

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Expression des Androgenrezeptors (AR) auf
zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit
metastasiertem Mammakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Melissa Annabelle Neubacher
(2020)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekanin/Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Korreferentin/Korreferent: PD Dr. med. Günther Niegisch

Es bleibt einem jeden noch so viel Kraft, das auszuführen, wovon er überzeugt ist.

- Johann Wolfgang von Goethe

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Krawczyk, N., *et al.*, Determination of the androgen receptor status of circulating tumour cells in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*, 2019. 19(1): p. 1101.

Zusammenfassung

Einleitung: Das Mammakarzinom (*breast cancer* BC) ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau in Deutschland (1, 2). Trotz optimaler Therapie entwickeln ca. 30% der primären BC-Patientinnen im Verlauf Fernmetastasen und versterben daran (3, 4). Die Therapie des BC richtet sich nach klinischem Stadium, biologischen Tumoreigenschaften sowie nach dem immunhistochemischen Rezeptorstatus des Primärtumors. Um die Behandlung um weitere, zielgerichtete Ansätze zu ergänzen, werden neue therapierelevante prädiktive Faktoren beim BC dringend gesucht. Einen potentiellen Angriffspunkt stellt der Androgenrezeptor (AR) dar. Er wird in über 70% der Hormonrezeptor-positiven (HR) und bis zu 45% der *triple-negativen* Mammakarzinomen (TNBC) nachgewiesen und spielt eine komplexe Rolle in der Prognose und Entwicklung von Resistenzen gegenüber etablierten BC-Therapien.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein translationales Forschungsprojekt der DETECT Studien (www.detect-studien.de). Das DETECT Studienkonzept untersucht die Bedeutung der CTC-Phänotypisierung für die Therapieentscheidungen beim metastasierten Mammakarzinom (MBC) im Rahmen einer sogenannten *Liquid Biopsy*. Um eine CTC-basierte Therapieentscheidung zu treffen, werden die CTCs mittels *CellSearch*® anhand ihres Rezeptorprofils charakterisiert. Ziel des vorliegenden Projekts ist der Nachweis der AR-Expression auf CTCs mittels Immunfluoreszenz.

Methoden: Es wurde eine Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung des AR auf den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP für den AR-Positivnachweis und DU145 für den AR-Negativnachweis etabliert. Die Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung beinhaltet den AR-, Zytokeratin- und Leukozytennachweis. Anschließend wurden CTCs aus Blutproben von 67 MBC-Patientinnen aus der DETECT-Studie auf AR-Expression untersucht. Die CTCs wurden immunomagnetisch angereichert, mittels *CellSearch ProfileKit*® halbautomatisch aus dem Blut extrahiert und anschließend durch die *CytoSpin*-Methode auf Objektträger immobilisiert und asserviert.

Ergebnisse: Bei 37 der 67 Patientinnen (56%) konnte mindestens eine CTC im peripheren Blut detektiert werden. In 16 der 37 CTC-positiven Patientinnenproben (43%) ließ sich die AR-Expression auf CTCs nachweisen. Es zeigten sich zytoplasmatische und nukleäre AR-Expressionsmuster.

Schlussfolgerungen: In dem untersuchten Kollektiv konnte die AR-Expression auf CTCs erfolgreich nachgewiesen werden. Dieser Nachweis könnte als Grundlage zur weiteren Untersuchung des AR als potentieller prädiktiver Faktor bei MBC dienen.

Summary

Introduction: Breast cancer (BC) is the most common tumor disease in women in Germany (1, 2). Despite optimal therapy, about 30% of primary BC patients develop distant metastases in the course of the disease and die from it (3, 4). The therapy of BC depends on the clinical stage, biological tumor characteristics and the immunohistochemical receptor status of the primary tumor. In order to complement the treatment with further, targeted approaches, new therapy-relevant predictive factors are urgently sought for BC. One potential target is the androgen receptor (AR). It is found in over 70% of hormone receptor-positive (HR) and up to 45% of triple-negative breast cancer (TNBC) and plays a complex role in the prognosis and development of resistance to established BC therapies.

The present work is a translational research project of the DETECT studies (www.detect-studien.de). The DETECT study concept investigates the significance of CTC phenotyping for therapy decisions in metastatic breast cancer (MBC) in the context of a so-called liquid biopsy. In order to make a CTC-based therapy decision, the CTCs are characterized by their receptor profile using *CellSearch*®. The aim of the present project is the detection of AR expression on CTCs by immunofluorescence.

Methods: A triple immunofluorescence staining of AR on the prostate carcinoma cell lines LNCaP for AR positive detection and DU145 for AR negative detection was established. Triple immunofluorescence staining includes AR, cytokeratin and leukocyte detection. Subsequently, CTCs from blood samples of 67 MBC patients from the DETECT study were analyzed for AR expression. The CTCs were immunomagnetically enriched, extracted semi-automatically from the blood using the *CellSearch ProfileKit*® and then immobilized on slides by the *CytoSpin* method.

Results: In 37 of the 67 patients (56%) at least one CTC could be detected in peripheral blood. In 16 of the 37 CTC-positive patient samples (43%) AR expression on CTCs could be detected. Cytoplasmic and nuclear AR expression patterns were observed.

Conclusions: AR expression on CTCs could be successfully detected in the investigated collective. This evidence could serve as a basis for further investigation of AR as a potential predictive factor in MBC.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Advanced breast cancer</i> (fortgeschrittenes Mammakarzinom)
AF	Alexa Fluor
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AK	Antikörper
AR	Androgenrezeptor
AR-V7	Spleißvariante des Androgenrezeptors
BP	<i>Blocking Peptide</i>
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i> (Unterscheidungsgruppe 45)
CDK4/6	<i>cyclin-dependent-kinase 4/6</i> zyklinabhängige Kinase 4/6
CK	Zytokeratin
CRPC	<i>castration resistant prostate cancer</i> (kastrationsresistentes Prostatakarzinom)
CTC	<i>circulating tumor cell</i> (zirkulierende Tumorzelle)
Cy5	Cyanin-Farbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCIS	Duktales <i>Carcinoma in Situ</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTC	<i>disseminated tumor cell</i> (disseminierte Tumorzelle)
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
ER	<i>estrogen receptor</i> (Östrogenrezeptor)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein-isothiocyanate</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (Gonadoliberin)
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)
HR	Hormonrezeptor
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
Ki-67	Proliferationsfaktor des Mammakarzinoms
LAR	Luminaler-AR-Typ
MBC	<i>metastatic breast cancer</i> (matastasiertes Mammakarzinom)
OS	<i>overall survival</i> (Gesamtüberleben)

PFS	<i>progression-free survival</i> (progressionsfreies Überleben)
PI3K/mTOR	intrazellulärer Signalweg des Zellzyklus
PR	Progesteronrezeptor
rpm	<i>rounds per minute</i>
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i> (triple-negatives Mammakarzinom)
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine</i>
V	Verdünnungsfaktor
χ^2	Chi-Quadrat-Test

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Mammakarzinom	1
1.1.1.	Epidemiologie	1
1.1.2.	Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3.	Prognostische und prädiktive Faktoren	2
1.2.	Therapie des Mammakarzinoms.....	4
1.3.	Metastasierung des Mammakarzinoms	8
1.4.	Tumorzelldissemination	11
1.4.1.	Zirkulierende Tumorzellen beim metastasierten Mammakarzinom und das Konzept der <i>Liquid Biopsy</i>	12
1.5.	Androgenrezeptor	16
1.6.	Rolle des Androgenrezeptors beim Mammakarzinom	17
1.7.	Nachweis von AR auf zirkulierenden Tumorzellen	19
1.7.1.	Antiandrogene in der Mammakarzinomtherapie	20
1.8.	Ziele der Arbeit.....	22
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Material	23
2.1.1.	Verwendete Geräte.....	23
2.1.2.	Verwendete Materialien	23
2.1.3.	Verwendete Chemikalien	24
2.1.4.	Verwendete Kits.....	25
2.1.5.	Verwendete Puffer	26
2.1.6.	Verwendete Antikörper	26
2.1.7.	Verwendete Medien.....	27
2.1.8.	Verwendete Zelllinien	27
2.1.9.	Patientinnen und Blutproben	29
2.2.	Methoden	30
2.2.1.	Anreicherung der CTCs mittels CellSearch®	30
2.2.1.	Auswahlkriterien der Proben.....	31
2.2.2.	Methoden der Zellkultur	33
2.2.3.	Dichtegradientenzentrifugation	34
2.2.4.	CytoSpin	35
2.2.5.	Immunfluoreszenzfärbung	36
2.2.6.	Auswertung der Präparate	37
2.2.7.	Kontrollen.....	38
2.2.8.	Optimierte Immunfluoreszenzfärbung.....	40
2.2.9.	Auswahlkriterien der Zellen	42
2.2.10.	Klassifikation AR-positiver CTCs	43
2.2.11.	Statistische Auswertung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Vorexperimente der Immunzytofluoreszenzfärbung	44
3.1.1.	Ergebnisse der Probenfixierungsexperimente	44
3.1.2.	Permeabilisierungsexperimente	45
3.1.3.	Antikörperauswahl	46
3.2.	Optimiertes Färbeprotokoll.....	50
3.3.	Vergleich der klinisch-pathologischen Daten des Patientinnenkollektivs	51
3.4.	CTC Nachweis im untersuchten Patientinnenkollektiv	52
3.5.	AR-Status im untersuchten Patientinnenkollektiv	54

3.5.1.	AR-Expressionsmuster	56
3.5.2.	Zusammenfassung der AR-positiven Ereignisse.....	58
4.	Diskussion	60
4.1.	Hämatogene Metastasierung.....	60
4.2.	Androgenrezeptorstatus.....	61
4.2.1.	Die Rolle des Androgens und des AR-Status beim HR-positivem Mammakarzinom	63
4.2.2.	Die Rolle des Androgens und des AR-Status beim TNBC	65
4.1.	Fragestellungen zur Methodik.....	65
4.1.1.	EpCAM-basierte Zellanreicherung.....	66
4.1.2.	Diskussion der Zellzahl.....	67
4.1.3.	Diskussion der AR-Antikörperauswahl	69
4.1.4.	Vergleiche zur Therapie des Prostatakarzinoms	70
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	72
4.2.1.	Diskussion der Expressionsmuster.....	73
4.2.2.	Exogene Einflüsse auf die AR-Expression von CTCs	74
4.2.3.	Metastasierungsmuster der Patientinnen mit AR-positivem CTC- Nachweis	75
4.3.	Schlussfolgerungen	76
5.	Literatur- und Quellenverzeichnis	78
	Tabellenverzeichnis.....	78
	Literaturverzeichnis	81
	Danksagung	93

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr (1, 2). In Deutschland erkranken jährlich circa 70.000 Frauen (1). Mit 16,8% ist das Mammakarzinom zudem die häufigste maligne Todesursache der Frau in Deutschland (1, 2). Das Krankheitsrisiko gipfelt zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr. Über 90% der Patientinnen überleben die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung, allerdings wird bei 30% der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom trotz leitliniengerechter Behandlung im Laufe ihrer Erkrankung eine Fernmetastasierung diagnostiziert, an deren Komplikationen circa 70% in den folgenden fünf Jahren versterben (3, 5). Die Behandlungsmöglichkeiten des metastasierten Mammakarzinoms (MBC) sind limitiert, sodass stetig nach neuen potenten Zielstrukturen (*Targets*) für die Behandlung des MBC gesucht wird.

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ursache des Mammakarzinoms bleibt noch weitgehend ungeklärt, wobei die Forschung immer tiefere Einblicke in die molekulare Beschaffenheit der Tumore erlangt. Das weibliche Geschlecht, hohes Alter, genetische Disposition, positive Familienanamnese und der hormonelle Status sind Risikofaktoren, die das Auftreten des Mammakarzinoms begünstigen. Auch frühe Menarche und späte Menopause steigern das Risiko einer Brustkrebserkrankung.

Circa 5-10% der Mammakarzinome treten familiär gehäuft auf. Hier stellen die BRCA 1 und 2 (*breast cancer gene*) Mutationen die bekanntesten Risikofaktoren mit einem fünffach erhöhten Erkrankungsrisiko im Laufe des Lebens dar (6). Bei diesen Patientinnen tritt die Erkrankung wesentlich früher als bei nicht-prädispositionierten Frauen auf. Unabhängig von einer familiären Häufung erhöhen Präkanzerosen das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken (1).

1.1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren

Es konnten unterschiedliche Faktoren zur Einschätzung des Krankheitsverlaufes identifiziert werden. Hierbei muss zwischen prognostischen und prädiktiven Faktoren unterschieden werden. Die prognostischen Faktoren dienen der Abschätzung des Krankheitsverlaufs einer Patientin zu einem bestimmten Zeitpunkt, wohingegen die prädiktiven Faktoren das Ansprechen der individuellen Therapie vorhersagen.

Zu den etablierten prognostischen Faktoren beim Mammakarzinom gehören unter anderem Alter, Menopausenstatus, Tumorgroße, Nodalstatus, histologischer Tumortyp, peritumoraler Lymph- bzw. Blutgefäßeinbruch, Grading, Hormonrezeptorstatus (HR), *Human Epidermal Growth Receptor 2/neu (HER2/neu)*-Status und Proliferationsmarker wie z.B. Ki-67 oder andere (uPA, PAI-1, Genexpressionsanalysen) (7, 8). Proliferationsmarker dienen dazu, das Tumorstadium abzuschätzen und einige Tumorsubtypen zu unterscheiden.

In der Vergangenheit wurde die Prognose des Mammakarzinoms rein nach Tumorgroße und Nodalstatus beurteilt. Heutzutage werden die Tumore nach ihren biologischen Eigenschaften – hauptsächlich der Rezeptorexpression des Primärtumors - eingeteilt. Des Weiteren wurden zunehmend molekularbiologische Charakterisierungsansätze für die verschiedenen Mammakarzinom-Subtypen herangezogen. So lassen sich Mammakarzinome anhand ihrer Genexpressionsmuster in mindestens vier Subtypen unterteilen (9). Die Subtypisierung hilft bei der Therapieentscheidung, da Zusammenhänge zwischen Tumorbilologie und Therapieerfolg gefunden wurden (4, 10). Es gibt keinen offiziellen Abgleich dieser beiden Einteilungen, allerdings sind Gemeinsamkeiten im HR- Status und Proliferationsverhalten erkennbar. Diese sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zuordnung der Einteilungen nach Genexpressionsmuster und Immunhistochemie (9)

Einteilung nach Genexpressionsmuster	Einteilung nach Immunhistochemie bzw. Rezeptorstatus	Proliferationsrate Ki-67
Luminal-A-Karzinome	ER(+) und/oder PR(+)	<10%
Luminal-B-Karzinome	Geringerer ER(+) und/oder PR(+)	10-30%
Basal-like-Karzinome	ER(-), PR(-) und HER2(-)	Meist >30%
HER2 positive Karzinome Luminal/ nicht-luminal	HER2(+) ER(+)PR(+)/ ER(-)PR(-)	>30%

ER: Östrogenrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, HER2: Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor, Ki-67: Proliferationsmarker

Diese Klassifikation wird sowohl zur Einschätzung der Prognose als auch zur Prädiktion des Therapieansprechens herangezogen. So wird bei Patientinnen mit einem HR-positiven Mammakarzinom eine antihormonelle Therapie eingesetzt. Bei einem Luminal-A-Typ, welcher typischerweise mit starker HR-Expression und niedrigem Grading einhergeht, ist eine endokrine Therapie meistens ausreichend. Der Luminal-B Typ, hingegen, mit positiver HR-Expression, hohem Grading und hohem Ki-67 bedarf oft zusätzlicher Chemotherapie (11). Hiermit wird dem HR-Status eine große prädiktive Bedeutung bei der Entscheidung des Therapieschemas beigemessen.

Der Proliferationsindex Ki-67 kann therapiebegleitend Aufschluss über die Tumoraktivität geben. Allerdings konnte in großangelegten Studien noch nicht gezeigt werden, dass der molekulare Unterschied zwischen Luminal-A- und Luminal-B-Tumoren anhand des Ki-67 Wertes erkannt werden kann (9, 12, 13). Seine Bestimmung wird zwar von den aktuellen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) ohne Einschränkungen empfohlen, doch nur mit einem Evidenzlevel 5 bewertet (8, 14). Begründet liegen diese schwachen Evidenzlevel in der Subjektivität bei der Bestimmung des Proliferationsindex Ki67. Es gibt keine international standardisierte Messmöglichkeit, sodass der Proliferationsindex in unterschiedlichen Laboren stark schwanken kann (13).

Ein weiterer wichtiger Prädiktor ist der HER2-Rezeptor-Status. Der HER2- Rezeptor gehört zu den transmembranären Wachstumsfaktorrezeptoren, welche die endogenen Tyrosinkinase-Reaktionen aktivieren. Eine HER2-Überexpression führt

zu vermehrter Mitose, Inhibition von Apoptose, Neoangiogenese, Tumorzellmigration und Invasion (15). Tumoren mit einer Überexpression des HER2-Rezeptors zeigen ein aggressiveres Wachstum als Tumoren mit normalen Expressionsstärken. Bei circa 18% der primären Mammakarzinome kann eine HER2-Überexpression nachgewiesen werden (16). Die HER2-überexprimierten Tumoren bedürfen einer zielgerichteten anti-HER2-Therapie, die in der primären Situation immer und in der metastasierten Situation meistens zusammen mit einer Chemotherapie verabreicht wird (8, 14).

Tumore, die weder HR noch HER2-Rezeptor exprimieren, werden als *triple-negative* Mammakarzinome (*triple-negative breast cancer*, TNBC) bezeichnet. Patientinnen mit einem TNBC haben die schlechteste Prognose. Wegen der fehlenden Zielstrukturen, welche bei HR-positiven und HER2-positiven Tumoren als Therapietargets verwendet werden, muss bei den TNBC-Tumoren hauptsächlich auf eine Chemotherapie zurückgegriffen werden. Aktuell wird nach neuen prädiktiven Faktoren für die Mammakarzinomtherapie gesucht, vor allem in der Subgruppe der *triple-negativen* Tumore würde dies neue therapeutische zielgerichtete Ansätze ermöglichen (12).

1.2. Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms ist sehr komplex und stark von der Tumorbilogie abhängig. Grundsätzlich muss zwischen der Therapie des primären und des MBCs unterschieden werden. Die Konzepte in beiden Situationen sind ähnlich, unterscheiden sich aber essentiell in ihren Zielen. Ein primäres Mammakarzinom hat einen kurativen Therapieansatz wohingegen beim MBC das Therapieziel nicht in der Heilung besteht. Die Verlängerung des Lebens und die Verbesserung der Lebensqualität sind hier die vorrangigen Therapieziele. Beim MBC spielt nicht nur die molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchung des Primärtumors, sondern auch die genaue phänotypische Bestimmung des Metastasengewebes eine Rolle, da sich diese bezüglich der prädiktiven Faktoren voneinander relevant unterscheiden können (17-21).

Endokrine Therapie

Die Endokrine Therapie kann bei HR-positiven Tumoren eingesetzt werden. Sie basiert auf der Reduktion von im Körper frei verfügbarem Östrogen, wodurch einem HR-positiven Tumor der Wachstumsstimulus entzogen wird. Die Entscheidung für die richtige endokrine Substanz ist vom Hormonstatus der Frau abhängig. Dieser verändert sich grundlegend in der Menopause, sodass bei prä- und postmenopausalen Frauen unterschiedliche Substanzen verabreicht werden. Prämenopausal wird beim primären Mammakarzinom standardmäßig eine Therapie mit Tamoxifen, teilweise in Kombination mit einem *Gonadotropin-Releasing-Hormon* (GnRH)-Analogon empfohlen. In bestimmten klinischen Situationen können auch Aromatasehemmer empfohlen werden, allerdings stets mit GnRH-Analogon als Form der ovariellen Suppression (8, 14, 22). Postmenopausal stehen standardmäßig mehrere teils nebenwirkungsreichere Medikamente zur Verfügung. Es werden Aromataseinhibitoren *up-front* oder als Switch-Therapie sowie Reverse-Switch-Therapie mit Aromataseinhibitoren und Tamoxifen verabreicht. Die adjuvante endokrine Therapie wird als Standardtherapie für 5 Jahre oder als erweiterte Therapie für 10 Jahre je nach Risikoprofil der Patientin und der Therapieverträglichkeit empfohlen (8, 14). In der metastasierten Situation steht neben Tamoxifen, GnRH-Analoga und Aromatasehemmern ein weiterer selektiver Östrogen-Antagonist, Fulvestrant zur Verfügung (8, 14, 23). Fulvestrant wirkt als selektiver Antagonist am Östrogenrezeptor und führt zu einer Downregulierung des Östrogenrezeptors. Fulvestrant wird somit als hochpotente Substanz beim metastasierten endokrin-sensiblen Mammakarzinom eingesetzt (23). Darüber hinaus wird die Therapie um neue zielgerichtete Substanzen ergänzt. Beispielhaft dafür ist die Kombination der endokrinen Therapie mit mTOR-Inhibitoren, zyclin-abhängigen Kinase 4/6 (*cyclin-dependent kinases 4/6* CDK4/6) Inhibitoren (Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib) oder seit neuestem mit dem PIK3CA-Inhibitor Alpelisib, bei nachgewiesener PIK3CA-Mutation (24). Diese Kombinationen werden Patientinnen mit endokrin-sensiblen, HER2-negativen MBC empfohlen (8).

Chemotherapie

Eine Chemotherapie wird empfohlen, wenn das zu erwartende Rückfallrisiko wie bei Luminal-B-, HER2- und TNBC-Tumoren als hoch eingeschätzt wird. In der nicht-metastasierten Situation soll eine Chemotherapie möglichst im neoadjuvanten Setting, das bedeutet vor der operativen Therapie, verabreicht werden und besteht standardmäßig aus Anthrazyklinen, Taxanen und bei TNBC-Tumoren zusätzlich aus Platinsalzen (4, 8, 25).

Beim MBC wird möglichst auf eine Chemotherapie verzichtet, um die Lebensqualität der Patientinnen zu bewahren. Bei TNBC- und HER2-positiven Tumoren oder bei HR-positiven Tumoren mit lebensbedrohlichen Metastasen muss diese jedoch verabreicht werden. Hier stehen neben Anthrazyklinen, Taxanen und Platinsalzen weitere Substanzen wie zum Beispiel das 5-Fluoruracilanalogen Capecitabin, das Vincaalkaloid Vinorelbin und der synthetische Vertreter der Halichondrine Eribulin zur Verfügung (8).

Zielgerichtete Therapie

Bei circa einem Fünftel aller Mammakarzinome ist der HER2-Rezeptor überexprimiert (19). Dies führt zwar zu einem aggressiveren Wachstum des Tumors, ermöglicht aber den therapeutischen Ansatz der Anti-HER2-Medikamente. Es gibt unterschiedliche Substanzen, die sich gegen die HER2-Rezeptorfamilie richten. Trastuzumab bindet den HER2-Rezeptor, Pertuzumab blockiert die Dimerisierung des HER2-Rezeptors und Lapatinib inhibiert die Signaltransduktion mittels Blockade der Tyrosinkinase. Der Konjugatwirkstoff Trastuzumab-DM1 ermöglicht eine spezifische Zytostatikawirkung an HER2-positiven Zellen und verbessert das Nebenwirkungsprofil. Diese Kombinationstherapien ermöglichen auch bei einer Therapieresistenz nach einer Monotherapie mit Trastuzumab eine Fülle an Therapieeskalationen.

Eine weitere zielgerichtete Substanz in der Therapie des Mammakarzinoms stellt der Angiogenesehemmer Bevacizumab dar. Bevacizumab wird bei metastasierten *triple-negativen* oder HR-positiven/HER2-negativen Tumoren in Kombination mit der Erstlinien-Chemotherapie empfohlen (8).

Zu den neuen zielgerichteten Therapien gehören, wie oben erwähnt, die mTOR-Inhibitoren. Das Rapamycin-Analogon Everolimus hemmt das Enzym mTOR, was zu einer Verminderung der Zellproliferation, Angiogenese und verstärkten Apoptose führt (8, 26).

Bei den bereits oben erwähnten CDK4/6-Inhibitoren handelt es sich um Hemmstoffe, die den Zellzyklus und die Zellproliferation beeinflussen. Sie sind seit 2017 als Therapeutika für das HR-positive, HER2-negative, MBC unabhängig vom Menopausenstatus zugelassen (8, 27).

Beim HR-positiven, HER2-negativen MBC und einer nachgewiesenen PIK3CA-Mutation stellt der PIK3CA-Inhibitor Alpelisib eine neue Therapieoption dar. Im Mai 2019 wurde Alpelisib für diese Indikation von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Der Mutationsnachweis kann im Tumorgewebe oder anhand der Analyse der *Liquid Biopsy* (CTC, ctDNA) erfolgen. Dies ist die erste Medikamentenzulassung in der Mammakarzinomtherapie anhand einer *Liquid Biopsy* Analyse. Die Zulassung in Deutschland wird erwartet.

Antiresorptive Therapie

Bei der Behandlung von Knochenmetastasen werden Bisphosphonate und Denosumab eingesetzt. Bisphosphonate wirken dem Knochenabbau durch Osteoklasten entgegen. Sie werden von den Osteoklasten aufgenommen, welche dann zu Grunde gehen. Denosumab stellt einen monoklonalen Anti-RANKL-Antikörper dar (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*). Er beeinflusst die interzelluläre Signaltransduktion von Osteoklasten und Osteoblasten. Er wird beim MBC zur Reduktion skelettaler Komplikationen, Knochenschmerzes und Hyperkalzämie empfohlen (8, 14, 27).

1.3. Metastasierung des Mammakarzinoms

Die Metastasierung ist ein bis jetzt nicht gänzlich geklärter Prozess. Zellen aus einem Primärtumor bewegen sich durch den Körper, um sich außerhalb des Ursprungsgewebes einzunisten und einen weiteren Tumor, eine Metastase, zu entwickeln. Für die Mortalität des Mammakarzinoms ist nicht der Primärtumor, sondern die Komplikationen der Metastasen ursächlich. Studien zufolge kommt es bei circa 25-30% der ursprünglich metastasenfrenen Mammakarzinompatientinnen im Laufe der Erkrankung, trotz adäquater Therapie, zur Fernmetastasierung welche sich am häufigsten in Knochen (65%), Leber (60%), Lunge (65%) und zentralem Nervensystem (20%) manifestiert (3, 5, 17, 28).

Fernmetastasen können sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch von dem ursprünglichen Primärtumor unterscheiden (29). Diese Unterschiede beziehen sich auch auf prädiktive Faktoren wie Östrogenrezeptor- (ER), Progesteronrezeptor- (PR) oder HER2-Status, sodass sie direkte therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen können (10, 29). Aus diesem Grund wird bei neu aufgetretener Metastasierung oder ggf. bei Progress der Erkrankung eine histologische Sicherung der Metastase und somit auch eine immunhistochemische Charakterisierung des Tumorgewebes empfohlen, um die systemische Therapie entsprechend anpassen zu können (8). Die bioptische Sicherung stellt einerseits einen invasiven Prozess dar, andererseits ist die Gewinnung von repräsentativen Biopsien oft technisch schwierig oder abhängig von der Lokalisation sogar unmöglich.

Metastasierungsmodelle

Um den Prozess der Metastasierung des Mammakarzinoms zu erklären werden derzeit zwei konkurrierende Modelle genutzt.

