-Zellen einer Entität die zu erwartenden spezifischen Charakteristika der Zelllinie auf. In der Arbeitsgruppe um Gorges et al. wurden 63 Krebs-assoziierte Gene sowie Referenzgene untersucht [159]. Dabei konnte neben den Unterschieden zwischen einzelner Zelllinien-Zellen (LNCaP, PC3, MDA-468 und SKBR3) und einzelner Leukozyten ebenfalls Zelllinien-spezifische Charakteristika auf Einzelzellebene abgebildet werden [159]. In dieser Arbeit zeigten die Genexpressionsprofile einzelner sowie gepoolter MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen eine teils deutliche Abgrenzung entsprechend ihrer Zelllinien-Entität auf. Die analysierten Einzelzellen der jeweiligen Zelllinie lieferten vergleichbare Genexpressionsprofile wie 5 gepoolte Zellen. Zudem wiesen einzelne MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen spezifische Zelllinien-Charakteristika auf. Dabei offenbarten MCF-7/TAMR1 Zellen im Vergleich zu MCF-7 Zellen eine signifikant niedrigere Expression des PR. Dies wurde bereits durch de Cremoux et al. beschrieben [205]. Studien beschrieben zudem eine Herunterregulation des ERs sowie eine teilweise

Hochregulation EMT-assoziiierter Transkripte in MCF-7/TAMR1 Zellen im Vergleich zu MCF-7 Zellen [98, 205, 206]. Dies konnte in unsere Arbeit auf Einzelzellebene nicht aufgezeigt werden. MCF-7 Zellen offenbarten im Vergleich zu MDA-MB-231 Zellen eine signifikant höhere Genexpression epithelialer Marker (EpCAM, KR19) sowie endokriner Marker (ER, PR, IGFR). Demgegenüber war in MDA-MB-231 Zellen der mesenchymale Marker Vimentin im Vergleich zu MCF-7 Zellen signifikant höher exprimiert. Dies bestätigte auf Einzelzellebene den epithelialen, endokrin-responsiven Phänotyp der MCF-7 Zelllinie sowie den mesenchymalen, nicht-endokrin responsiven Phänotyp der MDA-MB-231 Zelllinie [207]. Hinsichtlich der inter-zellulären Heterogenität einzelner Zelllinien-Zellen einer Entität sollten neben nativer Heterogenität der Zelllinien transkriptionelle *bursts* in Betrachtung gezogen werden. Diese können teilweise zu unterschiedlichen Expressionen einzelner Transkripte auf Einzelzellebene bei klonal identischen Zellen führen [208, 209].

Powell et al. konnten nur 31 der 87 analysierten Gene in 15 % der CTCs durchgehend detektieren [197]. In dieser Arbeit wurden 16 % der untersuchten Marker von allen CTCs exprimiert. Von 23 % der analysierten Marker konnten keine Transkripte detektiert werden. 61 % der Marker zeigten eine inter-zelluläre Heterogenität der CTCs. In cCTCs wurden 20 % der untersuchten Gene durchgehend exprimiert. 43 % der analysierten Marker konnten nicht detektiert werden. 37 % der Marker zeigten eine inter-zelluläre Heterogenität bei cCTCs.

Tumorheterogenität ist ein bedeutender Faktor für das Auftreten von Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien [45, 210]. Die Charakterisierung einzelner CTCs könnte zusätzliche Informationen in Echtzeit über die Tumorheterogenität liefern und so zu einer Optimierung endokriner Therapien beitragen. In klinischen Studien werden der Nachweis Therapie-relevanter Marker bei CTCs, wie z.B. des HER2 Status, für Therapieentscheidung bereits herangezogen [181]. Eine inter-zelluläre Heterogenität endokriner Therapie-relevanter Marker sowie Marker, die mit endokrinen Resistenzmechanismen assoziiert sind, konnte bei CTCs in einzelnen Studien gezeigt werden. Paoletti und Kollegen zeigten eine inter-zelluläre Heterogenität der ER Expression bei 790 CTCs einer Patientin [211]. Babayan et al. konnten in Patienten-Proben ausschließlich ERpos (5/16) oder ERneg (3/16) CTCs aber auch Proben mit einer inter-zellulären ER Heterogenität (8/16) von CTCs detektieren [212]. Eine inter-zelluläre Heterogenität der HER2 Expression bei CTCs fanden Riethdorf et al. [213] und Gasch et al. [194]. Khoe et al. zeigten eine inter-zelluläre Heterogenität der HER2 Gen-Amplifikation bei kultivierten CTCs in 8 von 10 Patienten auf [214]. Zudem offenbarte sich eine inter-zelluläre Heterogenität von Copy Number Variationen für FGFR1 und CCND1 in kultivierten CTCs [214]. Eine inter-zelluläre Heterogenität von PI3KCA Mutationen konnte in CTC

Studien von Polzer et al. [45], Shawn et al. [215], Neves et al. [216], Gasch et al. [194] und Pestrin et al. aufgezeigt werden [217].

In dieser Arbeit zeigte sich zum Zeitpunkt der CTC-Analysen ein Progress der Patientin unter endokriner Therapie mit einem AI. Die CTC-Analysen offenbarten eine intra-individuelle Heterogenität von ER α/β , HER2, IGFR, VEGFA, PIK3CA, AKT2, mTOR, FOXO, PTEN, CDK1 und HDAC2 bei CTCs. Interessanterweise besaßen einzelne CTCs eine hohe HER2 Expression bei HER2 negativem Primärtumor der Patientin. Unterschiede im HER2 Status zwischen Primärtumor und CTCs wurden bereits in zahlreichen Studien beschrieben [183, 213, 218].

In der hierarchischen Clusteranalyse kristallisierte sich eine CTC-Subgruppe mit niedriger Expression des Transkriptionsfaktors bzw. des Tumorsuppressorgens FOXO sowie des Tumorsuppressorgens PTEN heraus. FOXO bindet als Co-Faktor an den aktivierten ER und supprimiert Östrogen-responsive DNA Elemente [219]. Sisci et al. offenbarten an einem *in-vitro* Model, dass eine Überexpression von FOXO3A zu einer reduzierten Motilität und Invasivität bei ER-positiven Zelllinien-Zellen führt [220]. Die Arbeitsgruppe um Montenegro zeigte, dass Dysregulationen der Transkriptionsfaktoren von FOXO mit einer Tamoxifen-Resistenz assoziiert sind [85]. Auch ein Verlust der inhibitorischen Effekte von PTEN kann zu einer Resistenz gegenüber endokrinen Therapien führen [86].

In der Subgruppe der ER-positiven CTCs war Cyclin D1 im Vergleich zur ER-negativen Subgruppe verstärkt exprimiert. Der CyclinD1/CDK4/CDK6 Signalweg ist ein essentieller Regulator des Zellzyklus. Eine erhöhte Cyclin D1 Expression ist mit einer Proliferation sowie einer endokrinen Resistenz bei ER-positiven Mammakarzinomen assoziiert [88]. CDK 4/6-Inhibitoren werden bei Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom im metastasierten Stadium als neue Therapieoption eingesetzt. Die Kombination von CDK4/CDK6-Inhibitoren mit AIs oder SERDs/SERMs steigert das progressionsfreie Überleben bei Patientinnen mit metastasiertem Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom [221-223].

Kultivierte CTCs offenbarten eine intra-individuelle Heterogenität von ESR1, PGR, ERBB2, IGFR, PIK3CA, AKT2, PTEN und CCND1. Im Vergleich zu CTCs waren in cCTCs damit weniger Gene exprimiert, was darauf hindeutet, dass die Transkription der selektierten Gene reduziert wurde oder dass die zelluläre Heterogenität abnahm. Subgruppenanalysen von cCTCs offenbarten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich endokriner Marker, jedoch gegenüber phänotypischer (epithelial, EMT, mesenchymal) Marker.

Aktas et al. konnten zeigen, dass CTCs, welche EMT Marker exprimieren, ein Indikator für Therapie resistente Subpopulationen darstellen [224]. In zahlreichen Studien konnten CTCs mit exprimierten EMT-Markern bei Mammakarzinom-Patientinnen detektiert werden [225]. Hinsichtlich phänotypischer (epithelial, EMT, mesenchymal) Marker konnte bei CTCs eine inter-zelluläre Heterogenität der Vimentin Expression [226, 227], der TWIST1 Expression [228], der CDH2 Expression, der CD44/CD24 Expression [229] sowie der EpCAM Expression [230] gezeigt werden. In dieser Arbeit offenbarten die CTC-Analysen eine intra-individuelle Heterogenität von EpCAM, MUC1, VIM, TWIST1, CD24 und MYC. CTCs der Subgruppe II zeigten eine signifikant höhere Expression von CD24 und des Protoonkogens c-MYC. Die CD24 Expression ist ein Regulator der EMT. Zudem ist eine Überexpression von CD24 mit Tumorprogress und Metastasierung assoziiert [231, 232]. Auch eine Überexpression von c-MYC induziert die EMT [233]. Studien zeigten zudem, dass eine Überexpressionen von c-MYC zu endokrinen Resistenzen führen kann [234, 235].

Kultivierte CTCs offenbarten eine intra-individuelle Heterogenität von EpCAM, CD44 und CD24. Subgruppenanalysen zeigten eine cCTC-Subgruppe mit höherer Expression von EpCAM und CD44. Eine mögliche Erklärung ist die Kultivierung von cCTCs in Kulturmedium, welches hEGF und FGF2 beinhaltet und dadurch die Expression von CD44 induzieren könnte. Krebszellen, die durch eine Hochregulation von CD44 charakterisiert sind, werden auch als Tumor-Stammzellen bezeichnet und spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Tumorinduktion sowie Metastasierung [236]. In der Studie von Watanabe et al. war die Anzahl der EpCAM^{pos} CD44^{pos} CTCs im Gegensatz zu EpCAM^{pos} CD44^{neg} CTCs mit dem Tumorstadium sowie einer Gefäßinvasion bei Patienten mit Magenkarzinom korreliert [237].

Interessanterweise zeigte sich bei allen unkultivierten CTCs der Marker CD44 exprimiert, wohingegen alle cCTCs MUC1 exprimierten. MUC1 spielt eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Proliferation, Invasion, Apoptose, Metastasierung und Resistenzen gegenüber Therapien [238]. Auch eine CD44 Expression ist mit Proliferation, Metastasierung und Therapieresistenz assoziiert [239].

Bisher gibt es in der Literatur keine Studien, die CTCs und cCTCs einer Patientin auf Einzelzellebene vergleichen. Es konnte in dieser Arbeit durch PCA gezeigt werden, dass keine Abgrenzung zwischen CTCs und kultivierten CTCs besteht, sondern sich teilweise gemeinsame Subgruppen bildeten. Wie in CTCs zeigte sich auch bei cCTCs eine inter-zelluläre Heterogenität Therapie-relevanter Zielgene wie bspw. HER2 oder ER. Durch größere CTC-Analysen anhand kultivierter CTCs könnten demnach wichtige Informationen für das

Verständnis der Zellbiologie, der Tumorzelldissemination, der Resistenzbildung sowie der Identifikation neuer Zielmoleküle für personalisierte Therapien gewonnen werden.