Im linearen Erklärungsmodell wird davon ausgegangen, dass sich eine Stammzelle im primären Tumorgewebe durch Mutationen zum Zellklon entwickelt und sich ungehindert vermehrt. Im fortgeschrittenen Tumorstadium wird sie Zellen hervorbringen, welchen der Eintritt in die Blutbahn gelingt. Diese Zellen besitzen ein Metastasierungspotential und lösen sich aus dem Primärtumor, um im Folgenden im Sekundärgewebe durch ungehemmtes Wachstum eine Metastase zu entwickeln. Zellen, die sich aus einer Metastase lösen, können im Folgenden dann weitere Metastasen entwickeln (30).

Diesem linearen Erklärungsansatz steht das Model der parallelen Tumorentwicklung entgegen. Hierbei wird davon ausgegangen, dass sich Zellen bereits in sehr frühen Stadien aus dem Primärgewebe lösen können und in die Blutbahn gelangen. Sie nisten sich in das sekundäre Gewebe ein und können sich dort unabhängig vom Primärtumor und häufig viele Jahre nach seiner chirurgischen Beseitigung zu einer Metastase entwickeln. Die starken geno- und phänotypischen Unterschiede zwischen dem Primärtumor und der Metastase weisen auf eine frühe Streuung der Tumorzellen hin (30, 31).

In 30% der M0-Patientinnen lassen sich DTC im Knochenmark und bei 10-40% CTC im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nachweisen, welche nach dem Erklärungsansatz des *parallel progression model* die Ursprungszellen der Spätmetastasen sein können (30, 32, 33). Diese beiden Metastasierungswege werden in der Abbildung 1 gegenübergestellt.

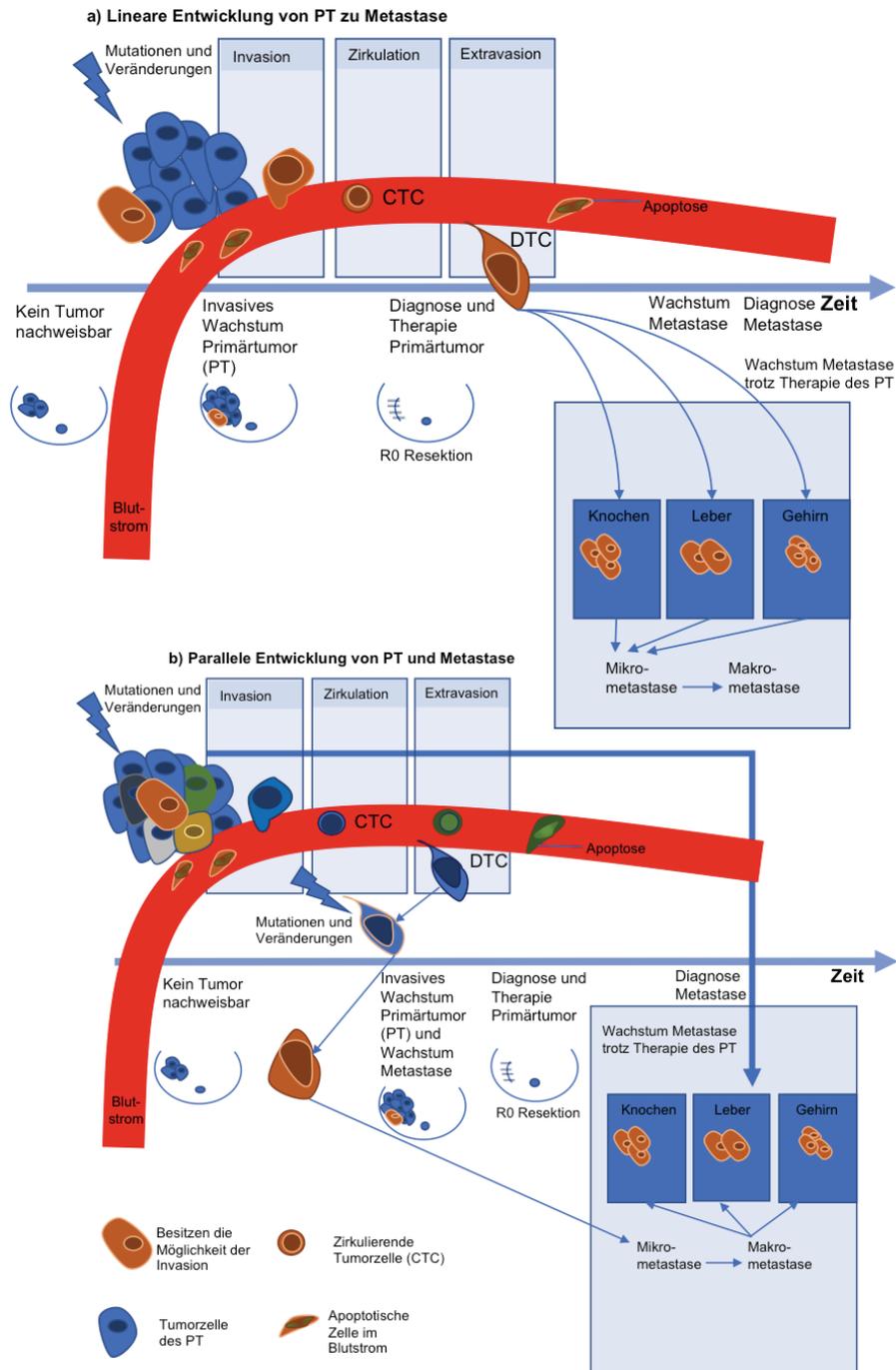


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Metastasierungsprozesse

Die Abbildung stellt a) die lineare Entwicklung aus einem Primärtumor (PT) zu einer Metastase und den Vergleich zu b) der parallelen Entwicklung von PT und Metastase dar. In a) ist es möglich, dass die Zellen, die die hämatogene Metastasierung überleben einen unterschiedlichen Geno- und Phänotypen als der Großteil der Zellen des PT exprimieren. In b) entwickeln sich die Zellen des PT und die Zellen der Metastase unabhängig voneinander. Der Geno- und Phänotyp des PT und der Metastase sind unterschiedlich. Der Verlauf von Invasion, Zirkulation und Extravasation der Tumorzellen ist in beiden Modellen gleich. Viele der Tumorzellen, die in die Blutbahn gelangen, werden durch Scherkräfte des Blutes zerstört. Bei b) der parallelen Entwicklung lösen sich die Zellen, die später für die Metastase verantwortlich sind, noch bevor der solide Tumor in der Brust nachweisbar ist, ggfs. sind bereits Vorstufen im Sinne eines DCIS nachweisbar. Bei der linearen Entwicklung wird davon ausgegangen, dass sich die Zellen erst von einem invasiven PT einer gewissen Größe lösen. (PT: Primärtumor CTC: zirkulierende Tumorzelle; DTC: disseminierte Tumorzelle)

1.4. Tumorzell dissemination

Die hämatogene Streuung von Tumorzellen bei soliden Tumoren ist ein seit langem bekanntes Phänomen und spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Metastasierung (34). Der Primärtumor gibt täglich Tausende von Tumorzellen in die Blutbahn ab, die dann zum großen Teil durch das Immunsystem oder durch Scherkräfte in den Blutgefäßen vernichtet werden (35-37). Manche CTCs gehen allerdings nicht zugrunde und können nach Extravasation als DTCs in den sogenannten „*secondary sites*“ wie dem Knochenmark persistieren (38-40). Die klinische Bedeutung von CTCs und DTCs ist stark von der Krankheitsituation abhängig. Bei den primären Mammakarzinompatientinnen gelten die DTCs und CTCs als Surrogatmarker einer minimalen residualen Tumorerkrankung (minimal residual disease, MRD), bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen spiegeln sie die systemische Tumorlast wider (41-43).

Disseminierte Tumorzellen können im Knochenmark von 30-40% der primären Mammakarzinompatientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose detektiert werden und stellen einen unabhängigen prognostischen Marker sowohl in Bezug auf das krankheitsfreie als auch auf das Gesamtüberleben dar (38). Zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut stellen mit 22% (mindestens 1 CTC in 30ml Blut) in der adjuvanten Situation ein selteneres Ereignis dar (40). Es konnte mittlerweile auch in der primären Situation die prognostische Signifikanz von CTCs demonstriert werden (40, 44). Es wird vermutet, dass DTCs und/oder CTCs, die in der primären Situation detektiert werden, für die spätere Metastasierung verantwortlich sind (45). Gleichzeitig entwickelt nur jede zweite Patientin mit nachweisbaren Tumorzellen in Blut oder Knochenmark Fernmetastasen (38), sodass neben dem reinen Nachweis dieser Zellen deren weitere Differenzierung für die Risikoeinschätzung der Patientinnen entscheidend ist. Viele Studien, die sich mit der Charakterisierung von Tumorzellen beschäftigt haben, konnten zeigen, dass die von den Fernmetastasen und dem Primärtumor bekannte Diskrepanz des Phäno- und Genotypes auch zwischen dem Primärtumor und den Tumorzellen beobachtet werden kann (18, 19, 44, 46-50). Wenn sich diese Zellen durch ihre veränderte Tumorbilologie der systemischen Therapie entziehen und in den sogenannten „*secondary sites*“ persistieren, können sie sich dort auch nach vielen Jahren zu einer Metastase mit einer gegebenenfalls veränderten Tumorbilologie entwickeln (51).

1.4.1. Zirkulierende Tumorzellen beim metastasierten

Mammakarzinom und das Konzept der *Liquid Biopsy*

CTCs können bei einem großen Anteil der metastasierten Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden (52, 53). In Tabelle 2 sind die vorliegenden Daten schematisch zusammengestellt. Dabei wurde ursprünglich vermutet, dass der Nachweis einer CTC eine schlechtere Prognose für die Progression der Metastasierung mit sich bringen würde (54). Cristofanilli *et al.* konnten hingegen darstellen, dass sowohl Progressionsfreies Überleben (*progressionfree survival* PFS) als auch Gesamtüberleben (*overall survival* OS) von MBC-Patientinnen davon abhängen, ob in 7,5ml Vollblut bei Diagnose der Erkrankung und beim ersten *Follow-Up* mehr als 5 CTCs nachweisbar sind (55). Die Quantifizierung der CTCs wird halbautomatisch von dem *CellSearch®* System übernommen. Dieses System zur Detektion von CTCs wurde als einziges von der *FDA* zugelassen (52). Der prognostische Wert der CTC-Detektion beim MBC mit dem Cut-off- Wert von 5 CTCs in 7,5ml Blut wurde daraufhin in mehreren Studien bestätigt (52, 56-61) (Tabelle 2).

Tabelle 2 Daten zum Einfluss von CTCs im MBC

Autor	Quelle	Patienten- anzahl	Patientinnen mit ≥5 CTCs in 7,5ml Blut in %	Prognostische Relevanz
Bidard, 2014	(52)	1944	47	PFS, OS
Smerage, 2014	(57)	564	51	PFS, OS
Giordano, 2012	(58)	517	40	PFS, OS
Wallwiener, 2013	(59)	486	42	PFS, OS
Pierga, 2012	(60)	267	44	PFS, OS
Giuliano, 2011	(56)	235	40	PFS
Nakamura, 2010	(61)	107	37	OS

Alle Publikationen nutzten das CellSearch® System, Untersucht wurden das progressionsfreie Überleben (*progressionfree survival* PFS) und Gesamtüberleben (*overall survival* OS) (42); CTC: zirkulierende Tumorzellen; ml: Milliliter

Aktuell wird das Therapieansprechen beim MBC leitliniengerecht mit der Hilfe bildgebender Verfahren beurteilt. Allerdings waren in der Studie von Budd *et al.* die hohen CTC-Zahlen auch ohne Progress in der Bildgebung mit einem reduzierten OS assoziiert, sodass sich CTCs nicht nur zur Einschätzung der Prognose sondern auch zum Therapiemonitoring beim MBC eignen (62).

Neben der reinen Detektion von CTCs/DTCs spielt auch deren Charakterisierung eine große Rolle. Es gibt Hinweise, dass die CTCs beim MBC zum einen die Tumorlast und zum anderen den Phäno- und Genotyp des derzeit dominierenden Tumorzellklons am besten widerspiegeln (63-65). Gleichzeitig setzen alle CTC-Detektionsmethoden nur eine Blutabnahme voraus. Dies stellt eine minimal-invasive Möglichkeit der Probengewinnung dar, die sogenannte *Liquid Biopsy*, kaum vergleichbar mit einer Stanzbiopsie aus dem Primärtumor oder mit einer Biopsie schwer zugänglicher Metastasen (41). Die CTC-Analyse ermöglicht somit eine Aussage über die molekularen Veränderungen der Tumorerkrankung während der Metastasierung, wie zum Beispiel die Expression von Proteinen, welche durch eine zielgerichtete Therapie angegriffen werden können. Unter Zuhilfenahme der CTCs könnten so Therapieentscheidungen enghaschiger angepasst und optimiert werden (66). Dieses CTC-basierte Therapiemanagement konnte in experimentellen Studien bestätigt werden, indem HER2-positive CTCs bei Mammakarzinompatientinnen mit einer Trastuzumab-Therapie eradiziert werden konnten (63-65). Um die Relevanz des CTC-basierten Therapiemanagements bei MBC zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren mehrere klinische Studien initiiert. Diese Studien werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Aktuelle Studien zur CTC-basierten Therapieentscheidung in der Mammakarzinombehandlung

Studie	Einschlusskriterien	Intervention
SWOG S0500	CT-resistent, CTC positives mBC	Klinisch-bildmorphologische ThE vs. CTC basierte ThE
CirCe01	CT-resistent, CTC positives mBC	Klinisch-bildmorphologische ThE vs. CTC basierte ThE
STIC-CTC	HR+HER2- mBC	Klinische Entscheidung vs. CTC basierte Entscheidung für ET/CT
DETECT III	HER2- mBC HER2+ CTC	Standardtherapie ± Lapatinib
DETECT IV	HER2- mBC HER2- CTC	ET + Everolimus (IVa) / Eribulin (IVb)
DETECT V/ CHEVENDO	HR+HER2+ mBC	Duale HER2-Blockade + ET vs. Duale HER2-Blockade + CT
NCT01975142	HER2- mBC HER2+ CTC	Trastuzumab + Emtansin (T-DM1)
NCT01185509	HER- mBC HER+ CTC	Trastuzumab + Vinorelbin
COMETI-P2	HR+HER2- mBC ET- erfahren	Klinische Entscheidung vs. CTC basierter ETI um ET Versager frühzeitig zu erkennen

CTC: zirkulierende Tumorzellen; CT: Chemotherapie; ET: Endokrine Therapie; HR: Hormonrezeptoren; mBC: metastasiertes Mammakarzinom, „-“: negativ, „+“: positiv; ThE: Therapieentscheidung; ETI- endocrine therapy index (einfließend: HR; HER2; Bcl2; Ki67); vs.: versus

Während die prognostische Relevanz der CTCs in der metastasierten Situation mit hoher Evidenz bestätigt wurde, ist die prädiktive Aussagekraft der CTC-Dynamik unter der Therapie weniger eindeutig. In der SWOG S0500 Studie von Smerage *et al.* ließ sich der CTC-basierte Wechsel von Erstlinien- auf Zweitlinien-Chemotherapie nicht mit einer Verbesserung des Überlebens vereinbaren (52, 57, 67). Dieses Ergebnis legt nahe, dass persistierende hohe CTC-Zahlen unter einer Chemotherapie eine Identifikation von chemotherapieresistenten Patientinnen ermöglichen, welche grundsätzlich von neuen zielgerichteten Therapieansätzen profitieren könnten. Die Suche nach solchen neuen Zielmolekülen in der Therapie des MBC hat derzeit eine enorme klinische Relevanz.

Die diagnostische und prädiktive Relevanz von CTCs wird derzeit im Rahmen weiterer Studien untersucht, beispielsweise die CirCe01 und die DETECT Studien (Vgl. Tabelle 3). Bei der CirCe01 wird die Therapieentscheidung von der CTC-Zahl abhängig gemacht. Die Chemotherapie wird bei „Nichtansprechen“ der CTCs nach zwei Zyklen gewechselt. Bei der DETECT-Studienfamilie handelt es sich um die Studie mit dem größten Patientinnenkollektiv, in welcher CTCs von MBC-Patientinnen bestimmt und nach ihrer HER2-Rezeptorexpression charakterisiert werden. Je nach CTC-Status und HER2-Status der CTCs werden die Patientinnen in die unterschiedlichen Studienarme eingeschlossen. Damit wird nicht nur eine quantitative, sondern auch eine qualitative Analyse der CTCs durchgeführt. Darüber hinaus beinhaltet die DETECT-Studienfamilie parallel unterschiedliche translationale Forschungsprojekte, welche noch tiefere molekulare und zytologische Erkenntnisse über CTCs liefern. Der translationale Forschungsteil der Studie verspricht neue Möglichkeiten der *targeted therapy* um die Behandlung des Mammakarzinoms noch weiter zu individualisieren. Das klinische Studiendesign der DETECT Studien ist in Abbildung 2 dargestellt.

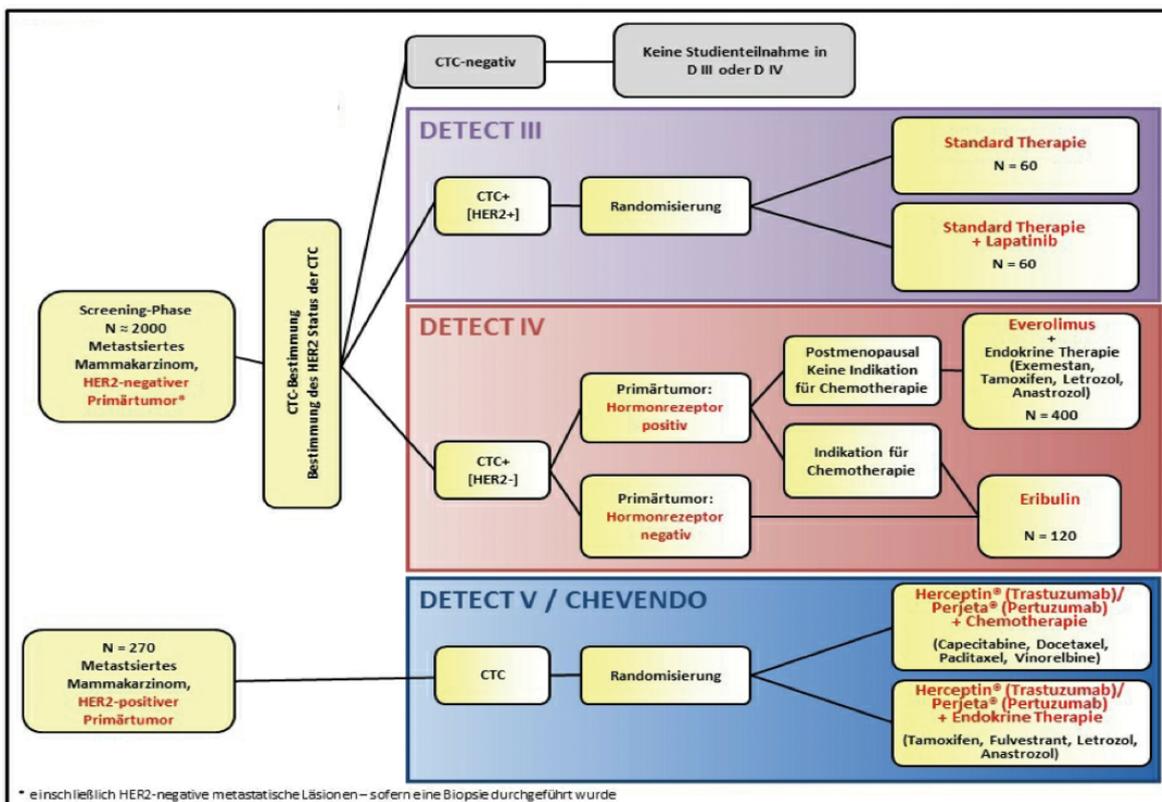


Abbildung 2 DETECT Studienkonzept (Quelle: www.detect-studien.de)

1.5. Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zur Steroidrezeptorfamilie. Die Rezeptoren dieser Familie sind im inaktivierten Zustand im Zytoplasma gelöst. Um sie vor Proteolysen zu schützen binden Hitzeschock-Proteine an die Rezeptoruntereinheiten. Mit Bindung von Androgen im Zytoplasma wird die Dimerisierung der AR-Untereinheiten, der Transport in den Kern, sowie die Transkription abhängiger Gene reguliert. Im Promotorbereich dieser Gene binden die Rezeptoruntereinheiten – in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren - an das *responsive element*. Der AR kann außerdem direkt an Transkriptionsfaktoren binden und diese aktivieren. Diese Transkriptionsfaktoren können sowohl aktivierende als auch inhibierende Wirkung haben (68, 69).

Der AR ist aus mehreren Funktionseinheiten aufgebaut. Er besitzt eine *ligand binding domain* (LBD, am C-Terminus) sowie eine *DNA binding domain* (DBD, am N-Terminus). Diese sind durch eine *hinge region* verbunden. Die DBD besitzt zwei Zinkfingerstrukturen, welche an die DNA binden können (69). Somit repräsentiert der AR mit seiner Morphologie und seiner Funktionsweise einen klassischen Steroidrezeptor. Der Aufbau des AR und einer seiner Spleißvarianten wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Bei einer Spleißvariante wird aus dem gleichen DNA Abschnitt eine veränderte Proteinstruktur konfiguriert. Im Fall des Androgenrezeptors entsteht eine Spleißvariante ohne LBD.

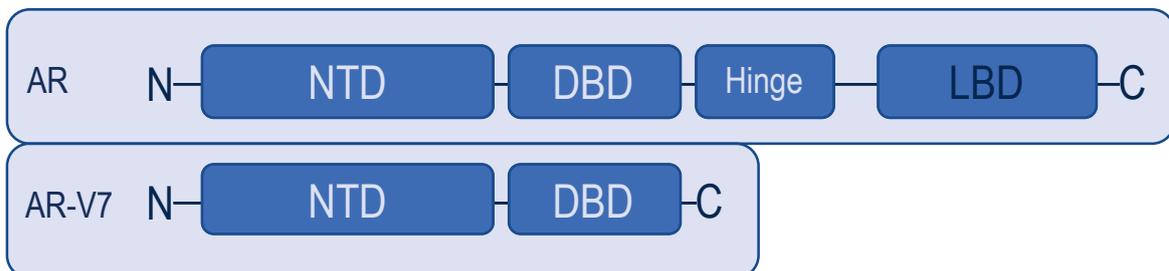


Abbildung 3 Schematischer Aufbau des Androgenrezeptors und der Spleißvariante V7

Der Androgenrezeptor (**AR**) besteht aus vier Untereinheiten der Domäne des Aminoendes (**NTD** Exon 1), der DNA bindende Domäne (**DBD** Exon 2-3), der *Hinge* Region, die die Verbindung der DBD und LBD darstellt (Exon 4) und der Liganden bzw. Hormon-bindende Domäne (**LBD** Exon 5-8). Bei der Spleißvariante 7 (**AR-V7**) fehlt die LBD. Der N- und der C-Terminus der Spleißvariante AR-V7 und der ungespleißten Variante unterscheiden sich nicht. Modifiziert nach Agoulnik et al (69)

(DBD- *DNA binding domain*, AR Androgenrezeptor, LBD- *ligand binding domain*, NTD – *nitrogen binding domain*)

1.6. Rolle des Androgenrezeptors beim Mammakarzinom

Die AR-Expression beim Mammakarzinom ist ein schon seit den 1950er Jahren bekanntes Phänomen. Studien zufolge kann der AR auf bis über 70% der HR-positiven und bis zu 43% der *TNBC* nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4 Übersicht der veröffentlichten Daten zur AR-Expression in unterschiedlichen Patientinnenkohorten

Studie	Patientinnenanzahl	AR-Expression in allen BC-Typen	AR-Expression in <i>TNBC</i>	Cut-Off Werte (Positiv)
Isola, 1993 (70)	76	79%	n.d.	>20% der Zellkerne
Ogawa, 2008 (71)	227	62,6%	42,9%	≥10% der Zellkerne
Park, 2010 (72)	413	72,9%	35%	≥10% der Zellkerne
Park, 2011 (73)	931	58,1%	13,5%	≥10% der Zellkerne
Loibl, 2011 (74)	673	53,2%	21,6%	Remmele Score >1
Hu, 2011 (75)	1467	78,7%	37%	≥1% der Zellkerne
Collins, 2011 (76)	1705	77%	32%	≥10% der Zellkerne
Thike, 2013 (77)	699 *	n.d.	38% ¹⁾ 54% ²⁾	¹⁾ ≥1% der Zellkerne ²⁾ >10% der Zellkerne
McNamara, 2013 (78)	203 *	n.d.	25%	>10% der Zellkerne
Choi, 2015 (79)	492 *	n.d.	17,7%	≥1% der Zellkerne
Liu, 2018 (80)	188 *	n.d.	21,8%	≥1% der Zellkerne

* Patientinnenkohorte nur mit *TNBC*; n.d. nicht detektiert BC: *Breast Cancer* *TNBC*: *triple-negative breast cancer*

Alle Ergebnisse wurden mit immunhistochemischen Gewebeanalysen des Primärtumors erhoben.

Ursprünglich schien es, dass eine hohe AR-Expressionsrate und hohe Androgenspiegel im Blut einen protektiven Einfluss auf Mammakarzinompatientinnen haben (81). Den aktuellen Studien zufolge, scheint die Rolle der Androgene und des AR beim Mammakarzinom stark vom Tumorsubtyp abzuhängen (82).

Bei einer Koexpression von AR und ER konnte eine verbesserte Prognose unter den HR-positiven Tumoren beobachtet werden (81, 83, 84). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der AR das *estrogen-response element* blockiert,

sodass ER für Östrogene eingeschränkt zugänglich und der Proliferationsimpuls unterbunden ist (81). Auch die endokrine Therapie im Sinne einer ER-Suppression hat einen Einfluss auf die AR-Signalwege. Die AR-Signaltransduktion führt zu einer verstärkten ER-Expression, somit kann die Bestimmung der AR-Expression im Primärtumor weitere wichtige Informationen zur Therapieplanung liefern (85). Die AR-Überexpression kann ein Grund für eine Tamoxifenresistenz bei HR-positiven Tumoren sein. Im Zellkulturrexperiment ließ sich durch Überexpression von AR eine Tamoxifenresistenz und bei Hinzunahme von Antiandrogenen eine erneute Tamoxifensensibilität erzielen (83, 86). Diese Daten legen nahe, dass sich die Rolle des AR nicht auf eine Prognoseabschätzung beschränkt, sondern maßgeblich in die Wirkprinzipien der etablierten Therapien hineinspielt (86, 87).

Die Daten zu AR-positiven *TNBCs* sind widersprüchlich. Einerseits konnte ein verbessertes PFS sowie OS über 5 Jahre, geringere Tumorstadien, eine höhere Differenzierung mit besserem Grading und eine geringere Proliferationsrate nachgewiesen werden. Andererseits wurden größere Tumoren mit vermehrtem Lymphknotenbefall detektiert. Bei Patientinnen mit AR-positiven *TNBCs* lassen sich weniger Todesfälle beobachten als in der Gesamt-*TNBC*-Kohorte (73, 88-93). Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse sind sich die Autoren einig, dass es sich beim AR um eine vielversprechende potenzielle Struktur für eine zielgerichtete Therapie, vor allem beim *TNBC* vom sogenannten luminalen AR-Typ (LAR), handelt (Vgl. Tabelle 1). Dieser Tumortyp spricht weniger gut auf Chemotherapie an und gilt als weniger aggressiv als andere Vertreter unter den *TNBC*, sodass man davon ausgeht, dass die Patientinnen mit diesem Tumorsubtyp stark von einer AR-zielgerichteten Therapie profitieren würden (81, 84, 87, 88, 94-97). Somit stellt der AR ein neues potentiell Target in allen Subtypen der Brustkrebsbehandlung dar.

1.7. Nachweis von AR auf zirkulierenden Tumorzellen

Der AR konnte bereits auf CTCs des Prostatakarzinoms nachgewiesen werden (98-101). Die Erkenntnisse der Prostatakarzinomforschung konnten für die Untersuchungen zum MBC genutzt werden. Dabei wurden unterschiedliche Verfahren zum CTC Nachweis genutzt. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht einer Auswahl an Arbeiten, die sich mit der Etablierung der AR-Expression auf CTCs beschäftigten (Tabelle 5).

Tabelle 5 Auswahl an Studien zur Detektion des AR bzw. der AR-V7-Spleißvariante auf CTCs des metastasierten Mammakarzinoms bzw. Prostatakarzinoms

	Primärtumor	CTC- positive Patienten- proben	Detektionsmethode	Mind. Eine AR- positive CTC
Aceto, et al. (2018) (94)	MBC	22	CTC iChip; cRNA AR-V7-Spleißvariante	41%
Fuji, et al. (2017) (102)	MBC	51	CTC; IF + Single Cell Sequencing	20%
deKruijff, et al. (2019) (103)	MBC	119	CellSearch, CTC und cDNA	31%
Reyes, et al. (2014) (98)	mCRPC	10	FACS; IF	100%
Crespo, et al. (2015) (99)	mCRPC	80	CellSearch, IF	64%
Antonarakis, et al. (2017) (101)	mCRPC	149	AdnaTest, mRNA Expression auf CTC, AR-V7-Spleißvariante	17,8%
Sharp, et al. (2019) (100)	mCRPC	182	CellSearch; RNA AR-V7-Spleißvariante	47%
Krawczyk, Neubacher et al. (2019) (104)	MBC	37	CellSearch CTC IF	43%

IF: Immunfluoreszenz, CTC: zirkulierende Tumorzelle, AR: Androgenrezeptor; mBC: metastasiertes Mammakarzinom, cRNA: zirkulierende RNA, FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter - Durchflusszytometrie; mCRPC: metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom

1.7.1. Antiandrogene in der Mammakarzinomtherapie

Antiandrogene kommen aus der Prostatakarzinombehandlung und wurden ursprünglich hierfür entwickelt. CTCs, ihre AR-Expression und ihre molekulare Beschaffenheit werden auch im Prostatakarzinom in Modellen zur Erklärung der Metastasierung herangezogen. Bei der Behandlung sogenannter kastrationsresistenten Prostatakarzinome (CRPC) mit Antiandrogenen lässt sich häufig im Verlauf der Therapie eine AR-Resistenz auf Antiandrogene beobachten, anhand der Charakterisierung von CTCs lässt sich diese Resistenz vorhersagen (105).

Die antiandrogenen Substanzen wurden verhältnismäßig schnell *in vitro* und im Tierexperiment auf ihre Wirksamkeit bei Mammakarzinomen geprüft und in kleinen Studien getestet (106-108). Die Medikamente fungieren als Androgenantagonisten, dabei ist Bicalutamid das älteste Agens der Gruppe und Enzalutamid sein fünffach potenterer Nachfolger. Hier konnte beispielweise beobachtet werden, dass sich die Proliferation, das Wachstum, die Migration und Invasion unter gleichzeitiger Steigerung der Apoptoseaktivität in TNBC-Zelllinien unter Bicalutamid reduzierte (109). Beide Medikamente, sowie weitere antiandrogen wirkende Substanzen werden zurzeit in mehreren Studien mit MBC-Patientinnen getestet und zeigen zum Teil vielversprechende Ergebnisse mit klinischen Response-Raten von 19 bis 25 % (110). Dabei wird in keiner der aktuell laufenden Studien ein CTC-basiertes Therapiemonitoring durchgeführt. Die aktuelle Studienlage wird in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der klinischen Studien zur Antiandrogenen Therapie nach Mina, et al. (104)

Studie	Status	Einschlusskriterien	Behandlung
NCT00468715 (Phase II) 1	Aktiv, keine Rekrutierung	AR+/HR- mBC	Bicalutamid
NCT01889238 (Phase II) 1	Aktiv, keine Rekrutierung	AR+/ TN mBC	Enzalutamid
ENDEAR trial NCT02929576 (Phase III)	Zurückgezogen	TN mBC	Enzalutamid vs Paclitaxel vs Kombination
NCT02750358 (Phase II) 1	Rekrutierung	AR+ / TN ESBC	Enzalutamid
NCT02689427 (Phase IIb) 1	Rekrutierung	AR+ / TN ESBC	Enzalutamid plus Paclitaxel in Neodajuvanz
NCT02007512 (Phase II) 2	Aktiv, keine Rekrutierung	HR+ HER2- mBC	Exemestan +/- Enzalutamide
NCT02463032 (Phase II) 2	Aktiv, keine Rekrutierung	ER+/AR+ mBC	GTx-024 (Enobosarm) SARM 9 vs. 18 mg.
NCT01990209 (Phase II) 1	Rekrutierung	HR+/AR+ or TN /AR+ mBC	TAK-700 (orteronel) CYP17A1-Inhibitor
NCT02067741 SAKK21/12 (Phase II) 1	Aktiv, keine Rekrutierung	HR+/HER2- or TN/ AR+ mBC	transdermaler CR1447 (4-OH-testosterone)
NCT02091960 (Phase II) 1	Aktiv, keine Rekrutierung	HER2 + /AR + mBC	Enzalutamide + Trastuzumab

¹ nicht randomisiert 2 randomisiert AR: Androgenrezeptor, TN: triple negative ER: Östrogenrezeptor PR: Progesteronrezeptor HR: Hormonrezeptor, HER2: Human epidermal growth factor 2 ESBC: early stage breast cancer SARM: selective androgen receptor modulator, mBC: metastatic breast cancer

1.8. Ziele der Arbeit

Im folgenden Projekt soll die Expression des AR auf CTCs im MBC untersucht werden. Der AR ist eine vielversprechende Zielstruktur für eine potenzielle *targeted therapy* zur Therapie des MBC. CTCs ermöglichen einen Einblick in die Prozesse der hämatogenen Metastasierung. Es handelt sich bei dieser Arbeit um ein translationales Forschungsprojekt im Rahmen der DETECT III/IV-Studien. Dabei werden CTCs aus Blutproben, sogenannten *Liquid Biopsies*, extrahiert, um sie anschließend zu charakterisieren (19, 59, 66). Die CTCs beim MBC scheinen den Phänotyp des Tumors am besten widerzuspiegeln. Sie können als etablierte Prognosefaktoren, sowie potentielle Prädiktoren für neue zielgerichtete Therapien dienen (41, 111).

Die TraFo-Proben werden mittels Immunfluoreszenz angefärbt und mikroskopisch untersucht. Hierbei wird jede CTC anhand ihrer AR-Signalstärke charakterisiert. Die Ergebnisse der experimentellen Charakterisierung der CTCs anhand des AR soll danach mit den klinikopathologischen Daten der Studienteilnehmerinnen verglichen werden.

In diesem Kontext wurden die Ziele dieser Arbeit wie folgt definiert:

1. Etablierung einer Immunfluoreszenz Dreifachfärbung zur Bestimmung des AR-Status auf CTCs
2. Nachweis der AR-Expression auf CTCs beim MBC in einer Probenkohorte aus der DETECT III und IV Studie
3. Auswertung der Färbedaten
4. Korrelation des AR-Status der CTCs mit den klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller, Ort
Celltracks Autoprep System	Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italien
Celltracks Analyzer II	Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italien
GS-15 Zentrifuge	Beckman, Ramsey, MI, USA
Zentrifuge Rotofix 32 A mit Einfachspannplatte 1662 und Zytospinkammer 1666	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotanta	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Schüttelplattform Köttermann 4010	Köttermann, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Cleanair Products, Minneapolis, MN, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop DM IRB	Leica, Wetzlar, Deutschland
CO ₂ - Inkubator Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Axioplan 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved 0,100mm Tiefe	Paul Marienfeld Gmbh & Co. Kg, Lauda Königshofen, Deutschland
Einfriergefäß „Mr. Frosty“	Nalgene Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.2. Verwendete Materialien

Tabelle 8: Verwendete Materialien

Material	Hersteller, Ort
Filterkarten 2x8mm Zytokammern	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Objektträger 76x26x1mm Adhäsiv, silanisierte Oberfläche	Paul Marienfeld Gmbh & Co. Kg, Lauda Königshofen, Deutschland
BD-Vacutainer Safety-Lok 0,6x19mmx305mm	Becton, Dickson And Company, Franklin Lakes, NJ, USA
CellSave® Preservative Tubes	Veridex, Raritan, NJ, USA
Sarstedt Zellkulturflaschen T75	Pharmaserv GmbH, Marburg, Deutschland

Einweg Stripette	Nalgene Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten Eppendorf 2-20µl Pipetten Eppendorf 100µl Pipetten Eppendorf 200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml farblos	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen 2ml mit Schraubverschluss	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.3. Verwendete Chemikalien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Zusammensetzung
Lysepuffer isotone Ammoniumchloridlösung	1 ml enthält 8,29 mg Ammoniumchlorid 1,00 mg Kaliumhydrogencarbonat 0,0375 mg Na-EDTA
Dako® Proteinblock Serum-Frei Ready-To-Use Code X0909	0,25% Casein In PBS 0,015 mol/l NaN ₃ Stabilisierendes Protein
Dako® Antibody Diluent Ready-To-Use Code S0809	Tris-HCl Puffer 0,015 mol/L NaN ₃ Stabilisierendes Protein
Trypanblaulösung Sigma Aldrich	0,81% Kochsalzlösung 0,06% Kaliumphosphatlösung Di- Basisch
Triton® X-100 t-Octylphenoxyethoxyethanol T9284 SigmaAldrich by Merck	t-Oct-C ₆ H ₄ -(OCH ₂ CH ₂) _x OH + Konservierungsmittel 10% auf Wasserbasis
Tween Polysorbat Dako®	Polysorbat + Konservierungsmittel auf Wasserbasis
Ficoll	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer

2.1.4. Verwendete Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits

Kit	Zusammensetzung
<i>CellSearch® EpithelialKit®</i>	Anti-EpCAM Ferrofluid: Suspension aus 0.022% EPCaM markierten Ferrofluiden, 0.03% BSA 0.05% ProClin® 300 Färbereagenzien: 0.0006% monoklonaler Maus-anti CK Antikörper 0.0012% monoklonaler Maus anti-CD45 Antikörper 0.5% BSA 0.1% sodium azide 0.005% DAPI in 0.05% ProClin® 300 Unbekannte Permeabilisierung, Fixierungs- und Verdünnungskomponente Auf Basis von PBS, BSA und Natriumazid
<i>CellSearch® ProfileKit®</i>	Anti-EpCAM Ferrofluid: Suspension aus 0.022% EPCaM markierten Ferrofluiden, 0.03% BSA 0.05% ProClin® 300 Unbekannte Permeabilisierung, Fixierungs- und Verdünnungskomponente Auf Basis von PBS, BSA und Natriumazid

2.1.5. Verwendete Puffer

Tabelle 11: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) Gibco by Life Technologies (1x) ohne CaCl ₂ ohne MgCl ₂	0,20 mg/l KCl 0,20 mg/l KH ₂ PO ₄ 8,00 mg/l NaCl 1,15 mg/l Na ₂ HPO ₄
Dako® Wash Buffer 10x Code S3006 (1:10 gelöst in Aqua Dest.)	0,05 mol/l Tris HCl 0,15 mol/l NaCl 0,05% Tween +Konservierungsmittel pH-Wert 7,6 (+/- 0,1)
Cell Search® Dilution Buffer®	Unbekannte Zusammensetzung auf Basis von PBS, BSA und Natriumazid

2.1.6. Verwendete Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Antikörper

Antikörper	Eigenschaften
Pan-Zytokeratin Antikörper	C11 – FITC, GTX11212 1,7mg/ml Genetex Inc., Irvine, CA, USA
Androgenrezeptor-Antikörper (D6F11)	Kaninchen, monoklonal, D6F11 XP Cell Signaling Technologies Inc., Cambridge UK
Androgenrezeptor-Antikörper (AR-N20-G)	Ziege, polyklonal, Sc-816-G 200µg/ml IgG Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
CD45-Rezeptor-Antikörper (D9M8I)	Kaninchen, polyklonal (D9M8I) XP (R) Cell Signaling Technologies Inc., Cambridge, UK
CD45 Rezeptor-Antikörper (35Z6)	35Z6-AF647 Maus Santa Cruz
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Esel-Anti-Ziege AF594	Alexa Fluor 2mg/ml IgG, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA
Esel-Anti- Kaninchen AF594	Alexa Fluor 2mg/ml IgG, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA
Esel-Anti-Kaninchen AF647	Alexa Fluor 2mg/ml IgG, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA

2.1.7. Verwendete Medien

Tabelle 13: Verwendete Medien

Medien	Zusammensetzung
RPMI Medium 1640 (1x) mit L Glutamin Gibco by Life Technologies	+ PS (Penicillin und Streptomycin) + FCS (Fetales Rinderserum)
Einfriermedium	50% RPMI Medium 40% FCS 10% DMSO

2.1.8. Verwendete Zelllinien

Tabelle 14: Übersicht der AR positiven und negativen Zelllinien

Androgenrezeptor-status	Gewebetyp	Zelllinie	Quelle
AR-positiv	Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms eines männlichen Kaukasiers	LNCaP	(112, 113)
	Pleuraerguss eines Mammakarzinoms Luminal-A-Typ einer weiblichen Kaukasierin	MCF7	(114)
	Pleuraerguss eines Mammakarzinoms Basal-Typ-TNBC einer weiblichen Kaukasierin	MDA-MB-231	(114)
	Pleuraerguss eines Her2-positiven Mammakarzinoms einer weiblichen Kaukasierin	SkBr3	(114)
AR-negativ	Hirismetastase eines Prostatakarzinoms eines männlichen Kaukasiers	DU145	(113)
	Knochenmetastase eines Prostataadenokarzinoms eines männlichen Kaukasiers	PC-3	(113)
	Blasenkarzinom eines männlichen Kaukasiers	5637	(115)
	Mammakarzinom Basal-Typ-TNBC einer weiblichen Kaukasierin	MCF10A	(114)

Tabelle 15: Verwendete Zelllinien für die Positiv- und Negativkontrollen

Zelllinien	Charakteristika
LNCaP	Positivkontrolle: AR-sensibles Prostatakarzinom ATCC CRL 1740
DU145	Negativkontrolle: AR-unabhängiges Prostatakarzinom ATCC HTB81

2.1.9. Patientinnen und Blutproben

Im Rahmen der Arbeit wurden Proben der MBC-Patientinnen, die zwischen 2012 und 2017 in die multizentrischen DETECT III/IV Studien eingeschlossen wurden genutzt (III: NCT01619111, IV: NCT02035813). Die entsprechenden Ethikvoten der Ethikkommissionen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (DETECT III: 525/2011AMG1) und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (DETECT III: MC-531; DETECT IV: MC-LKP-668) liegen vor.

Das Studiendesign der DETECT III und IV Studien ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. In die DETECT III und IV Studie konnten Patientinnen mit einem metastasierten, HER2-negativen Mammakarzinom (Primärtumor und/oder Metastase) eingeschlossen werden. In einem gemeinsamen Screening wurde der Nachweis von CTCs sowie deren HER2-Status überprüft. Patientinnen mit HER2-positiven CTCs konnten an der DETECT III Studie teilnehmen und erhielten dort endokrine Therapie oder Chemotherapie ggf. in Kombination mit Lapatinib. In die DETECT IVa Studie konnten postmenopausale Patientinnen mit einem Hormonrezeptor-positiven Primärtumor und ausschließlich HER2-negativen CTCs eingeschlossen werden. Dort wurden sie mit einer Kombinationstherapie aus endokriner Therapie und Everolimus behandelt. Der Studienarm DETECT IVb behandelt Patientinnen mit *triple-negativem* oder HR-positivem Primärtumor und der Indikation zur Chemotherapie bei Nachweis von HER2-negativen CTCs. Diese Patientinnen wurden mit Eribulin behandelt. Die Einschlusskriterien sind in der Abbildung 2 dargestellt. Die klinisch-pathologischen Daten zur Charakterisierung des Primärtumors, der Metastasen, der Therapiezyklen, des Menopausenstatus und des Allgemeinbefindens wurden im Rahmen der Studie miterfasst.

Die Tumore wurden in der DETECT-Studie über die immunhistochemischen Eigenschaften der Primärtumoren und/oder der Metastase eingeteilt. Die AR-Expression wird aktuell nicht in der diagnostischen Routine der Charakterisierung des Primärtumors berücksichtigt, sodass es keine Daten zur Expression des AR auf Primärtumorgewebe bei den untersuchten Patientinnen gibt. Da die Patientinnenproben aus unterschiedlichen Studienzentren stammen, stand das Gewebe des Primärtumors und/oder der Metastasen nicht zur Verfügung, sodass

der AR-Status nicht nachbestimmt werden konnte. Für die Experimente wurden Patientinnenproben aller Mammakarzinomsubtypen gewählt.

2.2. Methoden

2.2.1. Anreicherung der CTCs mittels CellSearch®

Die Anreicherung der Tumorzellen erfolgte im *CellSearch*® System mit Hilfe eines Antikörpers, der am epithelialen Adhäsionsmolekül (EpCAM) band, welcher mit Ferrofluiden gekoppelt war. Diese wurden mittels Magneten aus dem Vollblut isoliert. Dabei handelt es sich um die einzige von der FDA zur *in vitro* Diagnostik zugelassenen Methode des CTC-Nachweises.

Jeder Patientin wurden 2 x 7,5ml peripheres Blut abgenommen. Das Blut wurde in speziellen *CellSave*® Abnahmeröhrchen asserviert. Die erste (Primär-)Probe wurde mittels *CellSearch*® *EpithelialKit*® aufgearbeitet. Zu den 7,5 ml Blut wurde 6,5 ml Dilution Puffer hinzugefügt, danach wurde die Probe bei 800g 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert, bevor sie vom *Celltracks Autoprep*® System verarbeitet wurde. Die Tumorzellen wurden anhand des Ferrofluid-markierten EpCAM-Antikörpers erkannt. Unter magnetischem Einfluss wurden die epithelialen Bestandteile aus dem Vollblut angereichert. Zusätzlich wurde ein geringer Teil der Leukozytenfraktion aus dem Vollblut entfernt (53). Bei dem *EpithelialKit*® wurden die gewonnen Zellen immunzytochemisch auf Zytokeratine, DAPI und CD45 gefärbt und dann automatisch in einer Kartusche aufgefangen. Die Zellen wurden nach dem Färben automatisch gescannt. In diesem immunomagnetischen System wurden alle EpCAM positiven Ergebnisse abgebildet und dann von erfahrenen Mitarbeiterinnen des Instituts auf ihr DAPI-Signal, ihre CD45-Negativität, ihre Zellgröße und ihr Kern-Plasma-Verhältnis geprüft. Die positiven Ergebnisse (CTC-Zahl/7,5ml Blut) wurden gezählt und dokumentiert.

Der typische Phänotyp einer Tumorzelle lässt sich morphologisch deutlich charakterisieren. Er zeigt einen vergrößerten und granulierten Zellkern, große Nukleoli, ein starkes und/oder unregelmäßig, meist netzartig gefärbtes Zytoplasma sowie eventuelle perinukleäre Farbverdichtung. Außerdem sind Tumorzellen in der Regel größer als Zellen der hämatopoetischen Zelllinien (116) (Vgl. Tabelle 21).

Die zweite Blutprobe (Parallelprobe) wurde mit dem *Cellsearch ProfileKit®* aufgearbeitet. Hier wurden die EpCAM-positiven CTCs ebenfalls immunomagnetisch angereichert, aber nicht zusätzlich charakterisiert, was weitere Analysen der Zellen ermöglicht hat. Die EpCAM-positiven Zellen wurden gemeinsam mit einer reduzierten Leukozytenfraktion in circa 900µl DPBS Puffer gelöst. Die gewonnene Zellfraktion wurde dann zentrifugiert und per *CytoSpin* auf Objektträger transferiert. Auf den Objektträgern befinden sich also sowohl Leukozyten der Patientin als auch die CTCs. Die Leukozytenfraktion dient als Kontrolle im Verlauf der Probenaufarbeitung. Trotz der Reduktion der leukozytären Zelleinheit befinden sich auf den Objektträgern größtenteils Leukozyten in einem Verhältnis von 1 CTC zu 100 Leukozyten.

Je nach CTC-Zahl der primären *CellSearch EpithelialKit®* Probe wurde die Zellsuspension der *CellSearch ProfileKit®* Probe unterschiedlich stark verdünnt, sodass die Zellfraktion auf ein bis acht Objektträger aufgeteilt wurde.

Die Objektträger wurden bei -20°C gelagert und standen unterschiedlichen translationalen Forschungsprojekten, welche mit dem DETECT-Studiendesign assoziiert sind, zur Verfügung. Diese Proben wurden zur Analyse des AR verwendet.

In der folgenden Abbildung 4 wird der Verarbeitungsprozess der Proben verdeutlicht.

2.2.1. Auswahlkriterien der Proben

Es wurden Patientinnenproben in die AR-Analyse eingeschlossen, bei denen sich einerseits mehr als eine CTC in 7,5ml Blut mittels *Cellsearch EpithelialKit®* (Primärprobe) nachweisen ließen, andererseits aufgrund von vermehrter CTC-Zahl im *EpithelialKit®* mehr als ein Probenobjektträger gelagert wurde. Bei Patientinnen mit zwei gelagerten *ProfileKit®* Objektträgern konnte ein Objektträger für die AR-Analyse genutzt werden. Bei Patientinnen mit mehr als zwei Probenobjektträgern wurden zwei Objektträger in die AR-Analyse einbezogen. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, CTC-Proben von Patientinnen mit sowohl HR-positiven als auch *TNBCs* einzuschließen. Unabhängig von ihrer Zellzahl in der Primärprobe, wurden auch die *Follow Up* Proben der bereits eingeschlossenen Patientinnen untersucht. Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

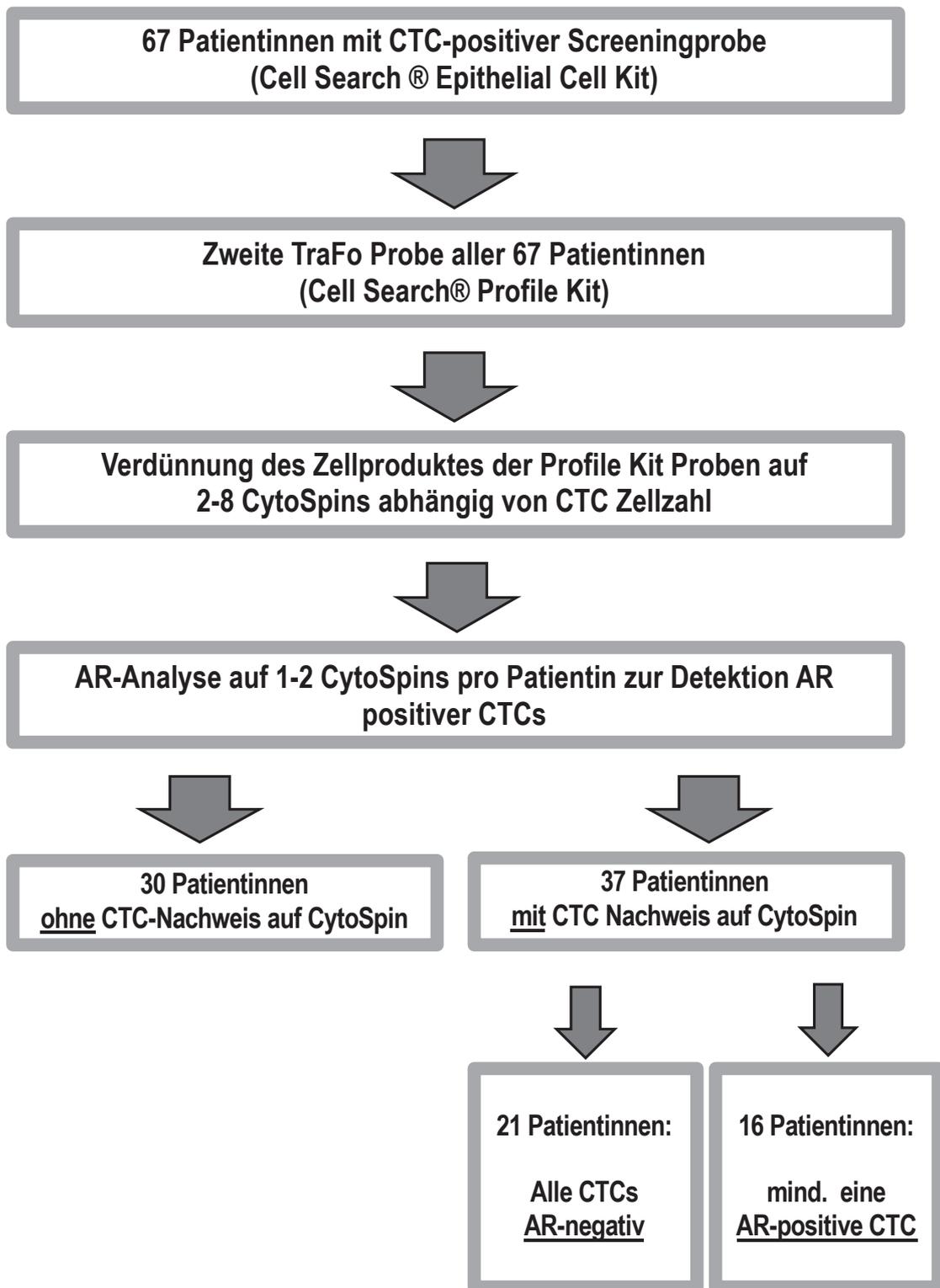


Abbildung 4 Verarbeitungsschritte der Patientinnenproben

CTC: Zirkulierende Tumorzelle, TraFo: Translationale Forschung, AR: Androgenrezeptor

2.2.2. Methoden der Zellkultur

Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C bei 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂). Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen kultiviert.

Einfrieren humaner Zellen

Die langfristige Lagerung eukaryotischer Zellen erfolgte in DMSO-haltigem Medium bei -196°C. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium. Ungefähr 2x10⁶ Zellen wurden in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht in einem Einfriergefäß gefüllt mit Isopropanol bei -80°C gelagert. Dadurch kühlten sie sehr viel langsamer ab, die Abkühlung lag bei etwa 1°C pro Minute. Anschließend wurden die Kryoröhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen humaner Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Hierzu wurde die Zellsuspension schrittweise unter Schwenken mit Medium verdünnt. Darauf folgten zwei Waschvorgänge, wobei die Zellen bei 1100rpm je 5min zentrifugiert wurden, bis ein Pellet entstand. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden sie in eine Kulturflasche überführt.

Mediumwechsel und Passage humaner Zellen

Die Arbeit in der Zellkultur wurde durchgeführt, um Zellen für Negativ-, Positiv- und Isotypkontrollen zu erhalten. Hierfür wurden die oben genannten Zelllinien verwendet (Vgl. Tabelle 15). Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt.