4.3. Klinische Relevanz von CTC Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene zur Optimierung endokriner Therapien bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Die endokrine Therapie ist in der Behandlung des metastasierten endokrin sensitiven Mammakarzinoms die erste Wahl. Dabei richtet sich die Auswahl des Therapeutikums bzw. des Therapieschemas nach der entsprechenden Vortherapie, dem Allgemeinzustand der Patientin sowie nach den möglichen Nebenwirkungen [29, 38]. Neben den Behandlungserfolgen zielgerichteter endokriner Therapien stellen das Auftreten primärer sowie sekundärer endokriner Resistenzen eine große klinische Herausforderung dar. Der Goldstandard bei klinischem Progress sowie beim Auftreten neuer Metastasen sind gegenwärtig Gewebeproben, welche jedoch invasiv und nicht immer durchführbar sind. CTCs aus „*liquid biopsies*“ könnten vor diesem Hintergrund eine essentielle Rolle spielen. In den letzten Jahren wurde die klinische Relevanz von CTCs als Prognosefaktor eindeutig belegt und wird in den Leitlinien bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom empfohlen. Die klinische Relevanz molekularer CTC Analysen für Therapie-Entscheidungen ist derzeit unklar. Therapie-Entscheidungen basierend auf dem Phänotyp von CTCs werden deshalb in den Leitlinien nur im Rahmen translationaler Studien empfohlen. Es konnte jedoch in dieser Arbeit bei einer AI-resistenten metastasierten Mammakarzinom-Patientin gezeigt werden, dass Genexpressionsanalysen einzelner CTCs und cCTCs mögliche endokrine Resistenzmechanismen sowie relevante Zielstrukturen für endokrin basierte Therapien wie die CDK4/CDK6 Inhibitoren darlegen können.

Die analysierte Patientin zeigte zum Zeitpunkt der DLA eine endokrine Resistenz unter einer AI Zweitlinien-Therapie. Die molekularen Mechanismen, welche zu einer Resistenz gegenüber AIs führen, sind gegenwärtig nur teilweise identifiziert. Studien konnten bei AI-resistenten Karzinomen eine generell verstärkte Tumorerheterogenität, ESR1-Mutationen, den Verlust der ER Expression, die Hochregulation von Wachstumsfaktoren (HER2, FGFR, IGFR1, PIK3K, mTOR) mit entsprechenden Signalkaskaden sowie eine Dysregulation der Apoptose sowie des Zellzyklus detektieren [240, 241]. Diese möglichen endokrinen Resistenzmechanismen konnten teilweise durch Genexpressionsanalysen einzelner CTCs und cCTCs bei der Patientin bestätigt werden.

Analysen der ER Expression wiesen eine intra-individuelle Heterogenität der CTCs und cCTCs auf Transkriptom und Proteinebene auf. Es zeigten sich ER-positive sowie ER-negative CTCs und cCTCs bei ER-positivem Primarius sowie ER-positiver Blasenmetastase. Dies wird auch in einer Studie von Paoletti et al. bestätigt, in der CTCs von Patientinnen mit einem Progress unter einer AI-Therapie ER unterschiedlich stark exprimierten [242]. Zudem konnte bereits belegt werden, dass CTCs ER-positiver Mammakarzinome häufig keine ER Expression aufzeigen und dadurch möglicherweise endokrinen Therapien entkommen können [212].

Bei HER2-negativem Primarius offenbarten die Genexpressionsanalysen HER2 positive sowie HER2 negative CTCs. Eine intra-tumorale Heterogenität zwischen Primarius und CTCs hinsichtlich der HER2-Expression wurde bereits durch zahlreiche Studien beschrieben. Eine Hochregulation der HER2-Expression sowie der Wachstumsfaktor-Signalwege wurde bei einer AI-resistenten Zelllinie durch die Arbeitsgruppe von Sabnis et al. beschrieben [243]. Die Genexpressionsanalysen belegten die Expression von Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren wie bspw. IGFR1, EGFR und FGFR bei CTCs sowie cCTCs. EpCAM-Negativität, die Expression von EMT-Markern sowie ein mesenchymaler Phänotyp stellen möglicherweise CTCs mit einem größeren proliferativen und invasiven Potential dar [244]. Klinische Studien konnten ein vermindertes Ansprechen von Therapien beim Nachweis von CTCs mit EMT Markern oder CTCs mit einem mesenchymalen Phänotyp aufzeigen [245]. Es wurden mit Hilfe der Genexpressionsanalysen auch einzelne CTCs und cCTCs der Patientin mit EMT-Markern sowie der Expression mesenchymaler Marker detektiert, welche möglicherweise durch die AI-Therapie der Patientin nicht erfasst werden. Yu et al. offenbarten zudem, dass der EMT Status der CTCs sich abhängig von der Therapie der Patientin ändert [244]. In dem Zusammenhang wären CTC-Analysen unter der derzeitigen Fulvestrant und Palbociclib Therapie der Patientin interessant.

Eine endokrin basierte Therapie mit CDK4/CDK6 Inhibitoren kann eine Überwindung von AI Resistenzen bewirken. Gegenwärtig wird die Patientin mit Fulvestrant und Palbociclib behandelt und zeigt im Staging einen stabilen Befund. Subgruppenanalysen von ER-positiven gegenüber ER-negativen CTCs offenbarten eine verstärkte Expression von CCND1, welche eine Zielstruktur der CDK4/CDK6 Inhibitoren darstellt. Diese Beobachtung geht mit dem aktuellen klinischen Befund unter der Therapie mit Palbociclib einher. Weitere CTC Analysen unter der derzeit endokrin basierten Therapie könnten Einsicht hinsichtlich der ansprechenden Subpopulationen geben.

Zusammenfassend konnte die klinische Relevanz von CTCs als Prognosemarker bei Patientinnen mit Mammakarzinom eindeutig belegt werden. Die Überwachung von Therapien mittels CTCs sowie Therapie-Entscheidungen basierend auf molekularen CTC Analysen werden gegenwärtig in Leitlinien nicht empfohlen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass CTC und cCTC Genexpressionsanalysen aus kryokonservierten DLA Proben einer AI resistenten Patientin relevante endokrine Resistenzmechanismen sowie endokrine therapeutische Zielstrukturen detektieren konnten. Hinsichtlich der klinischen Entscheidungsfindung könnten speziell bei nicht vorhandenen Gewebebiopsien molekulare CTC Analysen zukünftig eine potentielle Hilfestellung darstellen. Vor dem routinemäßigen Einsatz in der Klinik sind jedoch die Festlegung von Standards hinsichtlich der CTC Detektion, der Isolation, der Selektion, der molekularen Analysen sowie die Durchführung translationaler Studien notwendig.

4.4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Multi-Marker Genexpressionsanalysen die intra-individuelle Heterogenität einzelner CTCs und cCTCs hinsichtlich endokrin therapeutischer Zielstrukturen sowie endokriner Resistenzmechanismen untersucht werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Analysen auf Einzelzellebene im Vergleich zu Analysen von Zell-Pools genauere Aufschlüsse über die Biologie und Heterogenität von CTCs liefern können. Zudem geben die dargestellten Genexpressionsprofile einzelner CTCs Aufschluss über die mögliche klinische Relevanz endokriner therapeutischer Zielstrukturen sowie möglicher endokriner Resistenzmechanismen.

Eine Fixierung und Permeabilisierung vor Einzelzell-Genexpressionsanalysen ist prinzipiell möglich, jedoch zeigte sich nach Verwendung des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits keine suffiziente RNA-Qualität auf Einzelzellebene. Derzeit erfolgt deswegen die Etablierung eines Methodenschemas unter Verwendungen des CellSearch® Profile Kits zur CTC-Anreicherung und anschließender CTC-Detektion mit Hilfe der Oberflächenmarker EpCAM, MUC1 und HER2. Dadurch könnten native und fixierte CTCs angereichert und bei Bedarf eine zusätzliche Permeabilisierung durchgeführt werden. Durch diese Methodik würden Fixierungen sowie Permeabilisierungen durch das CellSearch®-System unter Verwendung des CellSearch® Circulating Tumor Cell Kits umgangen und somit möglicherweise Genexpressionsprofile einzelner, fixierter CTCs auf Einzelzellebene erstellt werden können.

RNA-Qualitätskontrollen offenbarten bei 30 % der CTCs sowie 50 % der kultivierten CTCs eine gute RNA-Qualität, sodass mit diesen Multi-Marker-Genexpressionsanalysen durchgeführt werden konnten. Die meisten CTCs sterben während der Zirkulation im Blutstrom oder befinden sich bereits in Apoptose. Visuelle Qualitäts-Analysen im Rahmen der Mikromanipulation von Einzelzellen unter Hinzunahme von Apoptose Marker könnten die Ausbeute von CTCs guter RNA-Qualität erhöhen. Derzeit erfolgt deswegen die Etablierung von AnnexinV/PPI Färbungen in den Methodenablauf.

In zwei CTCs sowie zwei cCTCs konnten keine Transkripte von ACTB und KR19 im Rahmen der RNA-Qualitätskontrollen detektiert werden. Um einen technischen Fehler bei der Mikromanipulation bzw. dem Ablegen von Einzelzellen in Reaktionsgefäße auszuschließen, erfolgt nun der Nachweis abgelegter Zellen durch visuelle Kontrolle in speziell hergestellten Flachboden-Röhrchen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass aus kryokonservierten DLA Proben nach Isolierung der CTCs mit dem ParsortixTM-System und dem CellCelector-Mikromanipulator

Multi-Marker-Genexpressionsprofile einzelner CTCs und kultivierter CTCs erstellt werden können. Dieser Methodenablauf ermöglicht in Zukunft die Analyse größerer Anzahlen einzelner CTCs ohne zeitliche Einschränkungen hinsichtlich der Möglichkeit der Kryokonservierung von Patientenproben.

In dieser Arbeit lieferten Multi-Marker-Genexpressionsanalysen einzelner CTCs wichtige Einblicke in die Tumorbiologie. Gegenüber RNA-Sequenzierungen haben qRT-PCR Analysen den Vorteil, dass sie kosten-effizient, einfacher durchzuführen sowie auszuwerten sind. Zudem werden geringere RNA-Mengen benötigt. RNA-Sequenzierungen bieten jedoch den Vorteil, dass unbekannte Transkripte, Splicevarianten sowie Fusionstranskripte identifiziert werden können. Deshalb könnten in Zukunft zusätzlich RNA-Sequenzierungen einzelner CTCs einen wertvollen Beitrag zur Tumorbiologie, der Detektion Therapie-relevanter Signalgene sowie Resistenzmechanismen bei Mammakarzinom-Patientinnen liefern.

Derzeit werden CDK 4/6-Inhibitoren bei Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom im metastasierten Stadium als neue Therapieoption eingesetzt. In dieser Arbeit zeigte sich eine hohe CCND1 Expression in ER-positiven CTCs gegenüber ER-negativen CTCs. Somit wären weitere CTC-Analysen interessant, die diese CTC-Subgruppen unter einer Therapie von CDK 4/6-Inhibitoren bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom untersuchen.