Zur Kultivierung und Expansion der Zellen erfolgte eine regelmäßige Passage. Hierbei wurde das Medium abgesaugt und dann die Zellen mit DPBS gespült. *Cell Dissociation Buffer*® wurde genutzt um die Zellen aus ihrem Zellverband und vom Plastik zu lösen. *Cell Dissociation Buffer*® ermöglicht den späteren Nachweis von Oberflächenmarkern. Es wurden 2 ml *Cell Dissociation Buffer*® auf die Zellen gegeben. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vom Zellkulturflaschenboden lösten. Dies wurde mittels Mikroskop überprüft. Nachdem die Zellen gelöst waren, wurde die Wirkung des *Cell Dissociation Buffer*®

durch Hinzugabe von 8 ml Medium gehemmt. Hierfür wurden die Zellen mittels einer Stripette mehrmals suspendiert. Die Zellen wurden in ein 15ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 1000rpm für 5min pelletiert.

Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und die gewonnene Lösung auf bis zu zwei Kulturflaschen aufgeteilt. Danach wurde das Medium bis zu einer Gesamtmenge pro Flasche von 12ml aufgefüllt und die Inkubation der Zellen fortgesetzt.

Die geernteten Zellen wurden dann mit 7,5ml Blut gesunder Kontrollpersonen in ein *CellSave*® Röhrchen gegeben, sodass sie analog zu den Patientinnenproben im *CellSearch*® System mit dem *ProfileKit*® verarbeitet werden konnten.

2.2.3. Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren zur Trennung der Blutbestandteile anhand eines Dichtegradienten. Es wurde benötigt, um einen Leukozytenhintergrund für die Auswertung der Positiv- Negativ- und Isotypkontrollen zu generieren. Das verwendete Blut stammte von gesunden Kontrollpersonen. Die mononukleären Zellen blieben dabei nach der Zentrifugation in der Interphase, wohingegen Plasma oberhalb und Ficoll unterhalb verblieb. Erythrozyten, Granulozyten und Debris setzen sich unterhalb des Ficolls ab.

Die zu verwendende Menge Ficoll hing von dem Volumen der Probe ab. Es wurde das doppelte Volumen der Blutprobe in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und das Blut darauf pipettiert. Das Zentrifugationsröhrchen wurde dann 30min bei 1600rpm ohne Bremse zentrifugiert.

Die Plasmaphase wurde abgenommen und die in der Interphase befindlichen Leukozyten wurden in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen gegeben. Wenn sich darin noch rote Blutbestandteile befanden, wurde der Probe Erythrozytenlysepuffer beigemischt und die Lösung 5min bei 4°C inkubiert.

Die Lösung wurde dann auf 4ml mit PBS aufgefüllt und bei 1600rpm 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschvorgang wiederholt.

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und dann verdünnt, sodass sich circa 100.000 Zellen in 400µl PBS befanden, um diese auf Objektträger zu transferieren. In die Neubauer-Zählkammer wurde 1µl der Zellsuspension gegeben. Lichtmikroskopisch wurden dann die Zellen in den Eckquadranten gezählt und ein Mittelwert aus den vier Eckquadranten gebildet.

Anhand der Formel:

Zellen pro Milliliter Suspension = Mittelwert der Zellzahl der vier Eckquadranten $\times V \times 10^4$

V: Verdünnung der Suspension

konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen bestimmt werden.

2.2.4. CytoSpin

Der *CytoSpin* ist eine Technik, um Zellen auf einen Objektträger zu transferieren. Um eine gute Beurteilbarkeit der Probe zur mikroskopischen Auswertung zu gewährleisten, muss die Leukozytenfraktion verdünnt werden. Hierfür wurde die aufzutragende Lösung zunächst so stark verdünnt, dass sich in 400µl Lösung circa 100.000 Zellen befanden. Dazu wurde die Zellzahl der Lösung mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (Kapitel 2.2.3). Die Positiv- (LNCaP) und Negativkontrollen (DU145) wurden analog mit 25.000 Leukozyten pro 100µl verdünnt.

Mit jeweils 400µl der erhaltenen Zellsuspension wird ein *CytoSpin* angefertigt. Die Suspension wird auf einem Objektträger aufgebracht, welche entsprechend der Herstellervorschriften der Zentrifuge mit Filterkarten und speziellen Halterungen bestückt werden. Anschließend findet bei Raumtemperatur eine Zentrifugation mit 800 rpm über 2 Minuten statt. Schließlich wird der Überstand vorsichtig abgezogen und die Zytospinalhalterung entfernt. Erst nach einer erneuten Zentrifugation (1 min, 800 rpm), dürfen die Filterkarten entfernt werden. Danach wurden die *CytoSpins* bei -20°C eingefroren.

2.2.5. Immunfluoreszenzfärbung

Die Grundlage der Immunfluoreszenzfärbung sind spezifische Antikörper, welche mit Fluorophoren gekoppelt werden. Hierbei kann eine bestimmte Struktur indirekt durch Antigen-Antikörper-Bindung dargestellt werden.

Es gibt zwei Möglichkeiten der Immunfluoreszenz. Entweder werden die Antikörper direkt markiert oder es werden sekundär markierte Antikörper benutzt.

Direkte Immunfluoreszenz

Die primär-markierten Antikörper reagieren mit einem spezifischen Epitop. An ihnen ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, durch welchen die Struktur unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann. Für diese Methode wird nur ein Färbeschritt benötigt.

Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz ist das Fluorochrom nicht am primären Antikörper gekoppelt, sondern an einem sekundären Antikörper, welcher an den primären bindet. Sie kann genutzt werden, um mehrere Färbungen miteinander zu kombinieren. Bei der Kombination mehrerer Antikörper, darf jede Spezies nur einmalig genutzt werden.

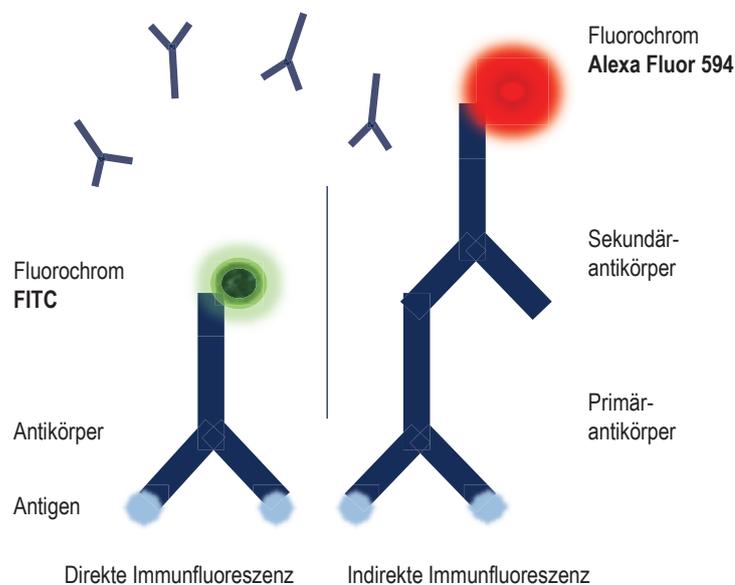


Abbildung 5 Schematische Darstellung direkter und indirekter Immunfluoreszenz nach Krawczyk (117) FITC:Fluorescein-isothiocyanate

2.2.6. Auswertung der Präparate

Die Auswertung erfolgte mit dem Axioplan Auflicht-Fluoreszenzmikroskop von Zeiss und der angeschlossenen CCD-Kamera. Die Fluoreszenzspektren der Filter und Farbstoffe sind in den folgenden Tabellen dargestellt (Tabelle 16, Tabelle 17).

Tabelle 16: Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter

Filter	Anregungswellenlänge in nm	Farbteiler in nm	Emissionswellenlänge in nm
DAPI	390	420	450
FITC	450-490	510	515
TRITC	546	580	590
CY5	640	660	690

nm: Nanometer; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; FITC: Fluorescein-isothiocyanate; TRITC: Tetramethylrhodamine Cy5: Cyanin- Farbstoff

Tabelle 17: Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorophor	Anregungswellenlänge in nm	Emissionswellenlänge in nm
DAPI	358	461
FITC	488	517
Alexa Fluor 594	590	617
Alexa Fluor 647	650	665

nm: Nanometer; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; FITC: Fluorescein-isothiocyanate; TRITC: Tetramethylrhodamine Cy5: Cyanin- Farbstoff

Die Beurteilung der Proben wurde an einem Fluoreszenzmikroskop mit 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Zunächst wurden die Kontrollansätze überprüft. Bei den Patientinnenproben wurden zytokeratinhaltige Ereignisse auf ihre Kernhaltigkeit überprüft und in 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

Im TRITC Kanal wurde die Expressionsstärke des AR unter Sicht analysiert und als AR-positiv oder AR-negativ klassifiziert und ihr Expressionsmuster bestimmt. Mit einer festen Belichtungszeit von 300ms wurden alle CTCs mittels CCD-Kamera aufgenommen und archiviert. Die CTCs wurden durch eine erfahrene Mitarbeiterin des Instituts digital zweitbegutachtet.

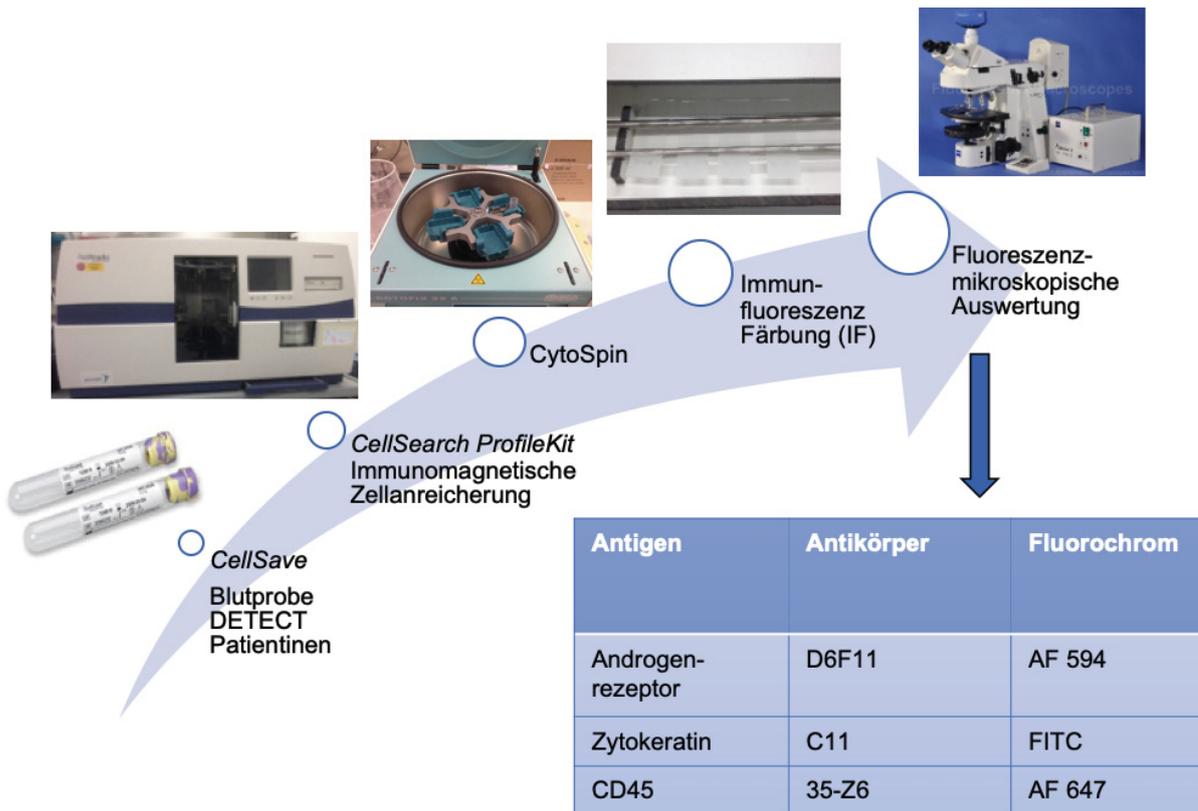


Abbildung 6 Schematische Verarbeitung der Patientinnen-TraFo-Proben aus der DETECT-Studie

TraFo: translationale Forschungsprojekte; CD45: Leukozytenmarkierung; FITC: Fluorescein-isothiocyanate; C11: pan-Zytokeratin-Antikörper

2.2.7. Kontrollen

Jeder Färbeporgang der Patientinnenproben wurde von einer Positiv-, einer Negativ- und einer Isotypkontrolle begleitet, sodass jede Antikörperbindung auf ihre Wirksamkeit, Vollständigkeit und Spezifität geprüft wurde. Als Positivkontrolle diente die AR-positive Prostatakarzinomzelllinie LNCaP, als Negativkontrolle die AR-negative Prostatakarzinomzelllinie DU145. Es handelt sich um zwei gut etablierte Zelllinien (Vgl. Tabelle 15). Die Ergebnisse der Markierungen sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Isotypkontrolle wird durchgeführt um Kreuzreaktionen der Primärantikörper und das Ausmaß des Hintergrundsignals darzustellen. Die Ergebnisse der Isotypkontrolle, welche mit Kaninchenserum durchgeführt wird, ist in Abbildung 8 gezeigt.

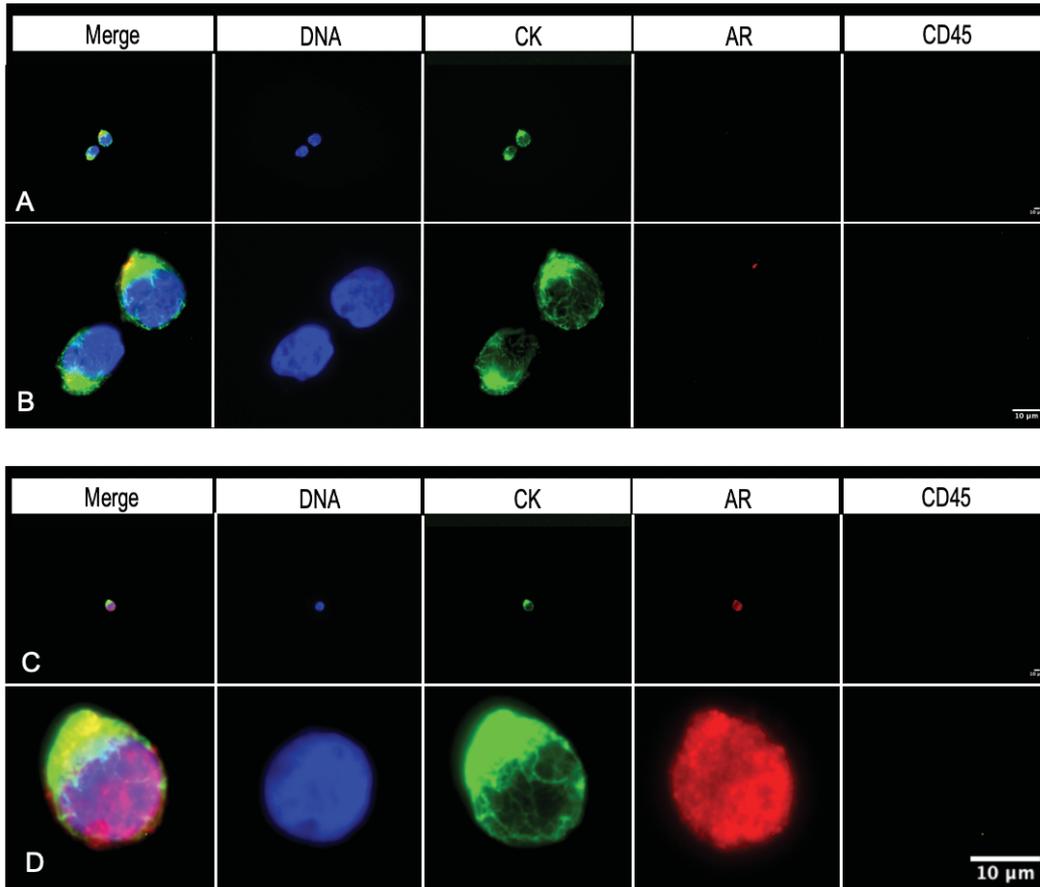


Abbildung 7 AR-Färbung, Negativ- und Positivkontrolle

Negativ- (DU145 A und B) und Positivkontrolle (LNCaP, C und D) nach optimiertem AR-Färbeprotokoll; Merge; Überlagerung aller Kanäle, DAPI anti-DNA 1:5000; CK C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400; D6F11 anti-AR-AK AF594 Kaninchen 1:100; 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20; A und C 63x Vergrößerung B und D zeigen einen Bildausschnitt
AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker, CK: Zytokeratin; AF: Alexa Fluor

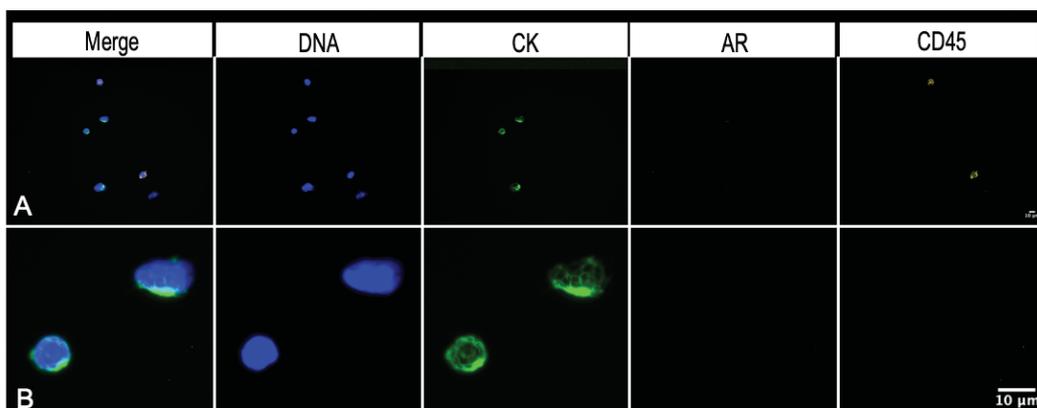


Abbildung 8 AR-Färbung, Isotypkontrolle auf LNCaP

Merge: Überlagerung aller Kanäle; DAPI anti-DNA 1:5000; CK C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400; Kaninchen IgG₁ 1:100; CD45 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20; A: 63x Vergrößerung B: Bildausschnitt Prostatakarzinomzelllinie; AF Alexa Fluor

2.2.8. Optimierte Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Objektträger für circa 20min aufgetaut und die kreisförmigen Areale mit den immobilisierten Zellen mit einem Fettstift umrandet. Die weitere Behandlung während der Markierung erfolgte in der feuchten Kammer, um den Präparaten keine Feuchtigkeit zu entziehen und die Qualität der Zellen nicht zu reduzieren. Die Fixierung erfolgte mit *CellSave®*, welches mit 9ml DPBS im *CellSave® Tube* verdünnt wurde. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurden die Präparate für wenige Sekunden in 250ml destilliertem Wasser gespült und direkt danach mit frischen 250ml destilliertem Wasser für 5min auf den Schüttler gestellt. Der zweite und alle folgenden Waschgänge erfolgten mit *Dako®* Waschpuffer. Dabei wurde auch jeweils einmal kurz gespült, gefolgt von 5-minütigem Waschprozess auf dem Schüttler. Es folgte die Permeabilisierung mit Triton® X-100 (SigmaAldrich® 0,1%) nach einem Waschgang mit destilliertem Wasser und zwei Waschgängen mit Waschpuffer. Nach 10-minütiger Inkubationszeit für die Permeabilisierung schlossen sich erneut zwei Waschgänge, mit anschließender 10-minütiger Behandlung mit *Dako®* Protein Block an. Ohne Waschvorgang wurde der erste Antikörper Mix (Vgl. Tabelle 18) auf die Präparate gegeben. Dabei wurde der primäre AR-Antikörper und der FITC-konjugierte-pan-Cytokeratin-Antikörper in der in Tabelle 18 aufgeführten Konzentration in *Dako® Antibody Diluent* gelöst. Insgesamt wurde auf ein Volumen von 100µl pro Präparat verdünnt.

Tabelle 18: Erster Antikörper Mix

Antikörper (AK)	Zielstruktur	Konzentration	Fluorochrom
C11	Zytokeratin	1:400	FITC
AR-Kaninchen D6F11-AK	Androgenrezeptor (AR)	1:100	

Die Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen gemischt, auf 100µl pro Präparat verdünnt und in *Dako® Antibody Diluent* gelöst.

Parallel wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle zur Validierung des Prozesses gefärbt. Es wurde zusätzlich eine Isotypkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde der primäre Antikörper in gleicher Konzentration durch Kaninchenserum ersetzt, um sicherzustellen, dass der sekundäre Antikörper spezifisch an den primären AR-Antikörper band.

Tabelle 19 Isotypkontrolle

Antikörper (AK)	Zielstruktur	Konzentration	Fluorochrom
C11	Zytokeratin	1:400	FITC
Kaninchen IgG ₁		1:100	

Die Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen gemischt, auf 100µl pro Präparat verdünnt und in Dako® Antibody Diluent gelöst.

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur in der abgedunkelten feuchten Kammer erfolgten erneut drei Waschvorgänge. Alle folgenden Schritte wurden abgedunkelt durchgeführt. Die Präparate der Isotypkontrolle, die Positiv- bzw. die Negativkontrolle, sowie die Proben wurden in unterschiedlichen Gefäßen gewaschen. Nach den Waschgängen wurde der zweite Antikörper-Mix in den Konzentrationen wie in Tabelle 20 dargestellt auf die Präparate gegeben. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper für die AR-Färbung, der AF647-konjugierte-anti-CD45 Leukozytenmarker und DAPI laut den Konzentrationen auf 100µl pro Präparat in *Dako® Antibody Diluent* analog zum ersten Antikörper-Mix verdünnt. Die Isotypkontrolle wurde mit dem gleichen zweiten Antikörper-Mix Ansatz benetzt.

Tabelle 20: Zweiter Antikörper Mix

Antikörper (AK)	Zielstruktur	Konzentration
Esel-anti-Kaninchen AF594	Primärer Androgenrezeptor AK	1:500
35-Z6-AF647	CD45	1:20
DAPI	DNA	1:5000

Die Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen gemischt, auf 100µl pro Präparat verdünnt und in Dako® Antibody Diluent gelöst.

CD45: Leukozytenmarkierung; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Nach 30-minütiger Inkubationszeit in der abgedunkelten feuchten Kammer wurden zwei weitere Waschgänge mit Waschpuffer und ein letzter Waschgang mit destilliertem Wasser durchgeführt.

Die Objektträger wurden mit einem Papiertuch getrocknet und mit einem Tropfen *Dako® Mounting Medium* behandelt. Danach wurden die Präparate mit 24x32mm Deckgläschen abgedeckt. Nach 30min erfolgte entweder direkt die fluoreszenzmikroskopische Auswertung oder eine abgedunkelte Lagerung der Präparate bei 4°C.

2.2.9. Auswahlkriterien der Zellen

In der Auswertung wurden Zellen, die ein positives CK-Signal, eine deutliche Kernhaltigkeit und keine CD45-Expression aufwiesen, als CTCs gewertet.

Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen keine Zeichen von Apoptose und im Vergleich zum Zytoplasma einen großen Zellkern besitzen. Zeichen einer Apoptose sind beispielsweise ein schollig veränderter Zellkern, Hyperchromasie und Vakuolen im Zytoplasma (116). Weitere Kriterien sind in der folgenden Abbildung 9 dargestellt.

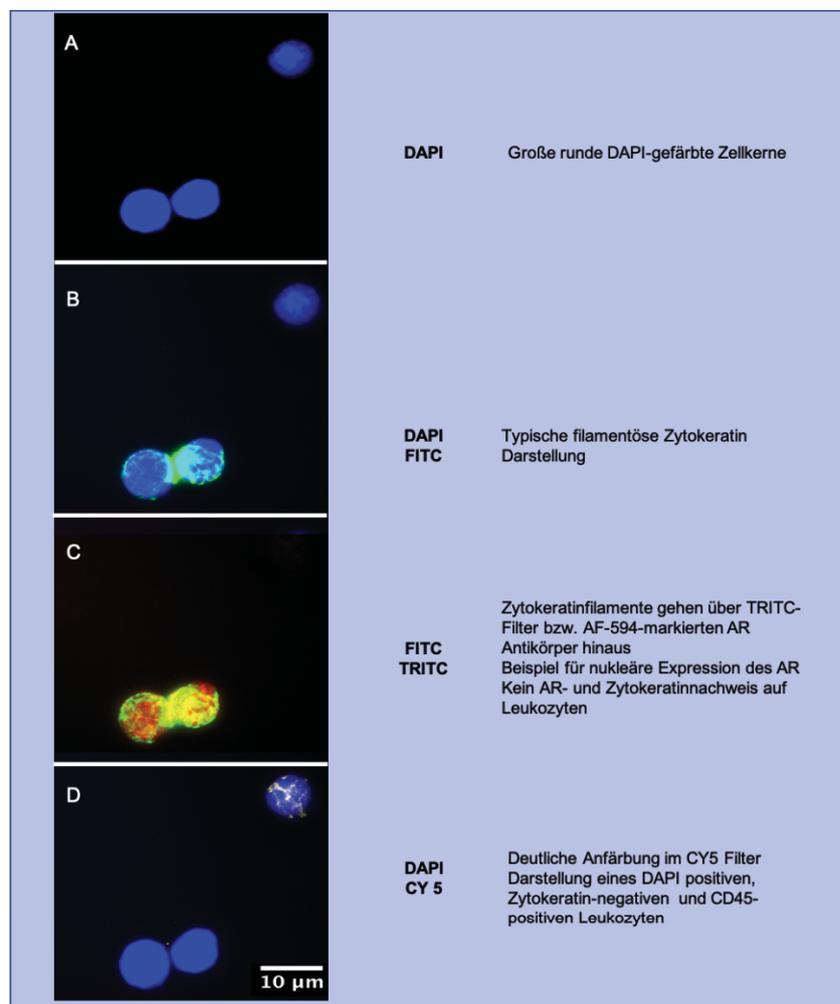


Abbildung 9 Darstellung des zellkernassoziierten Expressionsmusters einer AR-Färbung auf LNCaP mit der Gegenfärbung mit CD45 und Darstellung eines CD45-positiven Leukozyten mit DAPI Nachweis mit der Gegenfärbung mit Zytokeratin

AR: Androgenrezeptor; LNCaP: AR-positive Prostatakarzinomzelllinie und Positivkontrolle für AR-Färbung, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; FITC: Fluorescein-isothiocyanate; CY5: Cyanin-Farbstoff TRITC: Tetramethylrhodamine

In Anlehnung an die Kriterien der etablierten Detektion von DTC wurden die phänotypischen Kriterien in Tabelle 21 schematisch dargestellt (Vgl. Abbildung 9 und Tabelle 21).

Tabelle 21 Kriterien zur Detektion von CTC modifiziert nach Fehm, *et al.* in Anlehnung an die Vorgehensweise bei der Detektion von disseminierten Tumorzellen (118)

<u>Kriterien des Phänotyps einer CTC</u>
Vergößerter Zellkern
Kern-Plasma-Verhältnis mindestens 0,8
Granulierter Zellkern mit großen Nukleoli
Deutliche Zytokeratinanreicherung mit netzartiger Struktur
Tumorzellen größer als hämatopoetische Zellen

2.2.10. Klassifikation AR-positiver CTCs

Die Patientinnenproben wurden nach ihrer Färbung zeitnah am Mikroskop ausgewertet (Vgl. 2.2.6). Hierbei wurden ursprünglich die Belichtungszeiten nach dem Anforderungsprofil für ein optimales Färbeprotokoll festgelegt, sodass die Negativkontrollen kein Signal, die Positivkontrollen hingegen ein sehr deutliches Signal aufwiesen. Alle CK-positiven Ereignisse wurden mit Aufnahmen dokumentiert. Anschließend wurden diese Signale auf DAPI-Positivität und CD45-Negativität überprüft. Schließlich erfolgte ein Vergleich der Signalstärke mit der Positiv- und Negativkontrolle und anhand des Färbemusters und der Farbtintensität wurde entschieden, ob es sich um eine AR-positive oder eine AR-negative CTC handelte. Jede aufgenommene CTC wurde durch eine erfahrene Mitarbeiterin des Instituts digital zweitbegutachtet.