Die Charakterisierung einzelner CTCs sowie kultivierter CTCs durch Multi-Marker-Genexpressionsprofile könnte in Echtzeit wichtige Informationen hinsichtlich therapeutischer Zielsequenzen sowie möglicher Resistenzmechanismen liefern und demnach zu einer Überwachung der Therapiewirksamkeit bei Mammakarzinom-Patientinnen beitragen. Genexpressionsanalysen einzelner CTCs könnten damit zu einer Weiterentwicklung von personalisierten Therapien bei Mammakarzinom-Patientinnen beitragen.

4.5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt eine heterogene Erkrankung dar, welche durch verschiedene histologische und molekulare Subtypen geprägt ist. Gegenwärtig basiert die Auswahl und Indikation einer Therapie auf den biologischen Eigenschaften des Primärtumors. Etwa 70 % aller Mammakarzinome exprimieren Hormonrezeptoren und gelten damit als endokrin sensitiv. Die Wirksamkeit endokriner Therapien ist jedoch durch primäre und sekundäre Resistenzen limitiert. Zahlreiche mögliche molekulare Resistenzmechanismen wurden beschrieben, wie eine veränderte Expression von ER, Mutationen des ESR1 Gens, eine veränderte Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, eine veränderte Expression von Zellzyklusregulatoren, eine Dysregulation von ER Co-Aktivatoren, die Autophagie, die Epithelial-Mesenchymale Transition sowie eine verstärkte Tumorerheterogenität. Innerhalb eines Primärtumors existieren verschiedene Subklone, die eine Therapieresistenz bedingen können sowie unterschiedliche Neigungen zur Metastasierung besitzen. Bereits früh im Krankheitsverlauf zeigen Mammakarzinom-Patientinnen eine hämatogene Streuung von Tumorzellen. Diese im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) gelten als Vorläuferzellen von Metastasen. CTCs haben sich als wichtiger Surrogat-Marker für die Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen erwiesen. Die Charakterisierung einzelner CTCs könnte damit wichtige Informationen hinsichtlich therapeutischer Zielstrukturen sowie möglicher Resistenzmechanismen liefern. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Charakterisierung der intra-individuellen Heterogenität einzelner CTCs hinsichtlich therapeutischer Zielstrukturen endokriner Therapien sowie möglicher endokriner Resistenzmechanismen bei metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen mit Resistenzen gegenüber endokrinen Therapien.

Die Etablierung und Validierung von Multi-Marker-Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene erfolgte an endokrin-responsiven MCF-7, endokrin-resistenten MCF-7/TAMR1 und nicht endokrin-responsiven MDA-MB-231 Zelllinien-Zellen. Die Genexpressionsprofile einzelner MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen zeigten vorwiegend vergleichbare Genexpressionsprofile wie entsprechende Zell-Pools. Einzelne MCF-7, MCF-7/TAMR1 und MDA-MB-231 Zellen offenbarten Zelllinien-spezifische Charakteristika. Die Behandlung der Zellen mit CellSave®, einer Permeabilisierung oder der Kombination aus beidem hatte keine signifikanten Effekte auf die Genexpression im Vergleich zu nativen Zellen. Dagegen war die RNA nach Verwendung des CellSearch® CTC Kits bei Zelllinien-Zellen sowie CTCs nicht für weitere Experimente geeignet. Nach Anreicherung

mittels Diagnostischer Leukapherese (DLA) und Parsortix™-Systems war die RNA-Qualität in 30 % der analysierten CTCs ausreichend gut.

Klinisch zeigte sich zum Zeitpunkt der DLA ein Progress der Patientin unter endokriner Therapie mit einem Aromataseinhibitor. Die Genexpressionsanalysen einzelner CTCs offenbarten eine hohe Plastizität sowie intra-individuelle Heterogenität hinsichtlich endokriner und phänotypischer Marker. Es zeigten sich sowohl ER-positive als auch ER-negative CTCs. Zudem zeigten sich HER2-positive CTCs bei HER2-negativem Primarius sowie der Nachweis von Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, IGFR, FGFR) auf CTCs. Einzelne CTCs wiesen zudem EMT Marker (TWIST) sowie Marker eines mesenchymalen Phänotyps (VIM) auf. In allen CTCs konnte die Expression von CD44 nachgewiesen werden.

Nach hierarchischen Clusteranalyse offenbarten sich CTC-Subgruppen, deren Expression sich signifikant in der Expression phänotypischer Marker (CD24, MYC) sowie Marker endokriner Signalwege (FOXO, PTEN) unterschied. Zudem zeigte sich in der ER-positiven CTC-Subgruppe im Vergleich zur ER-negativen CTC-Subgruppe eine signifikant höhere CyclinD1 Expression, die eine Zielstruktur endokrin basierter Therapien mit CDK4/CDK6 Inhibitoren darstellt.

Darüber hinaus erfolgte die Genexpressionsanalyse einzelner kultivierter CTCs (cCTCs), welche aus der gleichen kryokonservierten DLA-Probe nach Anreicherung mittels Parsortix™-Systems kultiviert wurden. Dabei zeigte sich in 50 % der analysierten cCTCs eine gute RNA-Qualität. Analog zu CTCs konnte auch eine hohe Plastizität sowie intra-individuelle Heterogenität hinsichtlich endokriner (ER, PR) und phänotypischer Marker bei cCTCs aufgezeigt werden. Es konnten auch ER-positive sowie ER-negative CTCs detektiert werden. Zudem offenbarten sich analog zu CTCs neben HER2-negativen cCTCs HER2-positive cCTCs. Alle cCTCs exprimierten MUC1. Subgruppenanalysen zeigten cCTC-Subpopulationen auf, die sich signifikant in der Expression phänotypischer Marker (EpCAM, CD 44, MUC1) unterschieden. Interessanterweise zeigten die Transkriptionsprofile von CTCs und cCTCs keine räumliche Abgrenzung, sondern eine teilweise gemeinsame Subgruppenbildung.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein robuster, schneller und kosteneffizienter Arbeitsablauf zur Gewinnung einzelner CTCs mittels DLA und Parsortix™-Systems mit anschließender Charakterisierung auf Transkriptom-Ebene für mögliche endokrine Resistenzmechanismen sowie therapeutischer Zielstrukturen endokriner Therapien erfolgreich etabliert werden. Zum ersten Mal konnten Genexpressionsprofile einzelner nicht-kultivierter und kultivierter CTCs einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom erstellt werden. Die

Genexpressionsanalysen einzelner CTCs sowie kultivierter CTCs offenbarten mögliche endokrine Resistenzmechanismen sowie therapeutische Zielstrukturen endokriner Therapien. Schlussendlich sind diese Technologien vielversprechende Werkzeuge für zukünftige CTC-Analysen, die möglicherweise eine klinische Relevanz bei der Stratifizierung von Patienten zu entsprechenden Therapien sowie der Therapieoptimierung haben. Zuvor sind jedoch die Festlegung von klinischen Standards sowie die Durchführung translationaler Studien notwendig.

4.6. Abstract

Breast cancer is a heterogeneous disease with multiple distinct histologic and molecular subtypes. Indications for therapy and treatment recommendations are currently based on the biologic features of the primary tumor. Approximately 70 % of all breast cancers express hormone receptors and are therefore endocrine sensitive. However, the effectiveness of endocrine therapies is limited by primary and secondary endocrine resistance. Several molecular resistance mechanisms were proposed which include alterations in the ER expression, ESR1 mutations, altered expression of growth factor receptors, the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway, dysregulation of ER co-activators, altered expression of cell cycle regulators, autophagy, epithelial to mesenchymal transition as well as increased tumor heterogeneity. Primary tumors consist of several subclones, which could lead to therapy resistance and harbor different tendencies to metastasize. Breast cancer patients show an early hematogenous dissemination of tumor cells in course of disease. Circulating tumor cells (CTCs) represent precursor cells of metastatic disease and they have become a surrogate marker for prognosis of breast cancer patients. Characterization of single CTCs could reveal important information concerning therapy target molecules as well as possible resistance mechanisms. Therefore, the aim of the study was the characterization of intra-individual heterogeneity of single CTCs in terms of the expression of molecules targeted by endocrine therapy as well as possible endocrine resistance mechanisms in metastasized breast cancer patients with endocrine therapy resistance.

The establishment and validation of a multi-marker gene expression analysis on single cell level was performed with endocrine responsive MCF-7, endocrine resistant MCF-7/TAMR1 and endocrine unresponsive MDA-MB-231 cell line cells. Gene expression profiles of single MCF-7, MCF-7/TAMR1 and MDA-MB-231 cells revealed mostly comparable gene expression profiles to pools of cells. Single MCF-7, MCF-7/TAMR1 and MDA-MB-231 cells showed cell line specific characteristics. Treatment of cells with CellSave®, permeabilization or the combination of both revealed no significant differences compared to controls. However, no cell line cells and CTCs of sufficient RNA quality could be found after processing with the CellSearch® CTC kit and the CellSearch®-System.

After enrichment via diagnostic leukapheresis (DLA) and Parsortix™ system, gene expression analysis revealed a good RNA quality in 30 % of analyzed CTCs. At the time of DLA, the patient revealed a progress under aromatase inhibitor therapy. Gene expression analysis of single CTCs revealed a high plasticity as well as intra-individual heterogeneity in terms of

endocrine and phenotypic markers. ER-positive as well as ER-negative CTCs were present. Moreover, HER2-positive CTCs were detectable regarding the HER2 negative primary tumor and growth factor receptors (EGFR, IGFR, FGFR) were present on CTCs. Single CTCs also revealed EMT markers (TWIST) as well as markers for a mesenchymal phenotype (VIM). Transcripts of the stem cell marker CD44 could be detected in all CTCs. Hierarchical clustering showed CTC subgroups, whose expression differed significantly in regard to phenotypic markers (CD44, MYC) and markers of endocrine signaling pathways (FOXO, PTEN). Moreover, the ER-positive CTC subgroup showed a significant higher expression of CCND1 in comparison to the ER-negative subgroup.

Additionally, gene expression analysis was performed of single cultured CTCs (cCTCs) which were cultured of the same cryopreserved DLA probe after enrichment via the Parsortix™ system. 50 % of analyzed cCTCs revealed a good RNA quality, respectively. Consistent with CTCs, cCTCs also demonstrated a high plasticity as well as intra-individual heterogeneity regarding endocrine (ER, PR) and phenotypic markers. Analysis revealed ER-positive as well as ER-negative cCTCs. In line to CTCs, cCTCs were HER2-positive as well as HER2-negative. All cCTCs expressed MUC1. Gene expression profiles showed cCTCs subgroups, which differed significantly in the expression of phenotypic markers (EpCAM, CD44, MUC1). Interestingly, gene expression profiles of CTCs and cCTCs showed no clear distinction rather a partly combined grouping.