2.2.11. Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Patientinnendaten wurde SPSS Version 24 für MacOS genutzt. Hierbei wurden Chi-Quadrat-Tests (χ^2) zur Korrelation der klinisch-pathologischen Ergebnisse und des AR-Nachweises genutzt. P-Values <0.05 wurden als signifikant berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1. Vorexperimente der Immunzytofluoreszenzfärbung

Es wurden Vorexperimente zur Optimierung der Aufarbeitung, der Fixierung und der Permeabilisierung der Proben und zur Auswahl der passenden AR- und CD45-Antikörper und ihrer Inkubationszeiten durchgeführt, um ein optimiertes Färbeergebnis zu erreichen.

3.1.1. Ergebnisse der Probenfixierungsexperimente

In der folgenden Tabelle 22 werden die unterschiedlichen Substanzen zur Fixierung verglichen. Es zeigte sich, dass *CellSave*® im Vergleich zu Alkoholen, Aldehyden und Oxidanzien am besten geeignet ist, die CTCs zu fixieren. Alle Blutproben werden in *CellSave*® Rörchen fixiert und transportiert.

Tabelle 22 Vergleich der Experimente der Fixierungsmittel Alkohol, Aldehyd, Oxidanzien und *CellSave*®

Fixierungs- mittel	Alkohole	Aldehyde	Oxidanzien	CellSave®
Funktions- prinzip	Entziehen dem Gewebe Wasser	Fixieren Proteine sehr schnell und machen sie funktionsunfähig	Bilden Lipid- verbindungen, v.a. zur Nachfärbung geeignet Beeinflussten Proteine nicht	Fixieren epitheliale Einzelzellen, speziell für CTCs konzipiert, Antikoagulation
Nachteile	Denaturieren Proteine	Verändern Proteinstruktur		Unbekannte Zusammenstellung
Einzelzell- experimente	Färbe- ergebnisse qualitativ schlechter als <i>CellSave</i> ®	Färbeergebnisse qualitativ schlechter als <i>CellSave</i> ®	Keine Vorteile bei Einzelzell- experimenten	Beste Färbeergebnisse, gleiches Reagenz wie in Präanalytik

3.1.2. Permeabilisierungsexperimente

Zur Durchführung intrazellulärer Färbungen ist die Permeabilisierung der Zellen notwendig. Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung von Antigenen und Antikörpern. Die Zellmembran muss durch die Permeabilisierung zunächst durchlässig gemacht werden, sodass die Antikörper in die Zelle diffundieren können.

Hierzu werden Substanzen wie Triton (0,1%) oder Tween (0,05%) benutzt (119) (120). Zu den Vorexperimenten gehörte der Vergleich von Triton (0,1%) und das Unterlassen der Permeabilisierungsschritte. Hierbei wurde kein Triton verwendet und stattdessen wurden die Waschvorgänge mit Dako® Waschpuffer und mit DPBS durchgeführt. Im Dako® Waschpuffer befindet sich stark verdünntes Tween (0,05%). Aufgrund seines schonenderen Potenzials wurde für die weiteren Experimente Triton, statt Tween, zur Permeabilisierung genutzt, um eine starke Proteinveränderung zu umgehen (Vgl. mit Tabelle 23).

Tabelle 23 Vergleich von Triton und Tween zur Permeabilisierung der Zellen

	Triton Octoxinol 9	Tween Polysorbat
	Nichtionisches Tensid	Nichtionisches Tensid
Funktionsweise	Permeabilisierung von eukaryotischen Zellen durch Mizellenbildung in Doppellipidschicht; Die proteinreichen Transmembranmoleküle bleiben unantigen, deshalb kommt es nicht zu einer Zerstörung der Zellstruktur (119)	Führt zur Lyse von eukaryotischen Zellen und zur Schwächung der Zellmembran; reagiert auch mit zellmembranassoziierten Proteinen; Gute Ergebnisse beim Erhalt der Zellstruktur (120)
Nachteile	Bei Überdosierung durch zu intensive Konzentration oder Inkubation werden Zellstrukturen zerstört	Mildere Permeabilisierung, weniger effektiv als Triton; Interaktion mit Transmembranmolekülen

3.1.3. Antikörperauswahl

CD45-Antikörperauswahl

Die EpCAM-positiven Zellen aus dem *CellSearch*® bzw. die Kontrollzellen liegen nicht als reine Zellpopulation vor, sondern zusammen mit Leukozyten. Um diese hämatogenen Zellen von den Tumorzellen zu unterscheiden wurden alle Proben und Kontrollen mit CD45 gegengefärbt.

CD45 ist ein Transmembranprotein der hämatopoetischen und lymphogenen Zellreihen und wird nur in diesen Zellreihen exprimiert. Es fungiert somit als spezifischer Marker für diese Zellen, der auf epithelialen Zellen wiederum nicht exprimiert wird. Die Expression von CD45 geht auch in gereiften Erythrozyten, Megakaryozyten und Plasmazellen verloren. CD45 wird in der histochemischen Diagnostik von Leukämien, Lymphomen und entzündlichen Infiltraten genutzt. In den Geweben des Immunsystems, wie beispielsweise dem Knochenmark, den Lymphknoten und dem *Appendix vermiformis*, kann CD45 nachgewiesen werden.

Es standen mehrere CD45-Antikörper zur Verfügung, welche in unterschiedlichen CTC-Projekten etabliert und angewandt wurden (121). Um die CK-positiven Ereignisse einwandfrei als Leukozyten zu klassifizieren wurden sie mit CD45 gegengefärbt (Vgl. Tabelle 12). CTCs können anhand ihres positiven CK-Signals, jedoch negativen CD45-Signals identifiziert werden.

Der *monoklonale* Kaninchen Antikörper D9M8I-XP und der *direkt-konjugierte* Maus 35-Z6-anti-CD45 Antikörper wurden anhand ihrer Expressionsstärke und Spezifität verglichen. Die Abbildung 10 zeigt die unterschiedlichen Färbemuster. Beide Antikörper färben die Leukozytenfraktion spezifisch an. Die optimale Färbung zeigte sich beim D9M8I-XP bei einer Verdünnung von 1:50 und beim 35-Z6-Klon bei 1:20. Die Wahl fiel auf den direkt-konjugierten Maus-AK, um Kreuzreaktionen zwischen dem Kaninchen-AR- und dem Kaninchen-CD45-Antikörper zu verhindern.

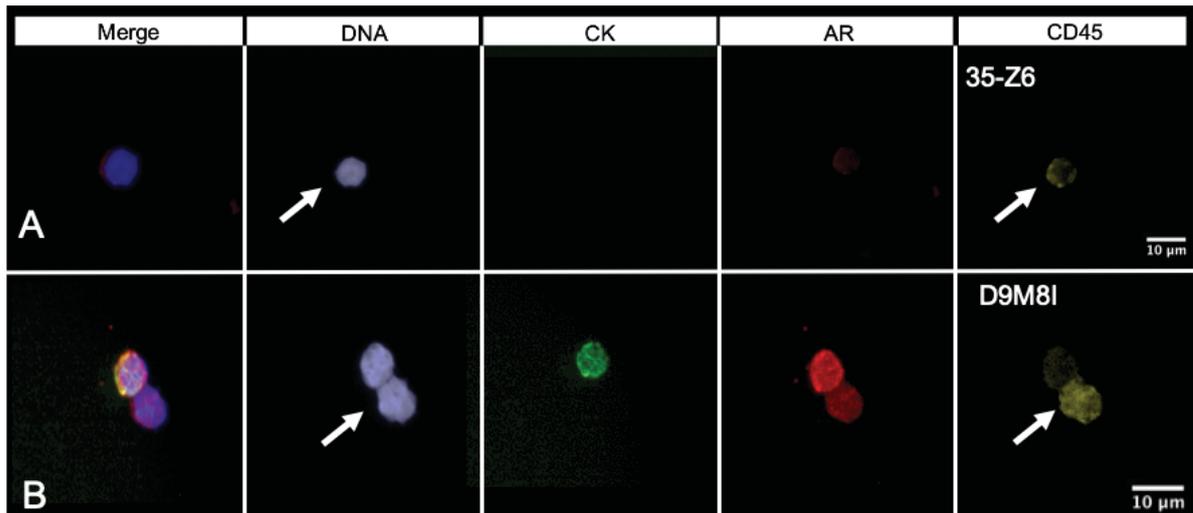


Abbildung 10 Vergleich der zwei AK-Klone zur Identifikation der CD45-Expression

Etablierung der CD45-Färbung mit dem direkt-konjugierten Klon 35-Z6-anti-CD45 (A) und dem monoklonalen D9M8I (B) auf LnCaP-Kontrollproben mit Leukozytenhintergrund - Merge, Dapi anti-DNA 1:5000; CK: C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400; AR: N-20 anti-AR-AK AF 594 Ziege 1:50; A: 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20 und B: D9M8I anti-CD45-AK AF647 Kaninchen 1:50; Bildausschnitt bei 40x Vergrößerung; AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker; LNCaP: AR-positive Prostatakarzinomzelllinie, AF: Alexa Fluor

AR-Antikörperauswahl

Es wurden der *polyklonale* Ziege N-20 Antikörper und der *monoklonale* Kaninchen D6F11-XP AR-Antikörper auf ihre Expressionsstärken geprüft. Die Fluoreszenzfärbung wurde anhand von laut Literatur AR-positiven und AR-negativen Zelllinien des Mamma-, Harnblasen- und Prostatakarzinoms etabliert (Vgl. Tabelle 14, Tabelle 15). Positiv- und Negativkontrollen aus AR-positiven und -negativen Zelllinienzellen, welche analog der Patientinnenzellen im *CellSearch ProfileKit®* System aufgearbeitet wurden, standen für die Etablierung zur Verfügung.

Zur Etablierung wurden die Antikörper in verschiedenen Verdünnungen und auf unterschiedlichen Positiv- und Negativzelllinienkontrollen getestet. Dabei ergab sich sowohl für den AR-N-20-Antikörper als auch für den AR-D6F11-Antikörper, ein optimales Färbeergebnis bei einer Verdünnung von 1:100. Weitere Ansätze, die getestet wurden, waren 1:200, 1:50, 1:20, 1:10. Das optimale Verdünnungsverhältnis bei einer Konzentration von 1:100 liegt im empfohlenen Bereich der Hersteller.

Die eindeutige AR-Rezeptorbindung wurde in unterschiedlichen Experimentalansätzen kontrolliert. Es musste ausgeschlossen werden, dass es Kreuzreaktionen zwischen den unterschiedlichen Antikörpern gab, dass die Markierung nur in Anwesenheit des AR-Antikörpers reagierte und dass die Anregungs- und Emissionsspektren sich nicht überschneiden (Vgl. dazu Tabelle 24, Abbildung 11, Abbildung 9).

Hierzu wurden die AR-Antikörper-Klone N-20 und D6F11 auf einer AR-negativen Zelllinie verglichen (Vgl. Abbildung 11). Der Klon N-20 konnte AR-positive und AR-negative Zelllinien nicht voneinander diskriminieren (Vgl. Negativkontrolle Abbildung 11 Zeile A und Positivkontrolle Abbildung 10 Zeile B). Die Anfärbe-Eigenschaften der beiden AR-Antikörper-Klone N-20 und D6F11 sind schematisch in Tabelle 24 dargestellt.

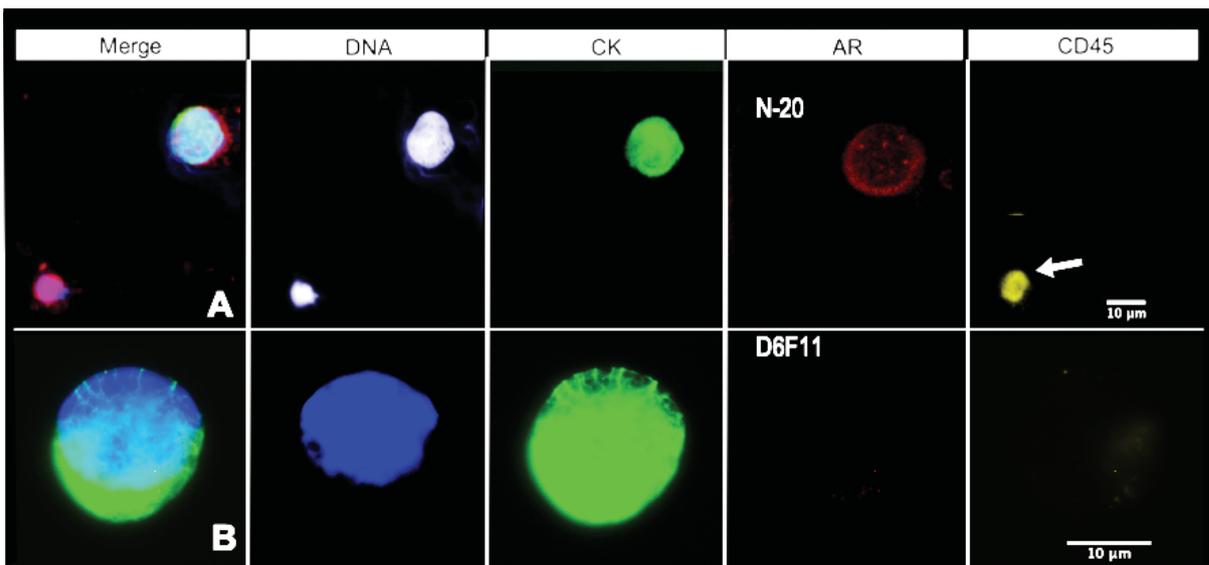


Abbildung 11 Testung der Antikörper N-20 (A) und D6F11 (B) auf der AR-negativen Zelllinie DU145

Die Antikörperklone N20 und D6F11 werden in dieser Abbildung auf einer AR-negativen Zelllinie miteinander verglichen. Es zeigt sich eine deutliche Expression in Zeile A. Der Klon N-20 kann die AR-negative Zelllinie nicht diskriminieren.

Färbung auf DU145 Pfeilmarkierung: Leukozyt- (Merge: Überlagerung aller Kanäle; DAPI anti-DNA 1:5000; CK: C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400; AR (Zeile A): N-20 anti-AR-AK AF 594 Ziege 1:50; AR (Zeile B): D6F11 anti-AR-AK AF 594 Kaninchen 1:100; 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20; Bildausschnitte Zeile A in 40x Vergrößerung und Zeile B in 63x Vergrößerung; AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker; DU145: AR-negative Prostatakarzinomzelllinie, AF: Alexa Fluor

Tabelle 24 Kontrollansätze für die Etablierung der AR-Färbung

AR-Klone	Probe	Ergebnis der Färbung		Bedeutung für die Etablierung	
N-20	D6F11	Nur primärer Antikörper (LNCaP)	Keine Anfärbung Anforderungen erfüllt		Keine Autofluoreszenz
		Isotypkontrolle (LNCaP) + sekundärem Antikörper	Keine Anfärbung Anforderungen erfüllt		Keine Kreuzreaktionen mit anderen sekundären Antikörpern
		Blocking Peptide (BP) (LNCaP) + primärem AK + sekundärem AK	N-20 Keine Anfärbung Anforderungen erfüllt	D6F11 Kein BP erhältlich, nicht durchgeführt	Das BP fängt aufgrund der erhöhten Konzentration die AR-AK ab. Diese werden ausgewaschen.
		Positivkontrolle (LNCaP)	Anfärbung Anforderungen erfüllt		Bindet zuverlässig an Transmembranelement von AR an AR-positiven Zellen
		Negativkontrolle (DU145)	N20 Anfärbung Anforderungen NICHT erfüllt	D6F11 Keine Anfärbung Anforderungen erfüllt	D6F11 bindet zuverlässig nur an AR, folglich kein AR-Signal an AR-negativer Zelllinie N-20 reagiert auch mit AR-negativen Zellen

AR: Androgenrezeptor; BP: *Blocking Peptide*; LNCaP: AR-positive Prostatakarzinomzelllinie; DU145: AR-negative Prostatakarzinomzelllinie

Die aufgelisteten Kriterien erfüllte nur der D6F11-AR-Antikörper. Der N-20-Klon konnte keine Signalunterschiede zwischen der etablierten AR-positiven Zelllinie LNCaP und der etablierten AR-negativen Zelllinie DU145 zeigen (Vgl. Negativkontrolle Abbildung 11 Zeile A und Positivkontrolle Abbildung 10 Zeile B). Auch bei alternativen Zelllinien, die in der Literatur als AR-negativ beschrieben wurden (MCF10A und 5637), zeigte der N20-Klon eindeutig positive Signalstärken in der Fluoreszenzmikroskopie und konnte nicht als Antikörper für die weiteren Experimente genutzt werden.

Der AR-D6F11-Antikörper wurde zur Überprüfung der Methodik vor Beginn der Experimente mit Patientinnenproben im Institut für Zytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf mit Immunhistochemie in der Peroxidasereaktion geprüft und konnte auch mit einer veränderten, für die Patientenversorgung etablierten Methodik eindeutige Positiv- und Negativergebnisse zeigen.

3.2. Optimiertes Färbeprotokoll

Das Färbeprotokoll wurde analog zum Arbeitsablauf des *CellSearch*® konzipiert, sodass eine Vergleichbarkeit der Färbungen des *ProfileKit*® und des *EpithelialKit*® gewährleistet werden konnte. Das Protokoll wurde auf die notwendige Anzahl an Waschvorgängen reduziert, um einen Verlust der seltenen CTC Ereignisse maximal zu reduzieren. Der schematische Ablauf ist folgend dargestellt.

Tabelle 25 Schematischer Ablauf der Färbung mit zeitlichem Ablauf

Auftauen der Proben/<i>CytoSpins</i> in feuchter Kammer 20min
Fixierung mit <i>CellSave</i>® 10min (<i>CellSave</i>® Blutentnahmeröhrchen verdünnt mit 9ml DPBS)
Waschen mit destilliertem Wasser 1x 5min
Waschen mit <i>Dako</i> ® Waschpuffer 2x 5min
Permeabilisierung mit <i>Triton</i> 10min
Waschen mit <i>Dako</i> ® Waschpuffer 2x 5min
Behandlung <i>Dako</i>® Protein Block für 10min
Nur Abtropfen, KEIN WASCHVORGANG
<u>Antikörper Mix I</u>
C11-Maus 1:400
AR-Kaninchen-D6F11 1:100
gelöst in <i>Dako</i>® <i>Antibody Diluent</i>
Inkubation für 60min bei Raumtemperatur
Waschen mit <i>Dako</i> ® Waschpuffer 3x 5 min
<u>Antikörper Mix II</u>
AF594-Esel-anti-Kaninchen 1:500
CD45-Z6-AF647 1:20
DAPI 1:5000
gelöst in <i>Dako</i>® <i>Antibody Diluent</i>
Inkubation für 30min bei Raumtemperatur
Waschen mit <i>Dako</i> ® Waschpuffer 2x 5min
Waschen mit destilliertem Wasser 1x 5min
Einbetten in <i>Dako</i>® <i>Mounting Medium</i>
Abdecken mit Deckgläschen

AR: Androgenrezeptor; C11: Zytokeratinmarker; CD45: Leukozytenmarker; DPBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

3.3. Vergleich der klinisch-pathologischen Daten des Patientinnenkollektivs

Blutproben von 67 metastasierten Mammakarzinompatientinnen wurden im Rahmen der Arbeit untersucht. Das Patientinnenkollektiv bestand zu 79% aus postmenopausalen Frauen, 18 % der Patientinnen waren prämenopausal, bei 3 % war der Menopausenstatus unbekannt. Im Patientinnenkollektiv wiesen 10 Patientinnen (14,9%) ein *TNBC* auf während 55 einen HR-positiven Primärtumor ohne überexprimierten HER2-Rezeptor und zwei Patientinnen einen überexprimierten HER2-Rezeptor zeigten. Hier handelte sich am ehesten um einen Screeningfehler, da in die DETECT-Studien Patientinnen mit HER2-negativen Primärtumoren und/oder Metastasen eingeschlossen wurden. Bei 46 Patientinnen (69%) konnte der Hormonstatus des Primärtumors mit dem Hormonstatus der Metastase verglichen werden. Bei sechs Patientinnen änderte sich der Expressionsstatus der Hormonrezeptoren. Bei 5 von 46 Patientinnen (11%) zeigten sich HR-positive Primärtumoren, die nachgewiesenen Metastasen waren hingegen *triple-negativ*. Ein *TNBC* Primärtumor (2%) exprimierte in der Metastase sowohl den Östrogen- als auch Progesteronrezeptor. Der Vergleich der Rezeptorexpressionsmuster des Primärtumors und der Metastasen sind in der Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26 Vergleich der Rezeptorexpressionsmuster der Primärtumoren und der Metastasen der Patientinnen

	Metastase HR⁺HER2⁻	Metastase <i>TNBC</i>	
Primärtumor HR⁺HER2⁻	35	5	40
Primärtumor <i>TNBC</i>	1	5	6
	36	10	46

TNBC: *triple-negatives* Mammakarzinom; HR⁺: Hormonrezeptor positiv HER2⁻: *human epidermal growth factor receptor 2*

14 der 67 Patientinnen (21%) hatten ausschließlich Knochenmetastasen, während bei 52 Patientinnen (78%) ein Viszeralbefall bekannt war. Bei einer Patientin war das Metastasierungsmuster nicht bekannt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme und des Studieneinschlusses befanden sich 26 von 67 Patientinnen (39%) in der Erstlinientherapie. Bei 41 von 67 Patientinnen (62%) wurde die Therapie schon

mindestens einmal gewechselt. Die klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen werden in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27 Klinisch-pathologische Daten des Patientinnenkollektivs

Faktor	Anzahl der Patientinnen (n=67)	
Gesamt	67	(%)
Menopausalstatus		
Prämenopausal	12	(17,9)
Postmenopausal	53	(79,1)
Unbekannt	2	(2,9)
Metastasenlokalisation		
Ausschließlich Knochenmetastasen	14	(20,8)
Viszeralbefall	52	(77,6)
Unbekannt	1	(1,5)
Tumorsubtyp Primärtumor		
HR + HER2 ⁻	55	(82,1)
TNBC	10	(14,9)
HR + HER2 ⁺ *	2	(3,0)
Tumorsubtyp Metastase		
HR + HER2 ⁻	36	(53,7)
TNBC	10	(14,9)
Unbekannt	21	(31,3)
Therapieverlauf		
Erstlinien-Therapie	26	(38,8)
≥ 2-Linie Therapie	41	(61,2)

HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2*; HR⁺: Hormonrezeptor positiv; TNBC: *triple-negatives* Mammakarzinom

* HER2-positiv-Status: Screeningfehler – Einschlusskriterium ist HER2-negativ-Status

3.4. CTC Nachweis im untersuchten Patientinnenkollektiv

Es wurden Proben von 67 Patientinnen, im Rahmen des Forschungsprojektes standardisiert ausgewertet. Eingeschlossen wurden die Patientinnen, die im *Cellsearch EpithelialKit*® (Screeningprobe) CTC-positiv getestet waren (Abbildung 4). Bei 37 von 67 Patientinnen (55%) konnte in der *ProfileKit*®-Probe (Parallelprobe) mindestens eine CTC nachgewiesen werden. Im Mittelwert wurden im *ProfileKit*® 3 CTCs erkannt, der Median betrug 1 CTC bei einer Spannweite der Häufigkeit von 0-101 CTCs. Die Häufigkeitsverteilung wird in Tabelle 29 dargestellt.

In Tabelle 28 werden die statistischen Kenngrößen und Mittelwerte des CTC-Nachweises im *EpithelialKit*® und *ProfileKit*® verglichen.

Tabelle 28 Vergleich der statistischen Größen zwischen Anzahl der CTCs im *EpithelialKit*® mit der Anzahl der CTCs in der AR-Analyse

	N	Minimum	Maximum	Summe	Mittelwert	Median	Standard- abweichung
Anzahl der nachgewiesenen CTC <i>EpithelialKit</i> ®	67	1	3000	7006	109,47	24,50	378,161
Anzahl der nachgewiesenen CTC im <i>ProfileKit</i> ®	67	0	101	212	3,16	1	12,406

CTC: zirkulierende Tumorzellen; N: Anzahl der Patientinnen

Bei 45% (30 von 67) der Patientinnen konnten in den untersuchten *ProfileKit*®-Proben keine CTCs detektiert werden. Bei 16,2% (6 von 37) Patientinnen zeigten sich in der Auswertung des *ProfileKit*® mehr als 5 CTCs. Die Anzahl der CTC-positiven Zellen im untersuchten Kollektiv wurde in der Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29 Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) in der Androgenrezeptor-Analyse der *ProfileKit*® Probe: Anzahl der Proben (%)

CTC-Anzahl	Häufigkeit (n)	Prozent
0	30	44,8
1	12	17,9
2	8	11,9
3	8	11,9
4	3	4,5
7	1	1,5
8	1	1,5
9	1	1,5
10	1	1,5
13	1	1,5
101	1	1,5
Gesamt	67	100,0

3.5. AR-Status im untersuchten Patientinnenkollektiv

Es wurden Proben von 67 Patientinnen im Rahmen der Analyse ausgewertet. Bei 37 der 67 Patientinnen (55%) konnten CTCs im peripheren Blut nachgewiesen werden. Die Zellen wurden nach ihrer AR-Expression charakterisiert. Bei 16 der 37 CTC-positiven Patientinnen (43%) konnte mindestens 1 AR-positive CTC nachgewiesen werden (Abbildung 4 und Tabelle 31). Bei 25 der 37 CTC-positiven Patientinnen (68%), die mehr als 1 CTC aufgewiesen haben, konnte auch die Heterogenität der AR-Expression untersucht werden. Es wiesen 8 der 25 Patientinnen (32%) eine Heterogenität mit sowohl AR-positiven als auch AR-negativen CTCs auf. Bei 3 der 25 Patientinnen (12%) wurde ein homogenes AR-positives Bild beobachtet, bei 14 der 25 Patientinnen (56%) ein homogenes AR-negatives Bild (Tabelle 30).

Daraus ergibt sich ein AR-positiver Anteil von 43% der CTC-positiven Patientinnen (16/37 Patientinnen) und 24% aller untersuchten Patientinnenproben (16/67 Patientinnen).

Tabelle 30 Heterogenität der AR-Expression bei Patientinnen, die mehr als 1 CTC aufgewiesen haben

		CTC Anzahl n	>1 CTC (%)
AR-Expression der nachgewiesenen CTC im <i>ProfileKit</i> ®	nur AR-positiv	3	(12)
	nur AR-negativ	14	(56)
	AR-positiv/ AR-negativ	8	(32)
		25	(100)

Nur Androgenrezeptor (AR) pos.: Es wurden nur AR-positive zirkulierende Tumorzellen (CTCs) detektiert;
Nur AR-neg: es wurden nur AR-negative CTCs detektiert, ARpos/ARNeg: Heterogene Population,
CTC (zirkulierende Tumorzelle)

Sowohl bei den TNBC als auch bei den HR-positiven Tumoren konnten AR-positive Zellen nachgewiesen werden. Bei 2 der 6 CTC-positiven TNBC-Patientinnen zeigten sich AR-positive CTCs (33%), während bei 14 von 30 CTC-positiven HR-positiven HER2-negativen Patientinnen AR-positive CTCs (47%) detektiert wurden (Tabelle 27).