In summary, a robust, rapid and cost-efficient workflow was successfully established for enrichment of single CTCs by DLA and Parsortix™-system with subsequent characterization on the transcriptomic single cell level for endocrine resistance mechanisms as well as relevant therapeutic targets for endocrine therapies. For the first time, single gene expression profiles of uncultured and cultured CTCs of the same metastatic breast cancer patient could be generated. Gene expression profiles revealed possible endocrine resistance mechanisms as well as relevant therapeutic targets for endocrine therapies. Finally, these technologies constitute promising tools for CTC analysis which might have great potential for clinical decision-making but firstly standardization of protocols and translational studies are necessary.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA/Bis AA	Acrylamid/Bisacrylamid
ACD-A	Acid Citrate Dextrose solution A
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Alexa Fluor
AI	Aromatase-Inhibitor
Akt	Proteinkinasen B
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BET	Brust erhaltende Therapie
BRCA 1/2	Breast Cancer 1/2
BSA	bovine serum albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
CCD	Charge-coupled Device
CCDN1	Cyclin D1
CD 45	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
CDK1	Cyclin dependent kinase 4/6
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	CellSearch®
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
Ct	Cycle of Threshold

CTC	zirkulierende Tumorzelle
CTX	Chemotherapie
Cu ⁺	Kupfer
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DLA	Diagnostische Leukapherese
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminierte Tumorzelle
DTT	Dithiothreitol
E12	basic helix-loop-helix (bHLH) proteins
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER	Östrogen-Rezeptor
ESR1	Estrogen Receptor 1
ESR2	Estrogen Receptor 2
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fetales Kalberserum
FDA	Food and Drug Administration

FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOXO	forkhead box proteins
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GUSB	Glucuronidase Beta
h	Stunde
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	Human Serum Albumin
IF	Immunfluoreszenz
IGFR	Insulin Like Growth Factor Receptor
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
KM	Knochenmark
KR	Keratin
mA	Milliampere
MET	Mesenchymal-Epitheliale-Transition
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol je Liter
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

MUC1	Mucin 1
Na	Natrium
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NFQ	Nicht-Fluoreszierenden Quencher
O ₂	Sauerstoff
PB	Permeabilisierung
PB	peripheral blood
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	principal component analysis
PCR	Polymerasechainreaction
PDX	patient dervived xenograft
pg	picogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PR	Progesteron-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastom-Protein
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer
RNA, mRNA, miRNA	Ribonukleinsäure, messenger-RNA, micro-RNA
rpm	Umdrehungen je Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQ	relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SERD	Östrogenrezeptor-Downregulatoren
SERM	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren

SLN	Sentinel-Lymphknoten
SNAIL	Snail Family Transcriptional Repressor
SPARC	Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween2
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TWIST	Twist Family BHLH Transcription Factor
U	Units
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UPR	unfolded protein response
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
VEGFR	Vascular Epidermal Growth Factor Receptor
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZEB1/2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1/2
Δ	delta (Differenz)
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
α	alpha
β	beta

γ	gamma
δ	delta
ε	epsilon
ul	Mikroliter

LITERATURVERZEICHNIS

1. Pschyrembel W., *Pschyrembel klinisches Wörterbuch, 267., aktualisierte Auflage 2017. Buch. XXII, 1998 S.: De Gruyter ISBN 978-3-11-049497-.*
2. Alberts B., et al., *Molecular Biology of the cell.* 2011.
3. van Praag, V.M., et al., *A prediction model for treatment decisions in high-grade extremity soft-tissue sarcomas: Personalised sarcoma care (PERSARC).* Eur J Cancer, 2017. **83**: p. 313-323.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.* Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
5. Spano, D., et al., *Molecular networks that regulate cancer metastasis.* Semin Cancer Biol, 2012. **22**(3): p. 234-49.
6. al., A.B.e., *Molecular Biology of the cell.* 2011: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
7. Weinberg, R.A., *Mechanisms of malignant progression.* Carcinogenesis, 2008. **29**(6): p. 1092-5.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
10. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
11. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012.* CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
12. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013.* CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 52-62.

13. Tao, Z., et al., *Breast Cancer: Epidemiology and Etiology*. Cell Biochem Biophys, 2015. **72**(2): p. 333-8.
14. *Krebsregisterdaten, ICD-10 C50, 2011: Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut; 2015.*
15. *Krebs in Deutschland 2009/2010. 9 ed: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2013.*
16. Boyd, N.F., et al., *Mammographic density and the risk and detection of breast cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(3): p. 227-36.
17. Heusinger, K., et al., *Mammographic density as a risk factor for breast cancer in a German case-control study*. Eur J Cancer Prev, 2011. **20**(1): p. 1-8.
18. Colditz, G.A., et al., *Family history and risk of breast cancer: nurses' health study*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(3): p. 1097-104.
19. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
20. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies*. Lancet Oncol, 2012. **13**(11): p. 1141-51.
21. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 187-95.
22. Kelsey, J.L., M.D. Gammon, and E.M. John, *Reproductive factors and breast cancer*. Epidemiol Rev, 1993. **15**(1): p. 36-47.
23. Kotsopoulos, J., et al., *Risk factors for ductal and lobular breast cancer: results from the nurses' health study*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(6): p. R106.

24. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
25. Bardia, A., et al., *Recreational physical activity and risk of postmenopausal breast cancer based on hormone receptor status*. Arch Intern Med, 2006. **166**(22): p. 2478-83.
26. Horn-Ross, P.L., et al., *Recent diet and breast cancer risk: the California Teachers Study (USA)*. Cancer Causes Control, 2002. **13**(5): p. 407-15.
27. Suzuki, R., et al., *Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(21): p. 1601-8.
28. Sasco, A.J., A.B. Lowenfels, and P. Pasker-de Jong, *Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors*. Int J Cancer, 1993. **53**(4): p. 538-49.
29. *Leitlinienprogramm Onkologie / Kurzversion S3-Leitlinie Mammakarzinom / Version 4.0 / November 2017*.
30. Soerjomataram, I., et al., *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(3): p. 309-30.
31. Sørli, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
32. Coates, A.S., et al., *Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1533-46.
33. Anderson, W.F., et al., *Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **76**(1): p. 27-36.

34. Colomer, R., et al., *It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(16): p. 3868-9; author reply 3869-70.
35. Hammond, M.E., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2010. **134**(6): p. 907-22.
36. Selli, C., J.M. Dixon, and A.H. Sims, *Accurate prediction of response to endocrine therapy in breast cancer patients: current and future biomarkers*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 118.
37. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
38. *AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2016*. www.ago-online.de.
39. Ellis, M.J., et al., *Fulvestrant 500 mg Versus Anastrozole 1 mg for the First-Line Treatment of Advanced Breast Cancer: Overall Survival Analysis From the Phase II FIRST Study*. J Clin Oncol, 2015. **33**(32): p. 3781-7.
40. Boccardo, F., et al., *Chemotherapy versus tamoxifen versus chemotherapy plus tamoxifen in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer patients: results of a multicentric Italian study*. Breast Cancer Adjuvant Chemo-Hormone Therapy Cooperative Group. J Clin Oncol, 1990. **8**(8): p. 1310-20.
41. Lønning, P.E. and H.P. Eikesdal, *Aromatase inhibition 2013: clinical state of the art and questions that remain to be solved*. Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(4): p. R183-201.
42. Osborne, C.K. and R. Schiff, *Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 233-47.
43. Miller, W.R., *Identification and mechanisms of endocrine resistance*. Breast Cancer Res, 2008. **10 Suppl 4**: p. S19.

44. Musgrove, E.A. and R.L. Sutherland, *Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(9): p. 631-43.
45. Polzer, B., et al., *Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(11): p. 1371-86.
46. Maurer, C., et al., *New agents for endocrine resistance in breast cancer*. Breast, 2017. **34**: p. 1-11.
47. Kuske, B., et al., *Endocrine therapy resistance can be associated with high estrogen receptor alpha (ERalpha) expression and reduced ERalpha phosphorylation in breast cancer models*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(4): p. 1121-33.
48. Ellis, M.J., et al., *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(19): p. 1380-8.
49. Fuqua, S.A., et al., *Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors*. Cancer Res, 1992. **52**(2): p. 483-6.
50. Weis, K.E., et al., *Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(11): p. 1388-98.
51. Robinson, D.R., et al., *Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1446-51.
52. Toy, W., et al., *ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1439-45.
53. Network, C.G.A., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
54. Hutcheson, I.R., et al., *Oestrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **81**(1): p. 81-93.

55. Nicholson, R.I., et al., *Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **93**(2-5): p. 257-62.
56. Turner, N., et al., *FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(5): p. 2085-94.
57. Elbauomy Elsheikh, S., et al., *FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(2): p. R23.
58. Dowsett, M., et al., *Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial*. J Clin Oncol, 2008. **26**(7): p. 1059-65.
59. Houston, S.J., et al., *Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer*. Br J Cancer, 1999. **79**(7-8): p. 1220-6.
60. Rasmussen, B.B., et al., *Adjuvant letrozole versus tamoxifen according to centrally-assessed ERBB2 status for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: supplementary results from the BIG 1-98 randomised trial*. Lancet Oncol, 2008. **9**(1): p. 23-8.
61. Dowsett, M., et al., *Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status*. Ann Oncol, 2006. **17**(5): p. 818-26.
62. Yerushalmi, R., et al., *Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(1): p. 131-42.
63. Foekens, J.A., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptors and insulin-like growth factor-1-like activity in human primary breast cancer*. Cancer, 1989. **63**(11): p. 2139-47.
64. Westley, B.R., et al., *Interactions between the oestrogen and insulin-like growth factor signalling pathways in the control of breast epithelial cell proliferation*. Biochem Soc Symp, 1998. **63**: p. 35-44.

65. Lanzino, M., et al., *Interaction between estrogen receptor alpha and insulin/IGF signaling in breast cancer*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008. **8**(7): p. 597-610.
66. Fagan, D.H., et al., *Acquired resistance to tamoxifen is associated with loss of the type I insulin-like growth factor receptor: implications for breast cancer treatment*. *Cancer Res*, 2012. **72**(13): p. 3372-80.
67. Lee, A.V., et al., *Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(5): p. 787-96.
68. Heskamp, S., et al., *Dynamics of IGF-1R expression during endocrine breast cancer treatment*. *Mol Imaging Biol*, 2014. **16**(4): p. 529-37.
69. Drury, S.C., et al., *Changes in breast cancer biomarkers in the IGF1R/PI3K pathway in recurrent breast cancer after tamoxifen treatment*. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(5): p. 565-77.
70. Arnedos, M., et al., *Biomarker changes associated with the development of resistance to aromatase inhibitors (AIs) in estrogen receptor-positive breast cancer*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(3): p. 605-10.
71. Shou, J., et al., *Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(12): p. 926-35.
72. Frogne, T., et al., *Activation of ErbB3, EGFR and Erk is essential for growth of human breast cancer cell lines with acquired resistance to fulvestrant*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **114**(2): p. 263-75.
73. Bhargava, R., et al., *EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(8): p. 1027-33.
74. Manders, P., et al., *Vascular endothelial growth factor is associated with the efficacy of endocrine therapy in patients with advanced breast carcinoma*. *Cancer*, 2003. **98**(10): p. 2125-32.

75. Campbell, I.G., et al., *Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7678-81.
76. Levine, D.A., et al., *Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2875-8.
77. Saal, L.H., et al., *PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2554-9.
78. Arthur, L.M., et al., *Changes in PIK3CA mutation status are not associated with recurrence, metastatic disease or progression in endocrine-treated breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **147**(1): p. 211-9.
79. Tserga, A., et al., *Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness*. Virchows Arch, 2016. **469**(1): p. 35-43.
80. Dirican, E., M. Akkiprik, and A. Özer, *Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer*. Tumour Biol, 2016. **37**(6): p. 7033-45.
81. Stemke-Hale, K., et al., *An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6084-91.
82. Miller, T.W., et al., *Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. 224.
83. Hennessy, B.T., et al., *Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4116-24.
84. Bullock, M., *FOXO factors and breast cancer: outfoxing endocrine resistance*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(2): p. R113-30.
85. Montenegro, M.F., et al., *Promoting E2F1-mediated apoptosis in oestrogen receptor- α -negative breast cancer cells*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 539.

86. Shoman, N., et al., *Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen*. Mod Pathol, 2005. **18**(2): p. 250-9.
87. Wickenden, J.A. and C.J. Watson, *Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary epithelium: a play in 3 Akts*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(2): p. 202.
88. Thangavel, C., et al., *Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(3): p. 333-45.
89. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
90. Clarke, R., et al., *Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate*. Cancer Res, 2012. **72**(6): p. 1321-31.
91. Gu, Z., et al., *Association of interferon regulatory factor-1, nucleophosmin, nuclear factor-kappaB, and cyclic AMP response element binding with acquired resistance to Faslodex (ICI 182,780)*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3428-37.
92. Shajahan, A.N., R.B. Riggins, and R. Clarke, *The role of X-box binding protein-1 in tumorigenicity*. Drug News Perspect, 2009. **22**(5): p. 241-6.
93. Cook, K.L., et al., *Knockdown of estrogen receptor- α induces autophagy and inhibits antiestrogen-mediated unfolded protein response activation, promoting ROS-induced breast cancer cell death*. FASEB J, 2014. **28**(9): p. 3891-905.
94. Liu, H., et al., *Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties*. Chin Med J (Engl), 2013. **126**(16): p. 3030-4.
95. Bouris, P., et al., *Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells*. Matrix Biol, 2015. **43**: p. 42-60.
96. Ye, Y., et al., *ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT*. Oncogene, 2010. **29**(10): p. 1451-62.

97. Al Saleh, S., L.H. Sharaf, and Y.A. Luqmani, *Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review)*. Int J Oncol, 2011. **38**(5): p. 1197-217.
98. Loh, Y.N., et al., *The Wnt signalling pathway is upregulated in an in vitro model of acquired tamoxifen resistant breast cancer*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 174.
99. Reinhardt, F., et al., *Navigation through inter- and intratumoral heterogeneity of endocrine resistance mechanisms in breast cancer: A potential role for Liquid Biopsies?* Tumour Biol, 2017. **39**(11): p. 1010428317731511.
100. DeVita, V.T., R.C. Young, and G.P. Canellos, *Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer*. Cancer, 1975. **35**(1): p. 98-110.
101. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
102. Vanharanta, S. and J. Massagué, *Origins of metastatic traits*. Cancer Cell, 2013. **24**(4): p. 410-21.
103. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 94-112.
104. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
105. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
106. Robinson, B.D., et al., *Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2433-41.
107. Aman, A. and T. Piotrowski, *Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression*. Dev Cell, 2008. **15**(5): p. 749-61.

108. Ferrara, N., *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 795-803.
109. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
110. Camara, O., et al., *Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells*. World J Surg Oncol, 2006. **4**: p. 67.
111. Förnvik, D., et al., *No evidence for shedding of circulating tumor cells to the peripheral venous blood as a result of mammographic breast compression*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **141**(2): p. 187-95.
112. Lou, X.L., et al., *Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication*. Chin J Cancer Res, 2015. **27**(5): p. 450-60.
113. Butler, T.P. and P.M. Gullino, *Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma*. Cancer Res, 1975. **35**(3): p. 512-6.
114. Kang, Y. and K. Pantel, *Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients*. Cancer Cell, 2013. **23**(5): p. 573-81.
115. Ito, S., et al., *Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line*. Int J Cancer, 2001. **93**(2): p. 212-7.
116. Reymond, N., B.B. d'Água, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 858-70.
117. Miles, F.L., et al., *Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(4): p. 305-24.
118. Tam, W.L. and R.A. Weinberg, *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1438-49.
119. Uhr, J.W. and K. Pantel, *Controversies in clinical cancer dormancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12396-400.

120. Kennecke, H., et al., *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3271-7.
121. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 98-101.
122. Giacotti, F.G., *Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation*. Cell, 2013. **155**(4): p. 750-64.
123. Li, Y., S. Wu, and F. Bai, *Molecular characterization of circulating tumor cells-from bench to bedside*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **75**: p. 88-97.
124. Nieto, M.A., *The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 347-76.
125. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
126. Scheel, C., et al., *Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast*. Cell, 2011. **145**(6): p. 926-40.
127. Kishi, S., P.E. Bayliss, and J. Hanai, *A prospective epigenetic paradigm between cellular senescence and epithelial-mesenchymal transition in organismal development and aging*. Transl Res, 2015. **165**(1): p. 241-9.
128. Chiotaki, R., H. Polioudaki, and P.A. Theodoropoulos, *Cancer stem cells in solid and liquid tissues of breast cancer patients: characterization and therapeutic perspectives*. Curr Cancer Drug Targets, 2015. **15**(3): p. 256-69.
129. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
130. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
131. Sigurdsson, V., et al., *Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23833.

132. Maier, H.J., T. Wirth, and H. Beug, *Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. *Cancers (Basel)*, 2010. **2**(4): p. 2058-83.
133. Ashworth TR., *A case of cancer in which cells similar to those in tumours were seen in the blood after death*. *Med J*, 1869. **14**: p. 146-9.
134. Allard, W.J., et al., *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(20): p. 6897-904.
135. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 920-8.
136. de Wit, S., et al., *The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12270.
137. Meng, S., et al., *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8152-62.
138. Coumans, F.A., et al., *Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(20): p. 5711-8.
139. Tjensvoll, K., O. Nordgård, and R. Smaaland, *Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications*. *Int J Cancer*, 2014. **134**(1): p. 1-8.
140. Fehm, T., et al., *Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(7): p. 2073-84.
141. Theodoropoulos, P.A., et al., *Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer*. *Cancer Lett*, 2010. **288**(1): p. 99-106.
142. Fischer, J.C., et al., *Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(41): p. 16580-5.

143. Andree, K.C., et al., *Towards a real liquid biopsy in metastatic breast and prostate cancer: Diagnostic LeukApheresis increases CTC yields in a European prospective multi-center study (CTCTrap)*. Int J Cancer, 2018.
144. Xu, L., et al., *Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138032.
145. Lin, H.K., et al., *Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(20): p. 5011-8.
146. Herlyn, M., et al., *Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(3): p. 1438-42.
147. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(8): p. 781-91.
148. Fehm, T., et al., *Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(4): p. R59.
149. Kasimir-Bauer, S., et al., *Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(1): p. R15.
150. Ozkumur, E., et al., *Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells*. Sci Transl Med, 2013. **5**(179): p. 179ra47.
151. Nagrath, S., et al., *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. Nature, 2007. **450**(7173): p. 1235-9.
152. Budd, G.T., et al., *Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6403-9.
153. Smirnov, D.A., et al., *Global gene expression profiling of circulating tumor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 4993-7.
154. Vaiopoulos, A.G., et al., *Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay*. Anticancer Res, 2014. **34**(6): p. 3083-92.

155. Barrière, G., et al., *Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 114.
156. Gasch, C., et al., *Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer*. Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 252-60.
157. Ni, X., et al., *Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(52): p. 21083-8.
158. Ramsköld, D., et al., *Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(8): p. 777-82.
159. Gorges, T.M., et al., *Accession of Tumor Heterogeneity by Multiplex Transcriptome Profiling of Single Circulating Tumor Cells*. Clin Chem, 2016. **62**(11): p. 1504-1515.
160. Cayrefourcq, L., et al., *Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells*. Cancer Res, 2015. **75**(5): p. 892-901.
161. Yu, M., et al., *Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility*. Science, 2014. **345**(6193): p. 216-20.
162. Zhang, L., et al., *The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis*. Sci Transl Med, 2013. **5**(180): p. 180ra48.
163. (EBCTCG), E.B.C.T.C.G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
164. Banys-Paluchowski, M., et al., *Circulating tumor cells in breast cancer--current status and perspectives*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **97**: p. 22-9.
165. Hayes, D.F., et al., *Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4218-24.

166. Bidard, F.C., et al., *Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(4): p. 406-14.
167. Wallwiener, M., et al., *The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **137**(2): p. 503-10.
168. Rack, B., et al., *Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(5).
169. Pachmann, K., et al., *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*, 2008. **26**(8): p. 1208-15.
170. Lucci, A., et al., *Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(7): p. 688-95.
171. Pierga, J.Y., et al., *Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(21): p. 7004-10.
172. Boutrus, R.R., et al., *Circulating tumor cells as predictors of response and failure in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy*. *Int J Biol Markers*, 2013. **28**(1): p. 17-23.
173. Giordano, A., et al., *Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-positive disease treated with targeted therapy*. *Ann Oncol*, 2012. **23**(5): p. 1144-50.
174. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(7): p. 1420-30.
175. Smerage, J.B., et al., *Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(31): p. 3483-9.
176. Bidard, F.C., et al., *Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials*. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**(1-2): p. 179-88.

177. Janni W, R.B., Fasching P, Haeberle L, Friedl T, Tesch H, et al., *Persistence of circulating tumor cells in high risk early breast cancer patients during follow-up care suggests poor prognosis-results from the adjuvant SUCCESS A trial*. 2015 San Antonio Breast Cancer Symposium, S02-S03. San Antonio, TX (2015).
178. Kasimir-Bauer, S., et al., *Does primary neoadjuvant systemic therapy eradicate minimal residual disease? Analysis of disseminated and circulating tumor cells before and after therapy*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 20.
179. Bidard, F.C., et al., *Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer*. Ann Oncol, 2010. **21**(4): p. 729-33.
180. Bidard, F.C., et al., *Time-Dependent Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells Detection in Non-Metastatic Breast Cancer: 70-Month Analysis of the REMAGUS02 Study*. Int J Breast Cancer, 2013. **2013**: p. 130470.
181. Fehm, T., et al., *HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **124**(2): p. 403-12.
182. Wallwiener, M., et al., *The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 403.
183. Meng, S., et al., *HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9393-8.
184. Ignatiadis, M., et al., *Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial*. Eur J Cancer, 2016. **63**: p. 97-104.
185. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
186. Chavez, K.J., S.V. Garimella, and S. Lipkowitz, *Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer*. Breast Dis, 2010. **32**(1-2): p. 35-48.