Es konnte keine statistische Signifikanz zwischen der AR-Positivität der CTCs und der etablierten klinisch-pathologischen Faktoren gezeigt werden. Die Ergebnisse des CTC-Nachweises und die AR-Analyse im Vergleich zu den klinisch-pathologischen Faktoren des untersuchten Kollektivs werden in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31 Korrelation der klinisch-pathologischen Daten mit den Ergebnissen der quantitativen AR-Analyse

Faktor	CTC-positiv (n=37)		AR-Nachweis auf CTCs (n=16)		p-value AR- Nachweis
	N	(%)	N	(%)	
Gesamt	37	(100)	16	(43,2)	
Menopausalstatus					<.393
Prämenopausal	7	(18,9)	4	(25,0)	
Postmenopausal	28	(75,7)	11	(68,7)	
Unbekannt	1	(2,7)	1	(6,3)	
Metastasenlokalisation					<.588
Nur Knochenmetastasen	8	(21,6)	4	(25,0)	
Auch Viszeralbefall	28	(75,7)	11	(68,8)	
Unbekannt	1	(2,7)	1	(6,3)	
HR des Primärtumors					<.714
Positiv	29	(78,4)	12	(75,0)	
Negativ	6	(16,2)	2	(12,5)	
Unbekannt	2	(5,4)	2	(12,5)	
HER2					<.383
Positiv*	1	(2,7)	0		
Negativ	32	(86,5)	14	(87,5)	
Unbekannt	4	(10,8)	2	(12,5)	
Tumorsubtyp Primärtumor					<.564
HR + HER2 -	30	(81,1)	14	(87,5)	
TNBC	6	(16,2)	2	(12,5)	
HR + HER2 +*	1	(2,7)	0		
Tumorsubtyp Metastase					<.677
HR + HER2 -	25	(67,6)	9	(56,3)	
TNBC	3	(8,1)	2	(12,5)	
Unbekannt	9	(24,3)	5	(31,2)	
Therapieverlauf					<.306
Erstlinien-Therapie	15	(40,5)	8	(50,0)	
≥ 2-Linien Therapie	22	(59,5)	8	(50,0)	

CTC: zirkulierende Tumorzellen; AR: Androgenrezeptor; HR: Hormonrezeptor; TNBC: *triple-negatives* Mammakarzinom HER2: *Human epidermal growth factor 2*

* HER2 positiv Status: Screeningfehler – Einschlusskriterium ist HER2 negativ Status

3.5.1. AR-Expressionsmuster

Bei der Untersuchung des AR-Status ließen sich unterschiedliche Expressionsmuster beobachten. 11 der 16 AR-positiven Proben (69%) zeigten eine zytoplasmatische Färbung. Hier stimmten die Anreicherungsmuster mit den CK-gefärbten Färbereichen überein (Abbildung 14). Bei 5 der 16 AR-positiven Proben (31%) konnte eine Kernfärbung beobachtet werden, indem die Signalanreicherungen mit den Bereichen der DAPI-Färbung übereinstimmten (Abbildung 12).

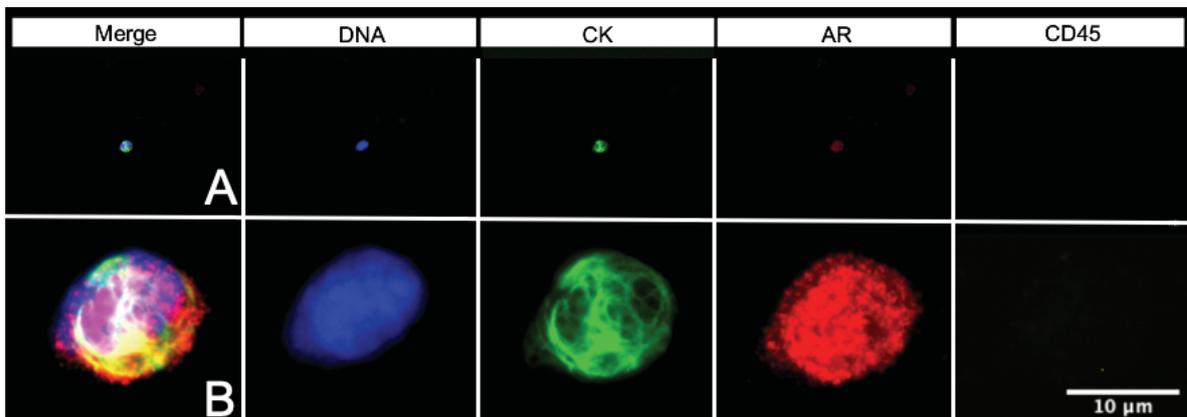


Abbildung 12 AR-positive Kernfärbung einer Patientinnenprobe

A: 40x Vergrößerung und B: Bildausschnitt in 63x Vergrößerung
 Merge: Überlagerung aller Kanäle; DAPI: anti-DNA 1:5000; CK: C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400;
 AR: D6F11 anti-AR-AK AF594 Kaninchen 1:100; CD45: 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20;.
 AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker, AF: Alexa Fluor

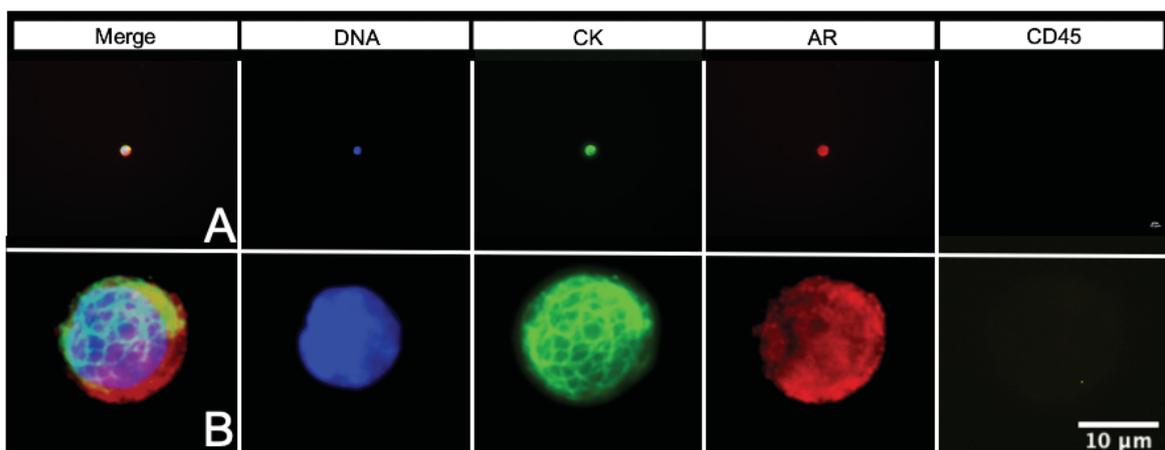


Abbildung 13 AR-positive Zytoplasmafärbung einer Patientinnenprobe

A: 40x Vergrößerung und B: Bildausschnitt in 63x Vergrößerung
 Merge: Überlagerung aller Kanäle; DAPI: anti-DNA 1:5000; CK: C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400;
 AR: D6F11 anti-AR-AK AF594 Kaninchen 1:100; CD45: 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20;.
 AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker, AF: Alexa Fluor

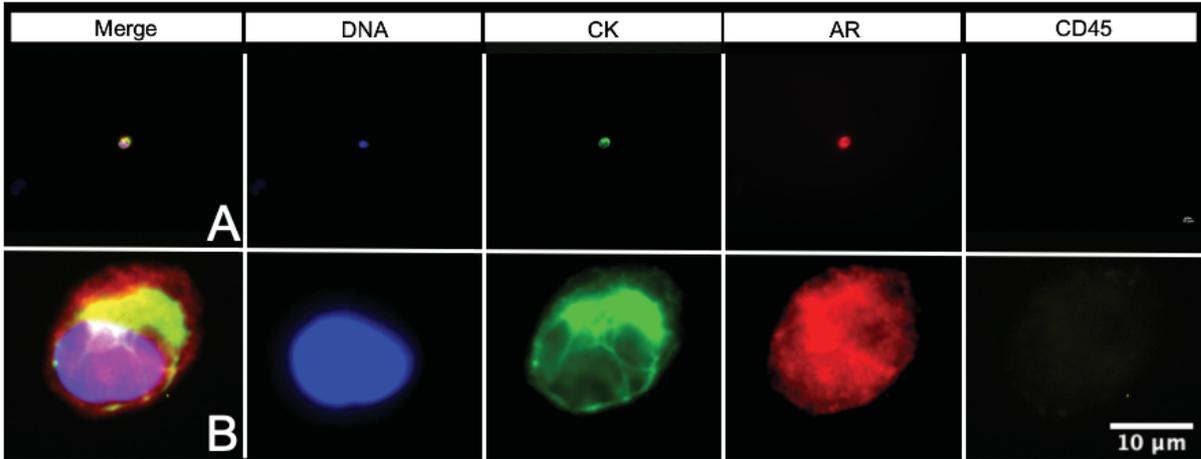


Abbildung 14 AR-positive Zytoplasmafärbung einer Patientinnenprobe

A: 40x Vergrößerung und B: Bildausschnitt in 63x Vergrößerung

Merge: Überlagerung aller Kanäle; DAPI: anti-DNA 1:5000; CK: C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400;

AR: D6F11 anti-AR-AK AF594 Kaninchen 1:100; CD45: 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20;.

AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker, AF: Alexa Fluor

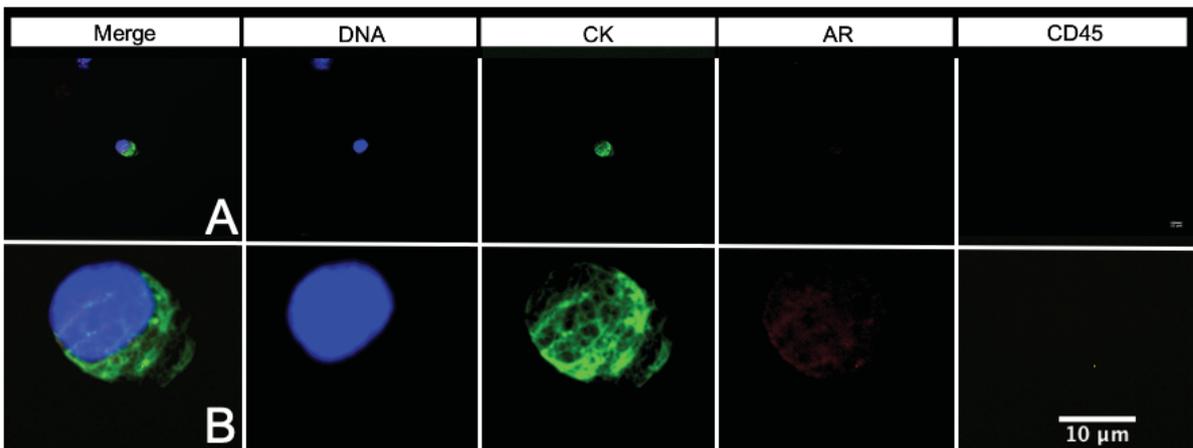


Abbildung 15 AR-negative Patientinnenprobe

A: 40x Vergrößerung und B: Bildausschnitt in 63x Vergrößerung

Merge: Überlagerung aller Kanäle; DAPI: anti-DNA 1:5000; CK: C11 anti-Zytokeratin-AK Maus 1:400;

AR: D6F11 anti-AR-AK AF594 Kaninchen 1:100; CD45: 35Z6 anti-CD45-AK AF647 Maus 1:20;.

AR: Androgenrezeptor; AK: Antikörper; CD45: Leukozytenmarker, AF: Alexa Fluor

3.5.2. Zusammenfassung der AR-positiven Ereignisse

Bei 16 Patientinnen konnte mindestens eine AR-positive CTC dargestellt werden. Die klinisch-pathologischen Daten dieser Patientinnen werden in Tabelle 32 vorgestellt. Das Expressionsmuster unterschied sich bei den Patientinnen, sodass elf Patientinnen ein zytoplasmatisches und fünf ein nukleäres AR-Expressionsmuster aufwiesen. Es fiel eine Heterogenität in dem Subtyp des Primärtumors, dem Menopausenstatus, der Behandlungslinie und der Metastasenlokalisierung auf. Zu diesen Parametern ließen sich keine Assoziationen darstellen.

In Tabelle 32 werden die klinisch-pathologischen Merkmale der Patientinnen mit AR-positiven CTCs aufgeführt.

Tabelle 32 Klinisch-pathologische Betrachtung der AR-positiven Proben und Patientinnen

Fall	Tumor-HR-status	Menopausenstatus	CTC in AR-Analyse	AR-Expression auf CTC	AR-Expressionsmuster	Anzahl der Therapielinien ¹	Metastasen Lokalisation
1	TNBC	Prämenopausal	2	AR+/ AR-	Kernfärbung	1	ossär und viszeral
2	TNBC	Prämenopausal	8	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung	0	ossär und viszeral
3	HR(+) HER2(-)	Prämenopausal	7	nur AR+	Kernfärbung	0	nur ossär
4	HR(+) HER2(-)	Prämenopausal	13	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung	0	nur ossär
5	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	3	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung	0	nur ossär
6	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	1	AR+	Kernfärbung	1	ossär und viszeral
7	HR(+) HER2(-)	n.d.	4	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung	0	n.d.
8	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	1	AR+	Kernfärbung	0	ossär und viszeral
9	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	4	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung	4	ossär und viszeral
10	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	1	AR+	Cytoplasmafärbung	1	ossär und viszeral
11	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	1	AR+	Kernfärbung	0	ossär
12	HR(+)* HER2(-)	Postmenopausal	10	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung	2	ossär und viszeral
13	HR(+)* HER2(-)	Postmenopausal	1	AR+	Cytoplasmafärbung	0	ossär und viszeral
14	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	3	nur AR+	Cytoplasmafärbung	7	nur ossär
15	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	3	nur AR+	Cytoplasmafärbung	0	nur viszeral
16	HR(+) HER2(-)	Postmenopausal	101	AR+/ AR-	Cytoplasmafärbung/ Kernfärbung	1	ossär und viszeral

AR: Androgenrezeptor; CTC: Zirkulierende Tumorzelle; n.d.: nicht dokumentiert; TNBC: Triple-negatives Mammakarzinom; HR: Hormonstatus (Östrogen- und Progesteronstatus); HER2: Humaner Epidermaler Rezeptor; „+“ positiv; „-“, negativ

¹Zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der metastasierten Situation

*Rezeptor des Primärtumors unbekannt – Hormonrezeptor der Metastase positiv

4. Diskussion

4.1. Hämatogene Metastasierung

Die Theorie der CTCs beruht auf der Annahme, dass die im Blut von Karzinompatienten nachgewiesenen epithelialen Zellen das Potenzial haben, in das Gewebe einzuwandern, um dort Metastasen zu bilden. Den Beweis, dass diese Zellen, maligne Eigenschaften besitzen und vom Primärtumor stammen, lieferten Fehm *et al.* in ihrer Studie von 2002 (122). CTCs können im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen sowohl in der primären als auch in der metastasierten Situation nachgewiesen werden. Darauf beruhend werden die CTCs in der metastasierten Situation für die *Liquid Biopsy* herangezogen. Die Bedeutung dieser Zellen ist umso interessanter, da sich bekannterweise beim Rezeptorprofil des Primärtumors und der Metastase therapierelevante Unterschiede zeigen (18, 20, 21). Dies bestätigte sich auch in den vorliegenden Daten. Dabei wurde bei einer im Primärtumor HR-positiven Patienten eine *triple-negative* Metastase festgestellt und bei einem *TNBC* eine hormonsensible Metastase. Aus diesem Grund wird in den aktuellen Therapieleitlinien für das Mammakarzinom empfohlen, im Falle einer Metastasierung, eine Biopsie der Metastase zur Neubestimmung des aktuellen Rezeptorstatus anzustreben (8, 14). Bei 6 der 37 Patientinnen (17%) mit nachgewiesenen CTCs konnten keine immunohistochemischen Untersuchungen der Metastasen durchgeführt werden. Besonders bei Knochenmetastasen kann häufig keine Probensicherung und Phänotypisierung erfolgen. Diese Einschränkung der Probengewinnung ließe sich durch die *Liquid Biopsy* umgehen. Bei den nicht untersuchten Metastasen in unserem Kollektiv handelt es sich auch zum Großteil um Knochenlokalisation. Gleichzeitig lassen sich die therapierelevanten phänotypischen Unterschiede auch zwischen CTCs, dem Primärtumor und/oder Fernmetastasen nachweisen (19-21). In diesem Kontext wird derzeit diskutiert, ob nicht die CTCs den Phänotyp der aktuell dominierenden Tumorzellklons am besten repräsentieren würden (30, 31). Somit stellen die CTCs und ihr Phäno- und/oder Genotyp einen potentiellen prädiktiven Biomarker, anhand dessen schnell und unkompliziert therapeutisch relevante Informationen abgeleitet werden könnten.

Die Relevanz der *Liquid Biopsy* wurde zuletzt mit der FDA Zulassung von Alpelisib zur Therapie des MBCs bei nachgewiesener PIK3CA Mutation unterstrichen. Diese

Mutation kann, sowohl auf dem Primärtumor als auch in der *Liquid Biopsy* nachgewiesen werden. Es ließ sich zeigen, dass die Patientinnen mit einer in der *Liquid Biopsy* nachgewiesenen PIK3CA-Mutation ebenfalls von der Therapie mit dem PIK3CA-Inhibitor profitieren (24).

4.2. Androgenrezeptorstatus

Die Rolle des AR-Status beim Mammakarzinom wird in der aktuellen Literatur diskutiert, doch sind sich die Autoren einig, dass der AR als vielversprechende potenzielle Zielstruktur die Therapie eines Teils der Mammakarzinompatientinnen revolutionieren könnte. Eine antiandrogene Therapie, die in der Behandlung des Prostatakarzinoms lange etabliert ist, wird derzeit im Rahmen zahlreicher klinischer Studien beim MBC evaluiert mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen (Tabelle 5).

Der AR-Status wird beim Mammakarzinom nicht routinemäßig bestimmt, sodass im Falle der Frage nach der Möglichkeit einer antiandrogenen Therapie in der metastasierten Situation eine invasive Metastasenbiopsie oder Nachbestimmung auf dem Primärtumorgewebe erfolgen müsste. In diesem Kontext würde der AR-Status der CTCs möglicherweise eine minimal invasive Alternative darstellen. Auch hier stellt sich die Frage, wie der AR-Status des Primärtumors, der Metastase und der CTCs zueinanderstehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der AR-Status von CTCs im Kollektiv von MBC-Patientinnen bestimmt. Es konnte allerdings keine Aussage zur AR-Expression des Primärtumors und/oder der Metastasen getroffen werden, da aufgrund des multizentrischen Studiendesigns kein Tumorgewebe der Patientinnen, deren CTCs untersucht wurden, zur Verfügung stand. Fujii, *et al.* und de Kruijff, *et al.* verglichen in ihren Arbeiten die AR-Expression des Primärtumors und der CTCs im Mammakarzinom (102, 103). In der Kohorte von Fujii, *et al.* ließen sich nur 37 von 68 Primärtumore mit Immunhistochemie nachanalysieren, da auf die weiteren Gewebeproben ebenfalls kein Zugriff bestand. Der *Cut-Off* Wert für AR-Positivität wurde in dieser Studie am Primärtumor auf 10% festgelegt (102). Fujii, *et al.* gelang der Vergleich von AR-Expression des Primärtumors des MBCs und CTCs in sieben Fällen (102). Dabei konnten in drei von sieben Fällen (43%) AR-positive CTCs bei AR-negativem Primärtumor nachgewiesen werden. De Kruijff,

et al. konnten in ihrer Kohorte von 119 Patientinnen sogar eine AR-Diskordanz zwischen Primärtumor und CTCs von 58% nachweisen (103). Diese Diskrepanz konnte auch schon für andere *targets* zielgerichteter Therapien, wie ER, HER2 und PIK3CA gezeigt werden (19, 24, 111).

Gleichzeitig besteht derzeit noch keine Klarheit, welche MBC-Patientinnengruppe von den potenziellen neuen gegen AR-gerichteten Therapien am stärksten profitieren würden. Weder *Cut-Off* Kriterien für eine AR-Positivität noch Therapieeinschlusskriterien sind bis jetzt vereinheitlicht, sodass Studienergebnisse schlecht verglichen und eingeordnet werden können. Aktuelle Forschungs- und Studienergebnisse des AR bei MBC beziehen sich auf die AR-Expression im Gewebe des Primärtumors oder der Metastase. Der CTC-Status blieb bei den aktuellen Studien (Tabelle 4) unberücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die AR-Expression auf CTCs von MBC-Patientinnen untersucht. Bislang wurde die AR-Expression auf CTCs vorwiegend beim Prostatakarzinom untersucht und nur vereinzelt in Tumoren anderer Entität (Vgl. Tabelle 4 und Tabelle 5).

Deutlich häufiger wurde bis *dato* der AR auf Gewebeproben der Primärtumoren untersucht. Die Ergebnisse aus Gewebeanalysen müssen erst mit den Analysen der CTC-Forschung assoziiert werden. Ein Teil der zur Verfügung stehenden Daten stammt aus der Prostatakarzinomforschung, in der der AR schon seit längerer Zeit eine therapierelevante Zielstruktur darstellt (Tabelle 5). In Untersuchungen zum Therapieansprechen des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms konnte die AR-Expression in CTCs genutzt werden, um bei kastrationsresistenten Tumoren ein Zweitlinientherapieansprechen vorherzusagen (99, 105). Für das MBC gibt es bis *dato* nur vereinzelte Studien, die die AR-Expression auf CTCs beobachten (94, 102, 103). In diesen Arbeiten wurde für eine AR-Positivität ein *Cut-Off* Wert von einer AR-positiven CTC festgelegt (94, 102). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein *Cut-Off* Wert von einer positiven Zelle gewählt. In Arbeiten zur AR-Expression im Tumorgewebe von Mammakarzinomen variieren die *Cut-Off* Werte (Vgl. Tabelle 4). Histopathologisch werden Tumoren als AR-positiv deklariert, wenn in einem bestimmten Anteil der Tumorzellen im untersuchten Präparat eine AR-Färbung nachgewiesen werden kann. Dieser Anteil ist aktuell noch uneinheitlich und schwankt zwischen 1% und 10% (Vgl. Tabelle 4) (92, 93). In ersten Studien zur Anwendung einer antiandrogenen Enzalutamid-Therapie konnten Parker, *et al.* im

TNBC Subtyp zeigen, dass unterschiedliche AR-Expressionsstärken unterschiedlich hohe progressionsfreie Intervalle begünstigen. Patientinnen, die einen histopathologischen AR-Nachweis von größer 10% hatten, zeigten ein längeres PFS, als Patientinnen mit einem Nachweis von 1%-10%, die Differenz bestand allerdings nur in zwei Wochen (10%: 14,7 Wochen PFS 1-10%: 12,6 Wochen PFS) (123).

Zusammenfassend handelt es sich beim AR um eine mögliche Zielstruktur in der zukünftigen Behandlung von MBC-Patientinnen. In diesem Kontext kann die Expression von AR auf CTCs einen prädiktiven Marker zur Abschätzung des Therapieerfolgs mit Antiandrogenen darstellen. Wie hoch die klinische Relevanz der CTC-Charakterisierung in diesem Zusammenhang ist, muss in weiteren Studien evaluiert werden. Des Weiteren sollte die AR-Expression des Primärtumors, der Metastase und CTCs in größeren Kollektiven verglichen werden.

4.2.1. Die Rolle des Androgens und des AR-Status beim HR-positivem Mammakarzinom

Der AR scheint bei ER-positiven Tumoren Einfluss auf die leitliniengerechte Therapie zu haben. So konnten Peters *et al.* den AR bei Hormontherapie-resistenten ER-positiven Tumoren vermehrt nachweisen und eine prognostische Relevanz der AR-Expression für die ER-gerichtete Therapie ableiten (87). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auch Proben von Patientinnen mit HR-positiven Primärtumoren in die Experimente einbezogen. In vielen Arbeiten beschränkt man sich auf den TNBC (Vgl. Tabelle 4) (90, 92, 96, 124). Aceto *et al.* konnten beobachten, dass die Patientinnen, die AR-positive CTCs aufwiesen, öfter unter verlängerter AI-Therapie standen (94). Eine erhöhte AR-Expression ist im Körper zu finden, wenn entweder der Östrogenstimulus gesenkt oder der Androgenstimulus erhöht wird. Dies kann medikamentös durch einen AI induziert sein oder vom Menopausenstatus der Patientin abhängen. Der AI führt zu einem verminderten Östrogenstimulus, welcher wiederum eine verstärkte Expression von AR induziert (125). Dieser Mechanismus könnte bei Patientinnen, die nach Anti-ER-gerichteter, endokriner Therapie Rezidive entwickeln, genutzt werden, um beispielsweise mit einer Anti-AR-gerichteten Behandlung therapeutisch zu

intervenieren. In diesem Kontext könnten im weiteren Verlauf die CTCs und die *Liquid Biopsy* zum Monitoring herangezogen werden. Diese Vermutungen unterstützten auch die Arbeiten von Peters *et al.* zur Koaktivierung und den nachgewiesenen Interaktionen zwischen Östrogen und dem AR (87, 95). Die dynamischen Veränderungen beim therapeutischen Eingriff in den Hormonhaushalt mit beispielsweise AI unterstreichen die Notwendigkeit eines zuverlässigen Echtzeit-Therapiemonitorings um gerade Frauen in einer metastasierten Situation eine adäquate individualisierte Therapie zukommen zu lassen. Des Weiteren konnte im Zellkulturexperiment bei einer AR-Überexpression eine Tamoxifenresistenz und bei Induktion einer Anti-AR-gerichteten Therapie eine erneute Sensibilität gegen die endokrine Therapie beobachtet werden (86). Wenn sich dieser Zusammenhang auch in größeren Studien *in vivo* bestätigt, kann ein Echtzeit-Therapiemonitoring der AR-exprimierenden CTCs zur Einschätzung oder Optimierung der Anti-ER-gerichteten Therapie genutzt werden. Die Androgenspiegel sind bei Frauen deutlich geringer, was die reduzierte AR-Aktivität im Mammakarzinomgewebe erklären könnte. Die inaktive AR-Form lässt sich im Zytoplasma darstellen, was in unserem Kollektiv bei mehreren Patientinnen beobachtet wurde (101). Steigende Androgenspiegel in der Postmenopause und unter Anti-ER-Therapie könnten wiederum zu einer AR-Aktivierung führen, welche dann hormonsensitive Tumorzellen in der Interaktion mit dem *estrogen response element* stimuliert (125). Die aktive Form des AR wird im Zellkern dargestellt. Allerdings waren zwei der 5 Patientinnen mit nukleärer AR-Lokalisation auf CTCs in unserem Kollektiv prämenopausal und keine von ihnen wurde zur Zeit der Blutentnahme mit AI behandelt, sodass weder der verminderte Östrogenstimulus noch eine erhöhte Testosteronkonzentration eine Erklärung für das Phänomen darstellen. Die absoluten Konzentrationen von Östrogen und Testosteron liegen im Rahmen des Studiendesigns nicht vor. Die Größe der Stichprobe der vorliegenden Studie lässt keine Aussage zum Einfluss von Menopausenstatus oder AI-Gabe auf die Lokalisation des AR zu.

4.2.2. Die Rolle des Androgens und des AR-Status beim TNBC

Es werden beim TNBC vier Subtypen diskutiert, der Basaltyp 1 und 2, der Mesenchymaltyp und der luminale AR-Typ. TNBC zeigen insgesamt eine ungünstige Prognose. Es gibt bis auf neue Ansätze der Immuntherapie bei PD-L1-Positivität keine zielgerichtete Behandlung für TNBC, sodass die Patientinnen aktuell nahezu ausschließlich zytostatisch therapiert werden (97). Aus diesem Grund wird besonders beim TNBC kontinuierlich nach neuen zielgerichteten Behandlungsmöglichkeiten und prädiktiven Faktoren zur Abschätzung des Therapieerfolgs gesucht. Der luminale AR-Typ definiert sich über eine AR-Positivität unter den TNBC-Typen und verhält sich klinisch weniger maligne (96). Er zeichnet sich durch ein eher langsames Tumorwachstum aus und reagiert weniger gut auf die leitliniengerechte Chemotherapie als die TNBC-Tumoren vom Basaltyp 1 (80, 97). Gleichzeitig werden beim luminalen AR-Typ des TNBC häufiger große Tumore mit hohem Nodalbefall beobachtet (92).

Die AR-Expression könnte möglicherweise einen Subtyp des TNBC definieren, der mit zielgerichteter Anti-AR-Therapie spezifisch behandelt werden kann. Diese Fragestellung wird, wie bereits erwähnt, im Rahmen klinischen Studien geklärt (Tabelle 4). Besonders im metastasierten Kollektiv könnte hier der AR-Status der CTCs als prädiktiver Faktor dienen und Rückschlüsse über das Therapieansprechen im Laufe der Behandlung ziehen lassen (81, 84, 87, 88, 94-97). In den vorliegenden Daten zeigten 2 von 6 Patientinnen, die CTCs und einen *triple-negativen* Primärtumor aufwiesen, eine AR-Expression. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass der AR auf CTCs von TNBC Patientinnen exprimiert wird. Im Rahmen von größeren Kollektiven sollte die Wirkung von Anti-AR-Therapie auf die AR-Expression von CTCs tiefergehend untersucht werden.

4.1. Fragestellungen zur Methodik

Es handelt sich bei der etablierten Färbung um eine immunzytologische Dreifach-Fluoreszenzfärbung. Dabei kann die Rezeptorexpression der CTCs auf Proteinebene beurteilt werden. In der Regelversorgung werden die

Rezeptorexpressionsmuster am Primärtumor ähnlich charakterisiert. Die Färbung deckt alle relevanten molekularen Untertypen des AR ab (126) (Vgl. Abbildung 3).

Eine Immunfluoreszenzfärbung ist für die spezifische molekulare Unterscheidung nicht geeignet, könnte aber durchaus als Screeningmethode vor einer kostenintensiveren molekularen Untersuchung durchgeführt werden.

Die Nachweismethode in dieser Arbeit beruht auf der EpCAM-basierten *CellSearch*® Technologie. Sie stellt die einzige Methode dar, welche von der FDA zugelassen und intensiv zum CTC-Nachweis etabliert wurde (127).

4.1.1. EpCAM-basierte Zellanreicherung

In dieser Arbeit wurde das *ProfileKit*® des *CellSearch*® Systems zur CTC-Zellanreicherung verwendet. Das *CellSearch*® System wird von einigen Autoren aufgrund seiner alleinigen EpCAM-Anreicherung kritisiert, allerdings stellt es aktuell das standardisierte und anerkannte Verfahren zur CTC-Anreicherung dar (128). FDA-zugelassen ist es nur für das *EpithelialKit*®. Sowohl das *EpithelialKit*® als auch das *ProfileKit*® basieren auf der alleinigen EpCAM Anreicherung, dabei unterscheiden sie sich darin, ob wie im *EpithelialKit*® eine automatische Markierung der detektierten CTCs oder wie im *ProfileKit*® die alleinige Zellanreicherung mittels EpCAM-markiertem-Ferrofluid durchgeführt wird (129) (Vgl. Tabelle 10). Es wird von vielen Autoren diskutiert, ob EpCAM positive oder eher EpCAM negative CTCs für die Metastasierung entscheidend sind. Diese Diskussion wird auch bei AR-exprimierenden CTCs geführt, denn *Crespo et al.* konnte mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung EpCAM-negative CTCs mit AR-Expression darstellen (99, 102). Viele Forschungsgruppen nutzen daher für ihre translationale Untersuchungen und die Charakterisierung von CTCs EpCAM-unabhängige Anreicherungsverfahren. Einige dieser Verfahren sind schonender für die Zellen, da sie beispielsweise nur auf Filtration oder fließende Bewegung in einem magnetischen Feld basieren (94, 130). Für die immunzytochemische Bearbeitung sind häufige Zentrifugationsschritte und Waschvorgänge notwendig, diese können die Zellen allerdings angreifen und die ohnehin geringe Zellzahl reduzieren. Um die Qualität der Experimente zu verbessern, verzichteten einzelne Arbeitsgruppen auf Fixanzien und arbeiten ihre Proben aus EDTA-Blut auf (129, 130). Auf eine

Fixierung kann im Rahmen einer multizentrischen Studie nicht verzichtet werden, da vor dem Beginn der Verarbeitung der Probe, die räumlichen Distanzen zu einem Studienlabor überwunden werden müssen. Bei einer maximalen Verarbeitungszeit von 72h zeigte sich eine gute Qualität der Zellen und eine hohe Ausbeute (131).

4.1.2. Diskussion der Zellzahl

Bei der Aufarbeitung im *ProfileKit*® wurden im Vergleich zur Primärprobe aus dem *EpithelialKit*® nur wenige CTCs detektiert. Dies liegt hauptsächlich in der Aufteilung des Experimentalproduktes begründet. Zuerst wurde die Blutprobe mit dem *EpithelialKit*® verarbeitet, wenn eine hohe CTC Anzahl (>5 CTC) detektiert werden konnte, wurde das Endprodukt des danach in einer Parallelprobe aufgearbeiteten *ProfileKit*® in mehrere Experimentalansätze aufgeteilt, sodass es für mehreren Forschungsfragen verwendet werden konnte (Abbildung 4). Dies bedeutet, dass die Proben, die im *ProfileKit*® aufgearbeitet werden, die quantitative Beurteilung bereits durchlaufen konnten. In der aufeinander aufbauenden Verarbeitung der Blutproben besteht die Stärke des Patientinnenkollektives für die vorliegenden Experimente. Obwohl CTCs seltene Ereignisse darstellen und viele CTCs in der Blutbahn zerstört werden, können in den Arbeiten der DETECT-Studienfamilie hohe CTC- Zellzahlen erreicht werden (35-37, 43). Zu vergleichen sind die Arbeiten von Aceto *et al.* und Fujii *et al.*, die die AR-Expression auf CTCs mit unterschiedlichen Verfahren darstellen konnten. Aceto *et al.* zeigten 77 Ereignisse bei 22 Patientinnen, durchschnittlich 3,5 CTCs pro Probe und Fujii *et al.* zeigten 240 positive CTCs bei 40 Patientinnen, dies bedeutet 6 CTCs pro Probe (94, 102). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 212 CTCs auf 37 Proben analysiert, dies entspricht durchschnittlich 5,7 CTCs pro Probe und nähert sich den Ergebnissen von Fujii *et al.* an. Die hohe Zellzahl in der vorliegenden Arbeit trotz Verdünnung des Experimentalproduktes, liegt in der gründlichen Kollektivierung der Patientinnenproben begründet, sodass diese mit den veröffentlichten Arbeiten verglichen werden können.

Häufig wurden im Rahmen von Experimenten zur Etablierung des *ProfileKit*®-Systems die Verarbeitungszeiten von 2h ermöglicht. Dies wird von Flores *et al.* als Faktor für ihre hohen Zellzahlen im *ProfileKit*® diskutiert (129). Flores *et al.* konnten

den Zellverlust so stark minimieren, dass sie im *ProfileKit*® sogar mehr Zellen nachweisen konnte als im *EpithelialKit*®. In unseren Untersuchungen wurden die Proben des *ProfileKit*® und des *EpithelialKit*® analog verarbeitet. Hieraus resultieren auch prolongierte Verarbeitungszeiten, die sich vor allem aus den innerdeutschen Transportwegen erklären. In den Studienlaboren wurden die Proben möglichst schnell verarbeitet, wobei das *EpithelialKit*® priorisiert wurde und erst danach das *ProfileKit*® für die translationalen Forschungsprojekte verarbeitet wurde. Die *CytoSpins* wurden bis zur Umsetzung der Forschungsarbeit gefroren gelagert. Flores *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit, dass sie die beste Zellqualität bei möglichst schneller Verarbeitung von weniger als 2h erzielen konnten (129).

Die in dieser Arbeit etablierte immunzytochemische AR-Rezeptorfärbung kann für eine Routineuntersuchung nutzbar gemacht werden, da sie sich mit dem *CellSearch*® System kombinieren lässt. Das etablierte Färbeprotokoll wurde auf ein Minimum an Wasch- und Zentrifugationsvorgänge reduziert, um einen Zellverlust der CTCs zu verhindern und die Einzelzellen zu schonen. Das Ferrofluid, an welches EpCAM gekoppelt wird, steht im Verdacht, bei gehäuften Zentrifugationsschritten beispielsweise bei der Verarbeitung zu *CytoSpins* zu einer schlechteren Zellqualität zu führen (127). Diese Vermutung konnte in den Experimenten, welche im Rahmen der Etablierung durchgeführt wurden, nicht bestätigt werden. Die Zellqualität ist bei der Aufarbeitung in Suspension ähnlich wie in der Verarbeitung auf dem Objektträger.

Bei relativ kleinen Zellzahlen ermöglicht diese Arbeit einen Einblick in die Charakterisierung einzelner CTCs, kann aber keinen Überblick über alle CTCs oder die eigentliche CTC-Anzahl in der Probe geben. Vor allem bei den TNBC-Patientinnenproben, welche auch mit geringerer Zellanzahl im *CellSearch*® *EpithelialKit* eingeschlossen wurden, konnten nur wenige oder gar keine CTCs in der AR Analyse des *ProfileKits* gefunden werden. Daher ist davon auszugehen, dass der Anteil der Patientinnen bei denen CTCs nachgewiesen werden könnten größer als 55% ist und die quantitative Auswertung der Ergebnisse nur eingeschränkt zu beurteilen ist (Vgl. Tabelle 2).

4.1.3. Diskussion der AR-Antikörperauswahl

In dieser Arbeit wurden mehrere AR-Antikörper getestet. Dabei fiel auf, dass nicht alle Antikörper, die kommerziell als solche vermarktet werden, spezifisch mit dem AR reagieren. Für den N-20-Klon konnte ein *Blocking Peptide* erworben werden, welches vollständig mit dem AR-Antikörper reagiert. Das *Blocking Peptide* ist ein Peptid, das vom Antikörper spezifisch erkannt wird, in diesem Fall also ein Peptid aus dem AR. Durch die höhere Konzentration an *Blocking Peptide* wird sichergestellt, dass alle Antikörper mit *Blocking Peptide* gesättigt sind und somit nicht mehr das in den Zellen exprimierte Epitop binden kann. Mit dem N-20 Klon ließ sich weder die Zelllinien DU145 noch 5637 etablieren, auch diese Zellen zeigten analog zur Positivkontrolle ein positives Signal. Da es sich gerade bei der DU145 um eine exzellent etablierte AR-Negativkontrolle handelt, musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem N-20 Klon nicht um einen AR-spezifischen Antikörper handelt. Das Produkt wurde von *Santa Cruz Biotechnology* aus dem Verkauf genommen und durch eine monoklonale Version ersetzt. Viele Arbeiten konnten trotz der Verwendung des N-20 im Immunoblotting Daten zum AR publizieren. Teilweise konnten sehr viele AR-positive Tumore identifiziert werden, was möglicherweise an uneinheitlichen *Cut-Off* Werten für AR-Positivität des Tumorgewebes liegt, aber ließe sich auch mit einem ggf. falsch positiven Antikörper erklären (87). In einigen publizierten Arbeiten wurde der N-20 Klon für die Chromatin-Immunpräzipitation zur Darstellung der Interaktion des AR mit dem *estrogen response element* genutzt. Dabei ist entscheidend, wie spezifisch der Antikörper zur Detektion des AR ist. In den Arbeiten zur Chromatin-Immunpräzipitation wurde in einigen Arbeiten der N-20 Klon genutzt und in der Publikation auf die Darstellung einer Negativkontrolle verzichtet (87, 98, 106, 108, 132, 133). In den Vorexperimenten zur Etablierung der Färbung im Rahmen dieser Arbeit zeigte der N-20 Klon keine spezifische Reaktion auf den AR. Es fällt auf, dass in vielen Arbeiten zur Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von dem AR-Antikörperklon N-20 zu einem Antikörper eines anderen Herstellers gewechselt wurde (87, 98, 106, 108, 132, 133). Der in dieser Arbeit angewendete monoklonale Antikörper D6F11 zeigte sich als hochspezifisch. Ein *Blocking Peptide* ist für diesen monoklonalen Antikörper nicht erhältlich, sodass die Etablierung des Antikörpers anhand einer Positiv- und einer Negativkontrolle erfolgte. Der AR-Antikörper D6F11

konnte beim Prostatakarzinom bereits für das *CellSearch*® System etabliert und zum Therapiemonitoring bei kastrationsresistenten Prostatakarzinomen eingesetzt werden (99).

4.1.4. Vergleiche zur Therapie des Prostatakarzinoms

Es ist davon auszugehen, dass analog zum Prostatakarzinom auch beim Mammakarzinom nicht nur die Rezeptorexpression auf Proteinbasis, sondern auch der molekulare Aufbau des Rezeptors entscheidend für die antiandrogene Therapie ist. Im Prostatakarzinom konnte die AR-Expression auf CTCs bei kastrationsresistenten Tumoren in der metastasierten Situation bereits genutzt werden, um ein Ansprechen der Antiandrogene und eine Sensibilität gegenüber taxanhaltiger Chemotherapie vorherzusagen. Es konnten schon mehrere kommerzielle Tests zur Detektion der AR-V7-Spleißvariante auf CTCs etabliert werden (134). Es handelt sich hier um eine verkürzte Version des AR-Proteins, bei der die ligandenbindende Domäne fehlt (Abbildung 3). An dieser binden die Antiandrogene, sodass bei fehlender Domäne keine Wirkung der Antiandrogene zu erwarten ist. Wenn AR-V7 auf Proteinbasis als Kernfärbung auf CTCs dargestellt werden kann, kann bei allen getesteten Patienten ein schlechtes Ansprechen für Antiandrogene und ein Vorteil der taxanhaltigen Chemotherapie prognostiziert werden (99, 101, 135). Nach der Gabe von Taxanen kann sogar eine Umwandlung von AR-V7-positiven zu AR-V7-negativen CTCs beobachtet werden (101). Die kommerziell erhältlichen Tests basieren einerseits auf der RNA-Analyse andererseits auf der immunzytochemischen Detektion von CTCs. Bei der Analyse auf Proteinebene wird nur eine nukleäre AR-Expression berücksichtigt, da sie für die Antiandrogenresistenz entscheidend ist und AR-V7 sich nicht frei vom Zytoplasma in den Zellkern bewegen kann (136). Der D6F11-Antikörper detektiert sowohl AR-V7 als auch die vollständige AR-Variante, da er am N-Terminus ansetzt (Vgl. Abbildung 3). Er kann die unterschiedlichen AR-Varianten nicht unterscheiden. Da in der Mammakarzinomforschung erstmal die positive Prädiktion für eine antiandrogene Therapie von Interesse ist, ist hier der Nachweis einer vollständigen AR-Variante nach wie vor von Bedeutung. Für das AR-Protein mit ligandenbindender Domäne gibt es wiederum keinen Nachweis einer prädiktiven

Rolle der alleinigen Kernlokalisierung (136). Auch für die Lokalisation des AR in CTCs des fortgeschrittenen Mammakarzinoms und ihren prädiktiven Wert gibt es noch nicht ausreichend Daten, sodass in dieser Arbeit sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische AR-Lokalisation einbezogen wurden.

Alternativ konnten bei ausgeprägter Heterogenität der CTC-Rezeptorexpression des fortgeschrittenen kastrationsresistenten Prostatakarzinoms ein Scoringssystem basierend auf der Quantifizierung von AR-Expression und der Intensität der CK- und AR-Färbung etabliert werden. Hierbei wurde das Verfahren der Immunzytochemie auf CTCs genutzt. Die Zellen wurden in 15 unterschiedliche Klassen sortiert. Auch dieser sogenannte *Shannon-Score* wird beim metastasierten Prostatakarzinom als prädiktiver Surrogatmarker genutzt (137). Der Umfang der Ergebnisse lies in der vorliegenden Arbeit ein analoges *Scoring System* nicht zu. Zunächst wurde eine Unterscheidung in AR-positiv und AR-negativ etabliert. In größeren Kollektiven kann die prädiktive Aussage eines *Scoring Systems* beim Mammakarzinom untersucht werden. Die Ergebnisse zu einer der ersten prospektiven Studien im Rahmen des CTC Therapiemonitorings (NCT02269982 – PROPHECY) konnten 2019 erstmalig veröffentlicht werden und unterstützen die AR-V7 basierte Therapieentscheidung auch in der klinischen Anwendung (134). In Deutschland untersucht eine Phase III Studie aktuell den Einfluss von CTC-Anzahl und AR-V7-Expression auf die Erstliniengabe von Abirateronacetat beim metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom (DRKS00011614) (138). Es bedarf weiterer Arbeiten, die sich intensiv mit dem AR auf CTCs beschäftigen, um die unterschiedlichen genetischen AR-Subtypen beim Mammakarzinom analog zum Prostatakarzinom genauer zu charakterisieren (139). Fujii *et al.* beschränkten sich bei ihren Untersuchungen des AR-Rezeptors der CTCs auf die Analyse von Mutationsprofilen im Rahmen von Chromosomenanalysen, wiesen allerdings auch bei ihren nukleären AR-positiven CTCs keine Spleißvariante nach (102). Bei Aceto *et al.* konnte die AR-V7-Spleißvariante bei 41% der 77 CTCs beim fortgeschrittenen Mammakarzinom nachgewiesen werden, während bei 22 von insgesamt 32 Patientinnen (69%) CTCs gefunden wurden (94). Ob die AR-V7-Spleißvariante auf den CTCs des fortgeschrittenen Mammakarzinoms ähnliche Auswirkungen hat wie im fortgeschrittenen Prostatakarzinom, wurde aktuell noch nicht in größeren Kohorten untersucht. Viele der Informationen, die der Mammakarzinomforschung im

Zusammenhang mit dem AR zur Verfügung stehen, stammen aus der Prostatakarzinomforschung beim Mann, sodass die AR-V7-Spleißvariante auch ein zu untersuchender Ansatz werden wird (99, 140). Dabei bleibt beim Vergleich des fortgeschrittenen Mammakarzinoms und des Prostatakarzinoms immer die unterschiedliche intrakorporale Testosteronkonzentration zu beachten, welche die Vergleichbarkeit zwischen den Geschlechtern stark einschränkt (125, 140).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Es konnten insgesamt bei 55% (37/67) der untersuchten MBC-Patientinnen CTCs dargestellt werden. Dabei zeigten in der AR-Analyse 43% (16/37) der CTC-positiven Patientinnen mindestens eine AR-positive CTC. In der Gruppe der Patientinnen, die mehr als eine CTC aufwiesen, wurden bei 56% (14/25) ausschließlich AR-negative CTCs, bei 12% (3/25) ausschließlich AR-positive CTCs und bei 32% (8/25) eine heterogene AR-Expression nachgewiesen. Fujii *et al.* konnten in ihrer Studie eine CTC-Detektionsrate von 49% bzw. beim Einschluss auch CK-negativer, apoptotischer CTCs und CTC-Cluster eine deutlich höhere Rate von 75% CTCs nachweisen. Bei CK-negativen CTCs handelt es sich *per definitionem* nicht um CTCs. Unter den von Fujii *et al.* einbezogenen CTCs zeigten sich allerdings nur 12 CTCs AR-positiv, eine davon apoptotisch. Dies ergibt einen AR-positiven CTC-Anteil von 23% (12/51) bzw. bei 22% (11/49) CK-positiven, nicht apoptotischen CTCs (102). Fujii *et al.* verwendeten nicht das FDA-zertifizierte *CellSearch®* System zur Zellanreicherung. Dies kann zu unterschiedlich hohen CTC-Detektionsraten führen. Die AR-Expressionsraten liegen in primären Mammakarzinomen in Studien bei HR-positiven Tumoren bei bis zu 70%, während die Expressionsrate bei *TNBCs* bei bis zu 43% liegt (Tabelle 4). In der vorliegenden Studie waren 85% der eingeschlossenen Patientinnen HR-positiv und 15% *triple-negativ*. In der Patientinnenkohorte von Fujii *et al.* wurden hingegen 63% (43/68) HR-positive Primärtumoren beschrieben. Dieser Unterschied in der Zusammensetzung der Patientinnenkohorte muss in den Detektionsraten von AR-positiven CTCs berücksichtigt werden und könnte die Ursache unserer höheren Detektionsrate sein. In einer vorselektierten Kohorte wie in dieser Arbeit mit überwiegend HR+HER2- und einigen *TNBC* Patientinnen sind vermehrt AR-positive CTCs zu

erwarten (70, 76). Gleichzeitig ist zu beachten, dass bei insgesamt kleiner Kohorte und niedriger Zellzahl diese Ergebnisse nur eingeschränkt quantitativ ausgewertet werden können.

4.2.1. Diskussion der Expressionsmuster

Bei der Analyse der AR-Färbung fielen in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Expressionsmuster der AR-Färbung auf. Es handelt sich beim AR um einen typischen steroidal-rezeptorartigen Rezeptor, sodass eine nukleäre Lokalisation zu erwarten ist (126, 141). In vielen Studien wurden ausschließlich nukleäre Expressionsmuster ausgewertet oder beobachtet (102, 106, 110, 142). In der vorliegenden Studie konnten unterschiedliche Expressionsmuster nachgewiesen werden. Es wurden bei 5/16 Patientinnen aus unserem Kollektiv kernbetonte und bei 11/16 Patientinnen zytoplasmabetonte Expressionsmuster nachgewiesen. Der überwiegende Anteil der untersuchten CTCs zeigte ein zytoplasmatisches Expressionsmuster. Peters *et al.* beschrieben hauptsächlich Kernfärbungen bei der Analyse der AR-Expression im Primärtumor, einzelne Tumore wiesen jedoch auch eine zytoplasmatische AR-Lokalisation auf (87). Reyes *et al.* beschreiben die zytoplasmatische Anfärbung des AR auf CTCs als typisches Ereignis beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom (98). Im Vergleich von Prostatakarzinomzelllinien konnte bei einer erhöhten Mitoseaktivität eine vermehrte zytoplasmatische Rezeptorexpression beobachtet werden (143). Die zytoplasmatische Expression des AR in den vorliegenden Experimenten könnte auf eine gesteigerte Mitoseaktivität der CTCs hindeuten. In der PROPHECY Studie zum fortgeschrittenen kastrationsresistenten Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass durch die nukleäre Darstellung des AR-V7 eine prädiktive Aussage zur Resistenz gegen Anti-AR-Therapie getroffen werden konnte (134). Die AR-V7-Spleißvariante kann den Zellkern nicht verlassen. Daher handelt es sich bei einer zytoplasmatischen Anfärbung des AR nicht um die AR-Spleißvariante und könnte folglich nicht für die negative Prädiktion des Therapieansprechens der Anti-AR-Therapie genutzt werden. In diesem Kontext muss berücksichtigt werden, dass beim Prostatakarzinom die Wirksamkeit der Anti-Androgenen Therapie grundsätzlich vorausgesetzt wird. Eine Mutation des AR in Form der AR-V7-Spleißvariante ist hier als Prädiktor einer Therapieresistenz von

besonderer Bedeutung. In der Mammakarzinomforschung hingegen ist erstmal der Nachweis der AR-Expression als besonderes Merkmal und ggf. als positiver prädiktiver Faktor von Interesse. In diesem Kontext ist die Detektion der vollständigen AR-Variante, wie oben bereits erwähnt, nach wie vor relevant.

Zum Therapiemonitoring der antiandrogenen Therapie beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom dient der Nachweis des AR bzw. seiner AR-V7-Spleißvariante zur zuverlässigen Vorhersage der Wirksamkeit der antiandrogenen Therapie (99, 134, 136, 144). Ob die Resistenzbildungen auf eine Anti-AR-Therapie beim Mammakarzinom einen ähnlichen pathophysiologischen Zusammenhang zeigt, bleibt abzuwarten. Zum Nachweis der AR-V7-Spleißvariante, wird eine molekulare Untersuchung der Zellen benötigt. Alle AR-Subtypen besitzen einen N-Terminus, welcher von der immunzytologischen Färbung als Angriffspunkt genutzt wird (Abbildung 3). Aceto *et al.* konnte bei 41% der 22 AR-positiven CTCs eine AR-V7-Spleißvariante feststellen (94). Der Anteil von 41% aller nukleären Expressionsmuster zeigt auch, dass ein kernbetontes Expressionsmuster nicht gleichbedeutend mit einem Nachweis von AR-V7 ist. Ob diese Spleißvariante beim Mammakarzinom ähnliche prädiktive Aussagekraft haben wird, wie im Prostatakarzinom, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4.2.2. Exogene Einflüsse auf die AR-Expression von CTCs

Im Organismus der Frau zeigen sich reduzierte Testosteronkonzentrationen. Testosteron reagiert mit der ligandenbindenden Domäne des AR und bildet einen Komplex. Dieser bewegt sich dann in den Zellkern. Die reduzierte Testosteronkonzentration kann einen weiteren Grund für die vermehrte zytoplasmatische Expression des AR darstellen (145, 146). Unter Therapie mit Aromataseinhibitoren steigt die Konzentration der Testosterone an, außerdem wird bei der postmenopausalen Frau ein erhöhtes Testosteronserumniveau beobachtet (125, 147). In den vorliegenden Daten zeigten drei der fünf postmenopausalen Patientinnen ein nukleäres Expressionsmuster, welches mit einem zu erwartenden erhöhten Testosteronspiegel in der Postmenopause erklärbar wäre. Hingegen weisen neun von zehn postmenopausalen Patientinnen eine zytoplasmatische Expression von AR auf (Vgl. Tabelle 32). Keine der Patientinnen mit nukleärer AR-

Expression erhielt Als. Eine der fünf Patientinnen, die sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Expressionsmuster aufweist, erhielt den Aromataseinhibitor Letrozol. Eine weitere Erklärung der vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisation in unserem Kollektiv wäre, dass es zu mutationsbedingten Funktionsbeeinträchtigungen des AR kommt, die eine zytoplasmatische Expression des AR trotz erhöhten Testosteronspiegels bedingen könnte (125, 143). Dieses Phänomen konnten Korykina *et al.* im Zelllinienexperiment in der Untersuchung der Variabilität der Expressionsstärken des AR bereits in der molekulargenetischen Untersuchung beobachten.