187. Truini, A., et al., *Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 242.
188. Neumann, M.H., et al., *Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch® system and the CellCelector™*. *Biotechnol Prog*, 2016.
189. Bass, C., et al., *The Vector Population Monitoring Tool (VPMT): High-Throughput DNA-Based Diagnostics for the Monitoring of Mosquito Vector Populations*. *Malar Res Treat*, 2010. **2010**: p. 190434.
190. Ståhlberg, A., et al., *RT-qPCR work-flow for single-cell data analysis*. *Methods*, 2013. **59**(1): p. 80-8.
191. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
192. Riss, T.L., Richard A. Moravec, Andrew L. Niles, Sarah Duellman, Hélène A. Benink, Tracy J. and a.L.M. Worzella. "Cell Viability Assays." *In Assay Guidance Manual*, edited by G. Sitta Sittampalam, Nathan P. Coussens, Kyle Brimacombe, Abigail Grossman, Michelle Arkin, Douglas Auld, Chris Austin, et al. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>. 2013.
193. Schneck, H., et al., *Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients*. *Mol Oncol*, 2013. **7**(5): p. 976-86.
194. Gasch, C., et al., *Frequent detection of PIK3CA mutations in single circulating tumor cells of patients suffering from HER2-negative metastatic breast cancer*. *Mol Oncol*, 2016.
195. Ting, D.T., et al., *Single-cell RNA sequencing identifies extracellular matrix gene expression by pancreatic circulating tumor cells*. *Cell Rep*, 2014. **8**(6): p. 1905-1918.
196. Miyamoto, D.T., et al., *RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance*. *Science*, 2015. **349**(6254): p. 1351-6.

197. Powell, A.A., et al., *Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e33788.
198. Lapin, M., et al., *Single-cell mRNA profiling reveals transcriptional heterogeneity among pancreatic circulating tumour cells*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 390.
199. Steinert, G., et al., *Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(6): p. 1694-704.
200. Reijm, E.A., et al., *An 8-gene mRNA expression profile in circulating tumor cells predicts response to aromatase inhibitors in metastatic breast cancer patients*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 123.
201. Xenidis, N., et al., *Differential effect of adjuvant taxane-based and taxane-free chemotherapy regimens on the CK-19 mRNA-positive circulating tumour cells in patients with early breast cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(3): p. 549-56.
202. Daskalaki, A., et al., *Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(4): p. 589-97.
203. Stathopoulou, A., et al., *A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(7): p. 1654-9.
204. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
205. de Cremoux, P., et al., *Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens*. Endocr Relat Cancer, 2003. **10**(3): p. 409-18.
206. Hiscox, S., et al., *Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 290-301.

207. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 515-27.
208. Elowitz, M.B., et al., *Stochastic gene expression in a single cell*. *Science*, 2002. **297**(5584): p. 1183-6.
209. Raj, A., et al., *Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells*. *PLoS Biol*, 2006. **4**(10): p. e309.
210. Miller, W.R. and A. Larionov, *Changes in expression of oestrogen regulated and proliferation genes with neoadjuvant treatment highlight heterogeneity of clinical resistance to the aromatase inhibitor, letrozole*. *Breast Cancer Res*, 2010. **12**(4): p. R52.
211. Paoletti, C., et al., *Development of circulating tumor cell-endocrine therapy index in patients with hormone receptor-positive breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(11): p. 2487-98.
212. Babayan, A., et al., *Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e75038.
213. Riethdorf, S., et al., *Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(9): p. 2634-45.
214. Khoo, B.L., et al., *Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy*. *Oncotarget*, 2015. **6**(17): p. 15578-93.
215. Shaw, J.A., et al., *Mutation analysis of cell-free DNA and single circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with high CTC counts*. *Clin Cancer Res*, 2016.
216. Neves, R.P., et al., *Genomic high-resolution profiling of single CKpos/CD45neg flow-sorting purified circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer*. *Clin Chem*, 2014. **60**(10): p. 1290-7.

217. Pestrin, M., et al., *Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients*. *Mol Oncol*, 2015. **9**(4): p. 749-57.
218. Aktas, B., et al., *Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 522.
219. Schuur, E.R., et al., *Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33554-60.
220. Sisci, D., et al., *The estrogen receptor α is the key regulator of the bifunctional role of FoxO3a transcription factor in breast cancer motility and invasiveness*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(21): p. 3405-20.
221. Turner, N.C., et al., *Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(3): p. 209-19.
222. Finn, R.S., et al., *Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(20): p. 1925-1936.
223. Hortobagyi, G.N., et al., *Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(18): p. 1738-1748.
224. Aktas, B., et al., *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(4): p. R46.
225. Krawczyk, N., et al., *Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 415721.
226. Polioudaki, H., et al., *Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 399.

227. Bourcy, M., et al., *Tissue Factor Induced by Epithelial-Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State That Drives Metastasis of Circulating Tumor Cells*. *Cancer Res*, 2016. **76**(14): p. 4270-82.
228. Kallergi, G., et al., *Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(3): p. R59.
229. Li, W., et al., *Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13856.
230. Schneck, H., et al., *EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0144535.
231. Nakamura, K., et al., *CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways*. *Oncol Rep*, 2017. **37**(6): p. 3189-3200.
232. Zhang, Y., et al., *Epithelial mesenchymal transition correlates with CD24+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer*. *Oncol Rep*, 2012. **27**(5): p. 1599-605.
233. Cho, K.B., et al., *Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells*. *Cancer Lett*, 2010. **293**(2): p. 230-9.
234. McNeil, C.M., et al., *c-Myc overexpression and endocrine resistance in breast cancer*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **102**(1-5): p. 147-55.
235. Miller, T.W., et al., *A gene expression signature from human breast cancer cells with acquired hormone independence identifies MYC as a mediator of antiestrogen resistance*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(7): p. 2024-34.
236. Wang, L., et al., *The Role of CD44 and Cancer Stem Cells*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1692**: p. 31-42.
237. Watanabe, T., et al., *Circulating tumor cells expressing cancer stem cell marker CD44 as a diagnostic biomarker in patients with gastric cancer*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(1): p. 281-288.

238. Nath, S. and P. Mukherjee, *MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression*. Trends Mol Med, 2014. **20**(6): p. 332-42.
239. Chen, C., et al., *The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 64.
240. Fribbens, C., et al., *Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer*. Ann Oncol, 2018. **29**(1): p. 145-153.
241. Ma, C.X., et al., *Mechanisms of aromatase inhibitor resistance*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(5): p. 261-75.
242. Paoletti, C., et al., *Heterogeneous estrogen receptor expression in circulating tumor cells suggests diverse mechanisms of fulvestrant resistance*. Mol Oncol, 2016. **10**(7): p. 1078-85.
243. Sabnis, G.J., et al., *The role of growth factor receptor pathways in human breast cancer cells adapted to long-term estrogen deprivation*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3903-10.
244. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
245. Jie, X.X., X.Y. Zhang, and C.J. Xu, *Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications*. Oncotarget, 2017. **8**(46): p. 81558-81571.

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: MOLEKULARE SUBTYPEN DES MAMMAKARZINOMS (MODIFIZIERT NACH [32]).....	5
TABELLE 2: KLINISCHE RELEVANZ VON CTCs BEI PATIENTINNEN MIT PRIMÄREM UND METASTASIERTEM MAMMAKARZINOM (MODIFIZIERT NACH [164]).....	17
TABELLE 3: REAKTIONSBEDINGUNGEN FÜR DEN PROTEINASEK-VERDAU	41
TABELLE 4: REAKTIONSANSATZ DES CDNA SYNTHESIS KITS.....	41
TABELLE 5: REAKTIONSBEDINGUNGEN DES CDNA SYNTHESIS KITS.....	41
TABELLE 6: REAKTIONSANSATZ FÜR DIE PRÄAMPLIFIKATION.....	42
TABELLE 7: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER PRÄAMPLIFIKATION.....	42
TABELLE 8: REAKTIONSANSATZ FÜR DIE QRT-PCR.....	44
TABELLE 9: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER QRT-PCR.....	44
TABELLE 10: DIAGNOSE UND KLINISCH-PATHOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DES PRIMARIUS.....	70
TABELLE 11: DIAGNOSE UND KLINISCH-PATHOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DER METASTASEN	71
TABELLE 12: TNM: KLINISCHE KLASSIFIKATION. T (TUMORGRÖßE), N (LYMPHKNOTEN), M (FERNMETASTASEN) (MODIFIZIERT NACH [29]).....	135
TABELLE 13: UICC STADIEN (MODIFIZIERT NACH [29]).....	136

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: BENIGNE UND MALIGN NEOPLASMIEN (ALBERTS <i>ET AL.</i>, 2011 [2]): EINE BENIGNE NEOPLASIE ZEIGT EIN VERDRÄNGENDES WACHSTUM OHNE INFILTRATION DER BASALMEMBRAN. MALIGN NEOPLASMIEN ZEICHNEN SICH DURCH EIN INVASIVES BASALMEMBRAN-ÜBERSCHREITENDES WACHSTUM AUS.	1
ABBILDUNG 2: „HALLMARKS OF CANCER“ (MODIFIZIERT NACH HANAHAN UND WEINBERG, 2011 [8]): ZEHN EIGENSCHAFTEN, DIE EINE MALIGN TRANSFORMATION EINER ZELLE HERVORRUFEN.	3
ABBILDUNG 3: SIGNALWEGE DES ER UND MOLEKULARE SIGNALWEGE ENDOKRINER RESISTENZMECHANISMEN (MAURER <i>ET AL.</i>, 2017 [46]).	7
ABBILDUNG 4: DIE METASTATISCHE KASKADE (LI <i>ET AL.</i>, 2018 [123]): TUMORZELLEN GELANGEN IN DEN BLUTSTROM (INVASION) UND SIND DORT SCHERKRÄFTEN SOWIE DER IMMUNABWEHR AUSGESETZT. ÜBERLEBENDE ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN KÖNNEN SICH UNTER BESTIMMTEN BEDINGUNGEN AN DAS ENDOTHEL ANLAGERN (HOMING) UND DAS BLUTGEFÄßSYSTEM VERLASSEN (EXTRAVASATION). DORT KÖNNEN SIE ENTWEDER PROLIFERIEREN UND METASTASEN BILDEN ODER IN EINEN RUHEZUSTAND (DORMANCY) FALLEN.	13
ABBILDUNG 5: CHARAKTERISTIKA EPITHELIALER AND MESENCHYMALER ZELL-ZUSTÄNDE (MAIER <i>ET AL.</i>, 2010 [132]): EMT: EPITHELIAL-MESENCHYMALER TRANSITION; MET: MESENCHYMAL-EPITHELIALE TRANSITION.....	14
ABBILDUNG 6: NEUBAUER IMPROVED ZÄHLKAMMER (HTTP://PROSCITECH.COM.AU/CATALOGUE/IMG/S/SV520-N.JPG)	34
ABBILDUNG 7: PRINZIP DER ANREICHERUNG UND DETEKTION VON CTCs MIT HILFE DES CELLSEARCH®-SYSTEMS (TRUINI <i>ET AL.</i>, 2014 [187]).	36
ABBILDUNG 8: ABLAUF DER DIAGNOSTISCHEN LEUKAPHERESE (DLA) ZUR ANREICHERUNG VON CTCs MIT HILFE DES SPECTRA OPTIA® SYSTEMS (MODIFIZIERT NACH HTTPS://WWW.CELLEX.ME/DE/BLUTSTAMMZELLSPENDE/ARTEN-DERENTNAHME/PERIPHERE-STAMMZELLENTNAHME): DAS GRUNDPRINZIP BASIERT AUF EINER EXTRAKORPORALEN BLUTZELLESEPARATION. VOLLBLUT WIRD DURCH ZENTRIFUGATION IN SEINE BESTANDTEILE AUFGETEILT. DURCH DIE ZUGABE DES GERINNUNGHEMMERS ACDA WIRD EINE GERINNUNG IM SCHLAUCHSYSTEM VERHINDERT. DIE CTC-HALTIGE SCHICHT (DICHTZ WISCHEN 1,05 UND 1,088 G/L) WIRD SEPARIERT UND IN EINEM SAMMELBEUTEL AUFGEFANGEN. DIE RESTLICHEN BLUTBESTANDTEILE WERDEN DEM PATIENTEN WIEDER ZURÜCKGEFÜHRT. ACDA = ACID CITRATE DEXTROSE SOLUTION A, CTCs=CIRCULATING TUMOR CELLS.....	38
ABBILDUNG 9: ANREICHERUNG VON CTCs MIT HILFE DES PARSORTIX™-SYSTEMS (XU <i>ET AL.</i>, 2015 [144]): (A) AUFBAU DES PARSORTIX™-SYSTEMS (B) AUFSICHT DER KLEMME, WELCHE DIE FILTER-KASSETTE EINSpanNT (C) AUFBAU DER FILTER-KASSETTE (D) PRINZIP DER ANREICHERUNG VON CTCs.	39
ABBILDUNG 10: CELLCELECTOR™-MIKROMANIPULATOR (NEUMANN <i>ET AL.</i>, 2016 [188]) : DAS CELLCELECTOR™-SYSTEM BESTEHT AUS EINEM MIKROMANIPULATOR (I), EINEM ROBOTERARM MIT EINER 25 UL HAMILTON-SPRITZE (III) SOWIE EINEM KAPILLARHALTER (IV), EIN MOTORISIERTER KREUZTISCH ZUR PROBENABLAGE (VII), EIN ABLAGETISCH ZUR ARRETIERUNG VON REAKTIONSGEFÄßEN SOWIE FÜR PUFFER- UND STERILISATIONSRESERVOIRE (II, VIII) UND EIN INVERTIERTES MIKROSKOP MIT EINER CCD KAMERA (V).....	40
ABBILDUNG 11: FUNKTIONSPRINZIP DER QRT-PCR (MODIFIZIERT NACH BASS <i>ET AL.</i>, 2010 [189]).	43
ABBILDUNG 12: AUFBAU DER WESTERN BLOT APPARATUR: ZWEI LAGEN IN BLOTTING PUFFER GETRÄNKTE FILTERPAPIERE WURDEN AUF DIE ANODE GELEGT. AUF DIE MIT METHANOL UND BLOTTING PUFFER ÄQUILIBRIERTE IMMUN-BLOT® PVDF-MEMBRAN WURDE DAS	

POLYACRYLAMIDGEL GELEGT. VOR DIE KATHODE WURDEN ZWEI FILTERPAPIERE, DIE IN BLOTTING PUFFER GETRÄNKT WURDEN, GELEGT.	46
ABBILDUNG 13: DIREKTE UND INDIREKTE METHODE (MODIFIZIERT NACH: HTTPS://CMRF.RESEARCH.UIOWA.EDU/IMMUNOCHEMISTRY).....	47
ABBILDUNG 14: MTT PROLIFERATIONSTEST (RISS ET AL., 2013 [192]): MTT WIRD MIT HILFE VON NADH DURCH MITOCHONDRIALE DEHYDROGENASEN ZU FORMAZAN REDUZIERT.	49
ABBILDUNG 15: MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MCF-7 ZELLEN, MCF-7/TAMR1 ZELLEN UND MDA-MB-231 ZELLEN (10X DURCHLICHT).	51
ABBILDUNG 16: IMMUNZYTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DER EPCAM, VIMENTIN UND ERA EXPRESSION IN MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLEN (VERGRÖßERUNG 20X). BLAU=DAPI FÄRBUNG, GRÜN = EPCAM UND VIMENTIN FÄRBUNG, ROT = ERA FÄRBUNG	52
ABBILDUNG 17: PROTEINEXPRESSIONSANALYSE VON ERA IN MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLEN: ALS LADUNGSKONTROLLE WURDE AKTIN VERWENDET. (OVERLAY, N=2)	53
ABBILDUNG 18: ZELLPROLIFERATION IN MCF-7 UND MCF-7/TAMR1 ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT TAMOXIFEN. DIE ZELLEN WURDEN IN DMEM MEDIUM OHNE PHENOLROT MIT TAMOXIFEN (1 UM) ODER DMSO (0,01 %) KULTIVIERT. DIE PROLIFERATION WURDE NACH DREI TAGEN MITTELS MTT-ASSAY GEMESSEN. DIE DETEKTIERTEN WERTE WURDEN ZU DMSO BEHANDELTEN ZELLEN NORMALISIERT. ***, P < 0,001 (STUDENT'S T-TEST) (N=3).....	54
ABBILDUNG 19: (A) VERGLEICH DER DETEKTIERTEN SCHWELLENWERTE (CT) DER REFERENZGENE GAPDH, UBC UND ACTB VON 1, 5 UND 10 MDA-MB-231 ZELLEN. (B) LINEARE REGRESSIONSANALYSE DER DETEKTIERTEN SCHWELLENWERTE (CT) DER REFERENZGENE GAPDH, UBC UND ACTB VON 1, 5 UND 10 NATIVEN MDA-MB-231 ZELLEN. (M=3, N=1).....	56
ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER GEMESSENEN SCHWELLENWERTE (CT<30 VS. CT>30) FÜR ACTB UND KR19 EINZELNER NATIVER MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLEN. (N=8)	57
ABBILDUNG 21: VERGLEICH DER RELATIVEN GENEXPRESSION VON EINZELZELLEN UND 5 GEPOOLTEN ZELLEN DER MCF-7, MCF-7/TAMR1 UND MDA-MB-231 ZELLINIEN MITTELS HEATMAP UND DENDROGRAM. DIE ABGEBILDETEN DATEN WURDEN AUF DEN MITTELWERT ZENTRIERT. DIE DURCHSCHNITTLICHE EXPRESSION EINES GENS BETRÄGT 0. GELBE FELDER ENTSPRECHEN EINER HOCHREGULATION DER GENEXPRESSION IM VERGLEICH ZUM MITTELWERT DES GEN-POOLS, WOHINGEGEN BLAUE FELDER EINE HERUNTERREGULATION AUFZEIGEN (SIEHE SKALA). (M=3, N=3 PRO ZELLINIE)	59
ABBILDUNG 22: VERGLEICH STATISTISCH SIGNIFIKANTER GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE VON EINZELZELL ANALYSEN UND 5 GEPOOLTEN ZELLEN DER MCF-7 UND MDA-MB-231 ZELLEN. *, P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (STUDENT'S T-TEST) (M=3, N=3 PRO ZELLINIE)	59
ABBILDUNG 23: VERGLEICH STATISTISCH SIGNIFIKANTER GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE VON EINZELZELL ANALYSEN UND 5 GEPOOLTEN ZELLEN DER MCF-7 UND MCF-7/TAMR1 ZELLEN. *** P < 0,001 (STUDENT'S T-TEST) (M=3, N=3 PRO ZELLINIE).....	60
ABBILDUNG 24: (A) SCHWELLENWERTE DER TRANSKRIBIERTEN GENE CDH2, VIM UND ACTB IN UNBEHANDELTEN MDA-MB-231 EINZELZELLEN (KONTROLLE), NACH FIXIERUNG (F), NACH PERMEABILISIERUNG (P) UND DER KOMBINATION AUS BEIDEM (FP). (B) DIE RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER VIM- UND ACTB-EXPRESSION IN MDA-MB-231 EINZELZELLEN NACH FIXIERUNG (F), PERMEABILISIERUNG (P) UND DER KOMBINATION AUS BEIDEM (FP) ZEIGT KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE IM VERGLEICH ZU DEN UNBEHANDELTEN KONTROLLEN. (ANOVA-BONFERRONI). (M=3, N=2).....	62
ABBILDUNG 25: (A) SCHWELLENWERTE DER TRANSKRIBIERTEN GENE EPCAM, ESR1 UND ACTB IN UNBEHANDELTEN MCF-7 EINZELZELLEN (KONTROLLE), NACH FIXIERUNG (F) SOWIE FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG (FP). (B) DIE RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER EPCAM- UND ACTB-EXPRESSION IN MCF-7 EINZELZELLEN NACH FIXIERUNG (F) SOWIE FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG ZEIGTE KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE IM VERGLEICH ZU DEN UNBEHANDELTEN KONTROLLEN. (ANOVA-BONFERRONI). (M=3, N=2).....	64

- ABBILDUNG 26:** (A) REPRÄSENTATIVE ZYTOKERATIN POSITIVE UND CD45 NEGATIVE MDA-MB-231 ZELLEN, DIE MITTELS CELLSEARCH®-SYSTEMS AUS DEM BLUT ANGEREICHT UND DETEKTIERT WURDEN. (B) DETEKTIERTE SCHWELLENWERTE VON CDH2, VIM UND ACTB VON EINER NATIVEN MDA-MB-231 KONTROLL-ZELLE SOWIE EINER EINZELNEN UND 5 GEPOOLTEN MDA-MB-231 ZELLEN, DIE UNTER VERWENDUNG DES CELLSEARCH® CTC KITS ANGEREICHT UND DETEKTIERT WURDEN. (C) REPRÄSENTATIVE ZYTOKERATIN POSITIVE UND CD45 NEGATIVE MCF-7 ZELLEN, DIE MITTELS CELLSEARCH®-SYSTEMS AUS DEM BLUT ANGEREICHT UND DETEKTIERT WURDEN. DAS IM VERGLEICH ZU MDA-MB-231 ZELLEN VERSTÄRKTE CD45 SIGNAL ERGIBT SICH TECHNISCH DURCH DAS STÄRKERE ZYTOKERATIN SIGNAL VON MCF-7 ZELLEN. (D) DETEKTIERTE SCHWELLENWERTE VON EPCAM, ESR1 UND ACTB EINER NATIVEN MCF-7 KONTROLL-ZELLE SOWIE EINZELNER UND 5 GEPOOLTER MCF-7 ZELLEN, DIE UNTER VERWENDUNG DES CELLSEARCH® CTC KITS ANGEREICHT UND DETEKTIERT WURDEN. 67
- ABBILDUNG 27:** (A) VERGLEICH DER GEMESSENEN SCHWELLENWERTE (Ct<30 vs. Ct>30) VON ACTB UND KR19 EINZELNER CTCs, DIE MITTELS CELLSEARCH® CTC KITS UND CELLSEARCH®-SYSTEMS ANGEREICHT WURDEN. (n=29) (B) EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER DETEKTIERTEN Ct-WERTE VON EPCAM, CK19 UND ACTB VON 8 EINZELNEN CTCs (GRAU) SOWIE 5 GEPOOLTER CTCs (SCHWARZ) EINER PATIENTIN MIT METASTASIERTEM MAMMAKARZINOM... 69
- ABBILDUNG 28:** DIAGNOSEN MIT THERAPIEVERLAUF DER PATIENTIN. DER ZEITPUNKT DER DLA MIT PROBENGEWINNUNG IST DURCH DEN ROTEN PFEIL GEKENNZEICHNET. DIE SCHWARZEN SENKRECHTEN PFEILE ZEIGEN DEN ZEITPUNKT EINER ENDOKRINEN RESISTENZ..... 71
- ABBILDUNG 29:** IMMUNZYTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DER ERA-EXPRESSION IN CTCs (VERGRÖßERUNG 40x). BLAU=DAPI FÄRBUNG, GRÜN = ZYTOKERATIN FÄRBUNG, ROT = ERA FÄRBUNG 72
- ABBILDUNG 30:** (A) VERGLEICH DER GEMESSENEN SCHWELLENWERTE (Ct<30 vs. Ct>30) VON ACTB UND KR19 EINZELNER CTCs, DIE MITTELS DLA UND PARSORTIX™-SYSTEMS ANGEREICHT WURDEN. (N=23) 73
- ABBILDUNG 31:** VERGLEICH DER GENEXPRESSIONSPROFILE EINZELNER CTCs MITTELS HEATMAP UND DENDROGRAM, DIE DURCH NUTZUNG DER DLA UND DES PARSORTIX™-SYSTEMS ANGEREICHT WURDEN. DIE ABGEBILDETEN DATEN WURDEN AUF DEN MITTELWERT ZENTRIERT. DIE DURCHSCHNITTLICHE EXPRESSION EINES GENS BETRÄGT 0. GELBE FELDER ENTSPRECHEN EINER HERAUFREGULATION DER GENEXPRESSION IM VERGLEICH ZUM MITTELWERT DES GEN-POOLS, WOHINGEGEN BLAUE FELDER EINE HERUNTERREGULATION AUFZEIGEN (SIEHE SKALA). (M=3, N=7) 74
- ABBILDUNG 32:** INTRA-INDIVIDUELLE HETEROGENITÄT EINZELNER CTCs HINSICHTLICH PHÄNOTYPISCHER (PM) UND ENDOKRINER MARKER (EM). 5 GENE WAREN UBIQUITÄRE EXPRIMIERT (+). 18 GENE ZEIGTEN EINE INTRA-INDIVIDUELLE HETEROGENITÄT (+/-). 7 MARKER KONNTEN NICHT DETEKTIERT WERDEN (-)..... 75
- ABBILDUNG 33:** VERGLEICH STATISTISCH SIGNIFIKANTER GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE VON CTC-SUBGRUPPEN. *, P < 0,05; *** P < 0,001 (STUDENT'S T-TEST) (M=3, N=6) 76
- ABBILDUNG 34:** VERGLEICH STATISTISCH SIGNIFIKANTER GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE VON ER-POSITIVEN GEGENÜBER DER ER-NEGATIVEN CTC-SUBGRUPPE. *, P < 0,05; *** P < 0,001 (STUDENT'S T-TEST) (M=3, N=7)..... 76
- ABBILDUNG 35:** VERGLEICH DER GEMESSENEN SCHWELLENWERTE (Ct<30 vs. Ct>30) VON ACTB UND KR19 EINZELNER cCTCs, DIE MITTELS DLA UND PARSORTIX™-SYSTEMS ANGEREICHT UND ANSCHLIEßEND KULTIVIERT WURDEN. (N=10)..... 77
- ABBILDUNG 36:** VERGLEICH DER GENEXPRESSIONSPROFILE EINZELNER KULTIVIERTER CTCs (cCTCs) MITTELS HEATMAP UND DENDROGRAM, DIE DURCH NUTZUNG DER DLA UND DES PARSORTIX™-SYSTEMS ANGEREICHT UND ANSCHLIEßEND KULTIVIERT WURDEN. DIE ABGEBILDETEN DATEN WURDEN AUF DEN MITTELWERT ZENTRIERT. DIE DURCHSCHNITTLICHE EXPRESSION EINES GENS BETRÄGT 0. GELBE FELDER ENTSPRECHEN EINER HERAUFREGULATION DER GENEXPRESSION IM

VERGLEICH ZUM MITTELWERT DES GEN-POOLS, WOHINGEGEN BLAUE FELDER EINE HERUNTERREGULATION AUFZEIGEN (SIEHE SKALA). (M=3, N=5).....	78
ABBILDUNG 37: INTRA-INDIVIDUELLE HETEROGENITÄT EINZELNER KULTIVIERTER CTCs HINSICHTLICH PHÄNOTYPISCHER (PM) UND ENDOKRINER MARKER (EM). 6 GENE ZEIGTEN EINE UBIQUITÄRE EXPRESSION (+). 11 GENE ZEIGTE EINE INTRA-INDIVIDUELLE HETEROGENITÄT (+/-). 13 MARKER KONNTEN NICHT DETEKTIERT WERDEN (-).....	79
ABBILDUNG 38: VERGLEICH STATISTISCH SIGNIFIKANTER GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE KULTIVIERTER CTC-SUBGRUPPEN. *, P < 0,05; *** P < 0,001 (STUDENT'S T-TEST) (M=3, N=5)	80
ABBILDUNG 39: PCA EINZELNER NICHT-KULTIVIERTER (N=7) UND KULTIVIERTER CTCs (cCTCs) (N=5).	81

ANHANG

Stadieneinteilung der Mammakarzinome

Tabelle 12: TNM: Klinische Klassifikation. T (Tumorgröße), N (Lymphknoten), M (Fernmetastasen) (modifiziert nach [29])

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ Tis (DCIS): Duktales Carcinoma in situ Tis (LCIS): Lobuläres Carcinoma in situ Tis (Paget): M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser T1 mi: Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser T1a: größer 0,1 cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser T1b: größer 0,5 cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser T1c: größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a–T4d beschrieben T4a: Ausdehnung auf Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, jedoch nicht die Pektoralismuskulatur) T4b: Ödem (einschließlich „peau d’orange“) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust T4c: Kriterien 4a und 4b T4d: Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z.B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II
N2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen N2a: Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert N2b: Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen

N3	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (Level III) mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten des Level I und II oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen des Level I und II oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna N3a: Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten N3b: Metastase(n) in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen N3c: Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 13: UICC Stadien (modifiziert nach [29]).

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1	N1mi	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Alle T	N3	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1

Gen-Panel

EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
MUC1	Mucin 1
KRT19	Keratin 19
CDH2	Cadherin 2
SNAI1	Snail family zinc finger 1
VIM	Vimentin
Twist1	Twist family HHLH transcription factor 1
ALDH	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
CD_44 all	CD44 molecule
CD24L4	CD24 molecule
Myc	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
ESR1	Estrogen receptor 1
ESR2	Estrogen receptor 2
PGR	Progesterone receptor
ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
EGFR	Epidermal growth factor receptor
VEGFR1	Fms-related tyrosine kinase 1
VEGFR2	Kinase insert domain receptor
IGFR	Insulin-like growth factor 1 receptor
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
AKT2	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
FOXO	Forkhead box O3
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
CCND1	Cyclin D1
HDAC2	Histone deacetylase 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	Actin beta
UBC	Ubiquitin C

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Arbeit wurde bisher noch nicht veröffentlicht und keiner in- oder ausländischen Prüfungsbehörde als Dissertation vorgelegt. Ebenso habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche vorgenommen.

Düsseldorf, Januar 2019

WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

Ausbildung:

03/2018 - 08/2018	Elternzeit
08/2016 - 08/2017	Physician Scientist im Rahmen des Physician Scientist Stipendiaten Programms der DSO/CCC: Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Düsseldorf
Seit 02/2016	Promotion im Rahmen des MD/PhD Programms der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Düsseldorf (Prof. Dr. Neubauer/ Prof. Dr. Fehm)
Seit 02/2016	Assistenzarzt an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
06/2015 - 09/2015	3. PJ-Tertial: Uniklinikum Düsseldorf, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Düsseldorf
02/2015 - 05/2015	2. PJ-Tertial: King Edward VIII Hospital, Obstetrics and Gynecology, University of KwaZulu-Natal, Durban, Südafrika
10/2014 - 01/2015	1. PJ-Tertial: OCDEM, Internal Medicine, University of Oxford, Oxford, England
06/2011- 06/2014	Promotion am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Prof. Dr. Baltrusch), Universität Rostock: „Die Rolle von Drp1 in der mitochondrialen Dynamik“ Abschluss: summa cum laue
10/2009 - 11/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock Abschluss: Staatsexamen

DANKSAGUNG

Recht herzlich möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Promotion in jeglicher Art und Weise unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Hans Neubauer und Frau Prof. Tanja Fehm für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für Ihre hervorragende Betreuung sowie Ihre unermüdliche Unterstützung. Ihr wertvoller akademischer Rat zu Tag und Nachtzeit, das entgegengebrachte Vertrauen, die innovativen Ideen und Vorschläge sowie die Ermöglichung der Teilnahme an mehreren Tagungen gilt es besonders zu würdigen.

Herrn Prof. Dr. Constantin Czekelius gilt großer Dank für die Unterstützung und Betreuung als Gutachter.

Ein großes Dankeschön gilt André, Marina, Franziska und Johanna. Ohne Eure Hilfestellungen, Tipps und Tricks, Ratschläge und Motivation wäre das Gelingen dieser Arbeit und eine so großartige Zeit im Labor nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die schönen Momente!

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe für Rat und Tat und die harmonische Arbeitsatmosphäre. Ich hatte eine unvergesslich schöne Zeit, die ich Euch allen zu verdanken habe und mir immer in bester Erinnerung bleiben wird. Zudem möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit mit dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika sowie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie bedanken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei der Düsseldorf School of Oncology ohne deren Unterstützung im Rahmen des Physician Scientist Programms diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Mein Dank gilt auch den Patientinnen, die trotz ihrer Krebserkrankung Blut- und Gewebeproben zur Verfügung stellen und damit die klinische Forschung erst ermöglichen.

Zudem bedanke ich mich bei meiner ehemaligen Arbeitsgruppe (Dr. Julia Schultz, Rica Waterstradt, Prof. Dr. Simone Baltrusch) des Instituts für Medizinische Biochemie und

Molekularbiologie der Universität Rostock, welche den Weg für einen wissenschaftlichen Werdegang bereits früh geebnet und gefördert haben.

Mein tiefer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und allen weiteren Personen, die mich tagtäglich mit all Ihren Kräften unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an meine Frau Sophia und unseren Sohn Louis. Ihr seid immer für mich da, unterstütz mich alltäglich und zaubert mir jeden Tag ein Lächeln auf die Lippen!