Die AR-Expression konnte in unserer Kohorte sowohl auf CTCs HR-positiver als auch *triple-negativer* Tumoren nachgewiesen werden. Bei 47% (14/30) der untersuchten Patientinnen mit HR-positiven Primärtumoren waren die CTCs AR-positiv, während bei 33% (2/6) der Patientinnen mit einem *triple-negativen* Primärtumor AR-positive CTCs detektiert werden konnten (Tabelle 27).

4.2.3. Metastasierungsmuster der Patientinnen mit AR-positivem CTC-Nachweis

Aceto *et al.* konnten in ihrer Arbeit darstellen, dass ER-positive Tumore, die AR-positiv CTCs zeigten, vermehrt nur Knochenmetastasen aufwiesen. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass AR-abhängige Gene in der Biopsie der Knochenmetastasen hochreguliert waren (94). In der Immunhistochemie wurde bei Knochenmetastasen vermehrt die nukleäre Lokalisation des AR festgestellt. Es konnte im Folgenden eine verminderte Entwicklung von Knochenmetastasen im Mausexperiment, sowohl bei AR-Knock-Out als auch bei pharmakologischer Inhibition von AR, beobachtet werden. Diese Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei der AR-Expression nicht nur um eine Zielstruktur zur Charakterisierung des Primärtumors handelt. Vielmehr scheinen Patientinnen, die AR-positiv CTCs aufweisen, häufiger allein an Knochenmetastasen zu leiden (94). In unserem Kollektiv zeigten 25% (4/16) der Patientinnen, die AR-positiv CTCs aufwiesen, nur Knochenmetastasen und 69% (11/16) auch viszerale Metastasen. Dies stellt einen marginal größeren Anteil als im Gesamtkollektiv mit 21% (14/67) dar (Vgl. Tabelle 27 und Tabelle 31). Es ließen

sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der alleinigen Knochenmetastasierung und der AR-Expression auf CTCs nachweisen. Allerdings muss auch hier die kleine Größe der untersuchten Kohorte bedacht werden. Aceto *et al.* hatten den Zusammenhang bislang nur aus dem Mausmodell vermutet. Ihre abschließende Empfehlung lautet in einer größeren Kohorte aus Patientinnen mit AR-positiven CTCs solle der statistische Zusammenhang belegt werden (94).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auf CTCs des metastasierten Mammakarzinoms der Androgenrezeptor detektiert werden kann. Dies kann die Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen. Die Charakterisierung der CTCs anhand der AR-Expression sollte in größeren Kohorten untersucht werden. Im Rahmen von Studien sollten die Ergebnisse der AR-Expression mit der AR-Expression der Primärtumoren und/oder Metastasen verglichen und unter besonderer Berücksichtigung der AR-Spleißvarianten molekular erforscht werden. Es sollte weitergehend die Rolle der Expressionslokalisationen des AR in Zytoplasma bzw. Kern untersucht werden.

4.3. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte eine Immunfluoreszenz Androgenrezeptor-Dreifach-Färbung auf CTCs von metastasierten Mammakarzinompatientinnen im *CellSearch ProfileKit*® erfolgreich etabliert werden. Die CTCs von 67 Patientinnen aus der DETECT-Studie konnten analysiert und mit den klinischen Daten der DETECT Studienzentrale verglichen werden. Es konnten bei 37 Patientinnen insgesamt 212 CTCs nachgewiesen und auf ihre AR-Expression untersucht werden. Dabei zeigten 16 Patientinnen einen positiven AR-Nachweis. Der AR wird sowohl auf CTCs von Hormonrezeptor-positiven als auch *triple-negativen* Primärtumoren exprimiert. Von den 30 Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem Primärtumor, die CTCs aufwiesen, konnte bei 14 Patientinnen (47%) der AR auf CTCs detektiert werden während bei 2 der 6 TNBC Patientinnen (33%) der AR nachgewiesen wurde. Der AR konnte bei 5 Patientinnen in einem nukleären und bei 11 Patientinnen in einem zytoplasmatischen Expressionsmuster dargestellt werden. Im Rahmen eines Echtzeit-Therapiemonitorings kann der AR auf CTCs des metastasierten

Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Die Daten können zu einer Etablierung der AR-Färbung für das *CellSearch EpithelialKit*® genutzt werden. Die folgenden Ergebnisse sollten als Grundlage für Studien mit größeren Kollektiven dienen. Im Rahmen dieser Studien könnte eine systematische AR-Charakterisierung auf molekularer und proteinbasierter Ebene sowohl im Primärtumor und in der Metastase als auch auf CTCs erfolgen um seine Rolle als neuen prädiktiven Faktor in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms besser zu verstehen.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zuordnung der Einteilungen nach Genexpressionsmuster und Immunhistochemie (9).....	3
Tabelle 2 Daten zum Einfluss von CTCs im MBC.....	12
Tabelle 3 Aktuelle Studien zur CTC-basierten Therapieentscheidung in der Mammakarzinombehandlung.....	14
Tabelle 4 Übersicht der veröffentlichten Daten zur AR-Expression in unterschiedlichen Patientinnenkohorten.....	17
Tabelle 5 Auswahl an Studien zur Detektion des AR bzw. der AR-V7-Spleißvariante auf CTCs des metastasierten Mammakarzinoms bzw. Prostatakarzinoms.....	19
Tabelle 6: Übersicht der klinischen Studien zur Antiandrogenen Therapie nach Mina, et al. (104).....	21
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 8: Verwendete Materialien.....	23
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 10: Verwendete Kits.....	25
Tabelle 11: Verwendete Puffer.....	26
Tabelle 12: Verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 13: Verwendete Medien.....	27
Tabelle 14: Übersicht der AR positiven und negativen Zelllinien.....	27
Tabelle 15: Verwendete Zelllinien für die Positiv- und Negativkontrollen.....	28
Tabelle 16: Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter.....	37
Tabelle 17: Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	37
Tabelle 18: Erster Antikörper Mix.....	40
Tabelle 19 Isotypkontrolle.....	41
Tabelle 20: Zweiter Antikörper Mix.....	41
Tabelle 21 Kriterien zur Detektion von CTC modifiziert nach Fehm, <i>et al.</i> in Anlehnung an die Vorgehensweise bei der Detektion von disseminierten Tumorzellen (118).....	43
Tabelle 22 Vergleich der Experimente der Fixierungsmittel Alkohol, Aldehyd, Oxidanzien und <i>CellSave</i> ®.....	44
Tabelle 23 Vergleich von Triton und Tween zur Permeabilisierung der Zellen.....	45
Tabelle 24 Kontrollansätze für die Etablierung der AR-Färbung.....	49
Tabelle 25 Schematischer Ablauf der Färbung mit zeitlichem Ablauf.....	50
Tabelle 26 Vergleich der Rezeptorexpressionsmuster der Primärtumoren und der Metastasen der Patientinnen.....	51
Tabelle 27 Klinisch-pathologische Daten des Patientinnenkollektivs.....	52
Tabelle 28 Vergleich der statistischen Größen zwischen Anzahl der CTCs im <i>EpithelialKit</i> ® mit der Anzahl der CTCs in der AR-Analyse.....	53
Tabelle 29 Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) in der Androgenrezeptor-Analyse der <i>ProfileKit</i> ® Probe: Anzahl der Proben (%).....	53
Tabelle 30 Heterogenität der AR-Expression bei Patientinnen, die mehr als 1 CTC aufgewiesen haben.....	54

Tabelle 31 Korrelation der klinisch-pathologischen Daten mit den Ergebnissen der quantitativen AR-Analyse	55
Tabelle 32 Klinisch-pathologische Betrachtung der AR-positiven Proben und Patientinnen	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Metastasierungsprozesse	10
Abbildung 2 DETECT Studienkonzept (Quelle: www.detect-studien.de)	15
Abbildung 3 Schematischer Aufbau des Androgenrezeptors und der Spleißvariante V7	16
Abbildung 4 Verarbeitungsschritte der Patientinnenproben	32
Abbildung 5 Schematische Darstellung direkter und indirekter Immunfluoreszenz nach Krawczyk (117) FITC:Fluorescein-isothiocyanate	36
Abbildung 6 Schematische Verarbeitung der Patientinnen-TraFo-Proben aus der DETECT-Studie.....	38
Abbildung 7 AR-Färbung, Negativ- und Positivkontrolle	39
Abbildung 8 AR-Färbung, Isotypkontrolle auf LNCaP	39
Abbildung 9 Darstellung des zellkernassoziierten Expressionsmusters einer AR-Färbung auf LNCaP mit der Gegenfärbung mit CD45 und Darstellung eines CD45-positiven Leukozyten mit DAPI Nachweis mit der Gegenfärbung mit Zytokeratin	42
Abbildung 10 Vergleich der zwei AK-Klone zur Identifikation der CD45-Expression	47
Abbildung 11 Testung der Antikörper N-20 (A) und D6F11 (B) auf der AR-negativen Zelllinie DU145	48
Abbildung 12 AR-positive Kernfärbung einer Patientinnenprobe	56
Abbildung 13 AR-positive Zytoplasmafärbung einer Patientinnenprobe	56
Abbildung 14 AR-positive Zytoplasmafärbung einer Patientinnenprobe	57
Abbildung 15 AR-negative Patientinnenprobe	57

Literaturverzeichnis

1. Maurer S, Heywang-Köbrunner S, Wolf C. Mammakarzinom Prävention. In: Bauerfeind I, München T, editors. Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 15th ed. München: Zuckschwerdt; 2015. p. 13-7.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Weide R, Feiten S, Friesenhahn V, Heymanns J, Kleboth K, Thomalla J, et al. Metastatic breast cancer: prolongation of survival in routine care is restricted to hormone-receptor- and Her2-positive tumors. *Springerplus*. 2014;3:535.
4. Untch M, Harbeck N, Huober J, von Minckwitz G, Gerber B, Kreipe HH, et al. Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015;75(6):556-65.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 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):1687-717.
6. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, 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):1117-30.
7. Mayr D, Schmoeckel F. Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferation der Mamma. In: Bauerfeind I, München T, editors. Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 15th ed. München: Zuckschwerdt; 2015. p. 61.
8. Committee AB. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2020. [Available from: www.ago-online.de].
9. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
10. Schmidt M, Thill M. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer: Endocrine and „Targeted“ Therapy in Metastatic Breast Cancer: AGO Kommission Mamma; 2017 [Available from: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2017-03/AGO_englisch/PDF_Einzeldateien_englisch/2017E%2019_Endocrine%20and%20Targeted%20Therapy%20in%20Metastatic%20Breast%20Cancer.pdf].
11. Rack B, Eiermann W, Harbeck N, Hasmüller S, Sassen M, Schaller G, et al. Prognostische und Prädiktive Faktoren. In: Bauerfeind I, München T, editors.

Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 15th ed. München: Zuckschwerdt; 2015. p. 99-107.

12. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):123-33.

13. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897-906.

14. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020, AWMF Registernummer: 032-045OL (abgerufen am: 04.04.2020) 2020 [Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>].

15. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):99-110.

16. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.

17. Cardoso F, Costa A, Norton L, Senkus E, Aapro M, Andre F, et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). *Breast*. 2014;23(5):489-502.

18. Babayan A, Hannemann J, Spotter J, Muller V, Pantel K, Joesse SA. Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *PLoS One*. 2013;8(9):e75038.

19. Wallwiener M, Hartkopf AD, Riethdorf S, Nees J, Sprick MR, Schonfisch B, et al. The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients. *BMC Cancer*. 2015;15:403.

20. Kalinsky K, Mayer JA, Xu X, Pham T, Wong KL, Villarin E, et al. Correlation of hormone receptor status between circulating tumor cells, primary tumor, and metastasis in breast cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(7):539-46.

21. Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;118(3):523-30.

22. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-16.

23. Nathan MR, Schmid P. A Review of Fulvestrant in Breast Cancer. *Oncol Ther*. 2017;5(1):17-29.

24. Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929-40.
25. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med*. 2018;24(5):628-37.
26. Lousberg L, Jerusalem G. Safety, Efficacy, and Patient Acceptability of Everolimus in the Treatment of Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. 2016;10:239-52.
27. Janni W. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer: AGO Kommission Mamma; 2018 [Available from: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2018-03/EN/Gesamt_PDF_Englisch/Updated_Guidelines_2018.pdf].
28. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):591-602.
29. Curtit E, Nerich V, Mansi L, Chaigneau L, Cals L, Villanueva C, et al. Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist*. 2013;18(6):667-74.
30. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):302-12.
31. Ghajar CM, Bissell MJ. Metastasis: Pathways of parallel progression. *Nature*. 2016.
32. Hartkopf AD, Banys M, Krawczyk N, Wallwiener M, Schneck H, Neubauer H, et al. Circulating Tumor Cells in Early-Stage Breast Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2011;71(12):1067-72.
33. Rack BK, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, et al. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(15_suppl):1003-.
34. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98-101.
35. Larson CJ, Moreno JG, Pienta KJ, Gross S, Repollet M, O'Hara S M, et al. Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Cytometry A*. 2004;62(1):46-53.
36. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 1970;45(4):773-82.

37. Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol.* 2001;159(1):17-20.
38. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(8):793-802.
39. Janni W, Rack B, Lindemann K, Harbeck N. Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time? *Oncologist.* 2005;10(7):480-92.
40. Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(5).
41. Alix-Panabieres C, Pantel K. Real-time liquid biopsy: circulating tumor cells versus circulating tumor DNA. *Ann Transl Med.* 2013;1(2):18.
42. Banys-Paluchowski M, Krawczyk N, Fehm T. Potential Role of Circulating Tumor Cell Detection and Monitoring in Breast Cancer: A Review of Current Evidence. *Front Oncol.* 2016;6:255.
43. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8152-62.
44. Hartkopf AD, Wallwiener M, Hahn M, Fehm TN, Brucker SY, Taran FA. Simultaneous Detection of Disseminated and Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer Patients. *Cancer Res Treat.* 2016;48(1):115-24.
45. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med.* 2013;274(2):113-26.
46. Agelaki S, Dragolia M, Markonanolaki H, Alkahtani S, Stournaras C, Georgoulas V, et al. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients. *Oncotarget.* 2017;8(3):5309-22.
47. Hartkopf AD, Banys M, Meier-Stiegen F, Hahn M, Rohm C, Hoffmann J, et al. The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(2):509-17.
48. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer.* 2008;122(5):999-1004.
49. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodriguez M, Garcia-Puche JL, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012;14(3):R71.
50. Edgerton SM, Moore D, 2nd, Merkel D, Thor AD. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003;11(3):214-21.

51. Krawczyk N, Banys M, Neubauer H, Solomayer EF, Gall C, Hahn M, et al. HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor. *Anticancer Res.* 2009;29(10):4019-24.
52. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, 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):406-14.
53. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, 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):920-8.
54. Rodriguez-Salas N, Jimenez-Gordo AM, Gonzalez E, de las Heras B, Zamora P, Espinosa E, et al. Circulating cancer cells in peripheral blood. A case report. *Acta Cytol.* 2000;44(2):237-41.
55. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781-91.
56. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, Hess KR, De Giorgi U, Mego M, et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):R67.
57. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3483-9.
58. Giordano A, Giuliano M, De Laurentiis M, Arpino G, Jackson S, Handy BC, 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):1144-50.
59. Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, Riethdorf S, Schott S, Pantel K, et al. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(2):503-10.
60. Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2012;23(3):618-24.
61. Nakamura S, Yagata H, Ohno S, Yamaguchi H, Iwata H, Tsunoda N, et al. Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2010;17(3):199-204.

62. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(21):6403-9.
63. Rack B, Juckstock J, Gunthner-Biller M, Andergassen U, Neugebauer J, Hepp P, et al. Trastuzumab clears HER2/neu-positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(2):485-92.
64. Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8185-94.
65. Bernhard H, Neudorfer J, Gebhard K, Conrad H, Hermann C, Nahrig J, et al. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(2):271-80.
66. Wallwiener M, Riethdorf S, Hartkopf AD, Modugno C, Nees J, Madhavan D, et al. Serial enumeration of circulating tumor cells predicts treatment response and prognosis in metastatic breast cancer: a prospective study in 393 patients. *BMC Cancer.* 2014;14:512.
67. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, 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):4218-24.
68. Chang C, Yeh S, Lee SO, Chang TM. Androgen receptor (AR) pathophysiological roles in androgen-related diseases in skin, bone/muscle, metabolic syndrome and neuron/immune systems: lessons learned from mice lacking AR in specific cells. *Nucl Recept Signal.* 2013;11:e001.
69. Agoulnik IU, Vaid A, Nakka M, Alvarado M, Bingman WE, 3rd, Erdem H, et al. Androgens modulate expression of transcription intermediary factor 2, an androgen receptor coactivator whose expression level correlates with early biochemical recurrence in prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(21):10594-602.
70. Isola JJ. Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *J Pathol.* 1993;170(1):31-5.
71. Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, Ikeda K, Tokunaga S, Nagahara H, et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol.* 2008;13(5):431-5.
72. Park S, Koo J, Park HS, Kim JH, Choi SY, Lee JH, et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(3):488-92.

73. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1755-62.
74. Loibl S, Muller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb-Esfahani S, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(2):477-87.
75. Hu R, Dawood S, Holmes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Cole K, et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res*. 2011;17(7):1867-74.
76. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol*. 2011;24(7):924-31.
77. Thike AA, Yong-Zheng Chong L, Cheok PY, Li HH, Wai-Cheong Yip G, Huat Bay B, et al. Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2014;27(3):352-60.
78. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;133:66-76.
79. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(1):82-9.
80. Liu YX, Zhang KJ, Tang LL. Clinical significance of androgen receptor expression in triple negative breast cancer-an immunohistochemistry study. *Oncol Lett*. 2018;15(6):10008-16.
81. Narayanan R, Dalton JT. Androgen Receptor: A Complex Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2016;8(12).
82. Rahim B, O'Regan R. AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers*. 2017;9(3).
83. De Amicis F, Thirugnansampanthan J, Cui Y, Selever J, Beyer A, Parra I, et al. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121(1):1-11.
84. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet*. 2017;389(10087):2430-42.
85. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45(12):1446-51.
86. Rondon-Lagos M, Villegas VE, Rangel N, Sanchez MC, Zaphiropoulos PG. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8).

87. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res.* 2009;69(15):6131-40.
88. Agoff SN, Swanson PE, Linden H, Hawes SE, Lawton TJ. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(5):725-31.
89. Gasparini P, Fassan M, Cascione L, Guler G, Balci S, Irkkan C, et al. Androgen receptor status is a prognostic marker in non-basal triple negative breast cancers and determines novel therapeutic options. *PLoS One.* 2014;9(2):e88525.
90. Mrklic I, Pogorelic Z, Capkun V, Tomic S. Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem.* 2013;115(4):344-8.
91. Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM, Bhargava R. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol.* 2010;23(2):205-12.
92. Astvatsaturyan K, Yue Y, Walts AE, Bose S. Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features. *PLoS One.* 2018;13(6):e0197827.
93. Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T, Santinelli A, Pagliacci A, De Lisa M, et al. Androgen receptor expression in early triple-negative breast cancer: clinical significance and prognostic associations. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1351-62.
94. Aceto N, Bardia A, Wittner BS, Donaldson MC, O'Keefe R, Engstrom A, et al. AR Expression in Breast Cancer CTCs Associates with Bone Metastases. *Mol Cancer Res.* 2018;16(4):720-7.
95. Lanzino M, De Amicis F, McPhaul MJ, Marsico S, Panno ML, Ando S. Endogenous coactivator ARA70 interacts with estrogen receptor alpha (ERalpha) and modulates the functional ERalpha/androgen receptor interplay in MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20421-30.
96. Wang C, Pan B, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Lin Y, et al. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7(29):46482-91.
97. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67.
98. Reyes EE, VanderWeele DJ, Isikbay M, Duggan R, Campanile A, Stadler WM, et al. Quantitative characterization of androgen receptor protein expression and cellular localization in circulating tumor cells from patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Transl Med.* 2014;12:313.

99. Crespo M, van Dalum G, Ferraldeschi R, Zafeiriou Z, Sideris S, Lorente D, et al. Androgen receptor expression in circulating tumour cells from castration-resistant prostate cancer patients treated with novel endocrine agents. *Br J Cancer*. 2015;112(7):1166-74.
100. Sharp A, Welti JC, Lambros MBK, Dolling D, Rodrigues DN, Pope L, et al. Clinical Utility of Circulating Tumour Cell Androgen Receptor Splice Variant-7 Status in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2019;76(5):676-85.
101. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol*. 2017;35(19):2149-56.
102. Fujii T, Reuben JM, Huo L, Espinosa Fernandez JR, Gong Y, Krupa R, et al. Androgen receptor expression on circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185231.
103. de Kruijff IE, Sieuwerts AM, Onstenk W, Jager A, Hamberg P, de Jongh FE, et al. Androgen receptor expression in circulating tumor cells of patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer*. 2019;145(4):1083-9.
104. Krawczyk N, Neubacher M, Meier-Stiegen F, Neubauer H, Niederacher D, Ruckhaberle E, et al. Determination of the androgen receptor status of circulating tumour cells in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1101.
105. Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL, Ting DT, Wittner BS, Ulman M, et al. Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(11):995-1003.
106. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell*. 2011;20(1):119-31.
107. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Lind HT, Spoelstra NS, Babbs BL, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(3):769-78.
108. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):R7.
109. Zhu A, Li Y, Song W, Xu Y, Yang F, Zhang W, et al. Antiproliferative Effect of Androgen Receptor Inhibition in Mesenchymal Stem-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(3):1003-14.
110. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5505-12.

111. Krawczyk N, Fehm T, Banys-Paluchowski M, Janni W, Schramm A. Liquid Biopsy in Metastasized Breast Cancer as Basis for Treatment Decisions. *Oncol Res Treat.* 2016;39(3):112-6.
112. Iguchi K, Ishii K, Nakano T, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, et al. Isolation and characterization of LNCaP sublines differing in hormone sensitivity. *J Androl.* 2007;28(5):670-8.
113. Chlenski A, Nakashiro K, Ketels KV, Korovaitseva GI, Oyasu R. Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Prostate.* 2001;47(1):66-75.
114. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl).* 2010;4:35-41.
115. Miyamoto H, Yang Z, Chen YT, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, et al. Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(7):558-68.
116. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med.* 2012;10:138.
117. Fehm T, Krawczyk N, Solomayer EF, Becker-Pergola G, Durr-Storzer S, Neubauer H, et al. ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R76.
118. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer.* 2006;107(5):885-92.
119. Koley D, Bard AJ. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(39):16783-7.
120. Han SJ, O'Malley BW, DeMayo FJ. An estrogen receptor alpha activity indicator model in mice. *Genesis.* 2009;47(12):815-24.
121. Blassl C, Kuhlmann JD, Webers A, Wimberger P, Fehm T, Neubauer H. Gene expression profiling of single circulating tumor cells in ovarian cancer - Establishment of a multi-marker gene panel. *Mol Oncol.* 2016;10(7):1030-42.
122. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2073-84.
123. Parker J. A novel biomarker to predict sensitivity to enzalutamide in TNBC J *Clin Oncol.* 2015;33.

124. Rampurwala M, Wisinski KB, O'Regan R. Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2016;14(3):186-93.
125. Dimitrakakis C. Androgens and breast cancer in men and women. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(3):533-47, viii.
126. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*. 2007;28(7):778-808.
127. Kraan J, Sleijfer S, Strijbos MH, Ignatiadis M, Peeters D, Pierga JY, et al. External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch((R)) system: a feasibility study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(2):112-8.
128. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*. 2015;21(21):4786-800.
129. Flores LM, Kindelberger DW, Ligon AH, Capelletti M, Fiorentino M, Loda M, et al. Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(10):1495-502.
130. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235-9.
131. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, 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):6897-904.
132. Robinson JL, Macarthur S, Ross-Innes CS, Tilley WD, Neal DE, Mills IG, et al. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J*. 2011;30(15):3019-27.
133. Rechoum Y, Rovito D, Iacopetta D, Barone I, Ando S, Weigel NL, et al. AR collaborates with ERalpha in aromatase inhibitor-resistant breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147(3):473-85.
134. Armstrong AJ, Halabi S, Luo J, Nanus DM, Giannakakou P, Szmulewitz RZ, et al. Prospective Multicenter Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 and Hormone Therapy Resistance in High-Risk Castration-Resistant Prostate Cancer: The PROPHECY Study. *J Clin Oncol*. 2019;37(13):1120-9.
135. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, Louw J, Graf RP, Vargas HA, et al. Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(11):1441-9.

136. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Lu D, Louw J, et al. Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017;71(6):874-82.
137. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Jendrisak A, Wang Y, et al. Phenotypic Heterogeneity of Circulating Tumor Cells Informs Clinical Decisions between AR Signaling Inhibitors and Taxanes in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(20):5687-98.
138. Rexer H, Hammerer P, Schostak M, Konig F. *Aktuelle Urol.* 2018;49(5):392-3.
139. Onstenk W, Sieuwerts AM, Kraan J, Van M, Nieuweboer AJ, Mathijssen RH, et al. Efficacy of Cabazitaxel in Castration-resistant Prostate Cancer Is Independent of the Presence of AR-V7 in Circulating Tumor Cells. *Eur Urol.* 2015;68(6):939-45.
140. Lobo RA. Androgens in postmenopausal women: production, possible role, and replacement options. *Obstet Gynecol Surv.* 2001;56(6):361-76.
141. Kumar R, McEwan IJ. Allosteric modulators of steroid hormone receptors: structural dynamics and gene regulation. *Endocr Rev.* 2012;33(2):271-99.
142. Safarpour D, Pakneshan S, Tavassoli FA. Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? *Am J Cancer Res.* 2014;4(4):353-68.
143. Koryakina Y, Knudsen KE, Gioeli D. Cell-cycle-dependent regulation of androgen receptor function. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(2):249-64.
144. Kumar V, Yu J, Phan V, Tudor IC, Peterson A, Uppal H. Androgen Receptor Immunohistochemistry as a Companion Diagnostic Approach to Predict Clinical Response to Enzalutamide in Triple-Negative Breast Cancer. *JCO Precision Oncology.* 2017(1):1-19.
145. Bhasin S, Pencina M, Jasuja GK, Travison TG, Coviello A, Orwoll E, et al. Reference ranges for testosterone in men generated using liquid chromatography tandem mass spectrometry in a community-based sample of healthy nonobese young men in the Framingham Heart Study and applied to three geographically distinct cohorts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(8):2430-9.
146. Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski H, et al. Age-specific reference ranges for serum testosterone and androstenedione concentrations in women measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):408-15.
147. Kyvernitakis I, Albert US, Kalder M, Winarno AS, Hars O, Hadji P. Effect of anastrozole on hormone levels in postmenopausal women with early breast cancer. *Climacteric.* 2015;18(1):63-8.

Danksagung

Ich danke allen, die mich in den vielen Jahren auf unterschiedliche Weise beim erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. rer. nat. Hans Neubauer. Ich danke Professor Neubauer für die stetige Diskussionsbereitschaft und die gewissenhafte Durcharbeit der Arbeit, sowie für die vielen interessanten Anregungen im Verlauf des Projektes.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. med. Tanja Fehm, der Direktorin der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Düsseldorf. Ich konnte mir der Unterstützung des Projektes stets sicher sein und bedanke mich für die vielfältige Unterstützung und ihren Glauben an meine berufliche und wissenschaftliche Ausbildung.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. med. Natalia Krawczyk für die vielen gemeinsamen Stunden, ihre unermüdliche Unterstützung und ihren Ansporn danken.

Frau Dr. rer. nat. Franziska Meier-Stiegen war mir immer eine gewissenhafte Ansprechpartnerin und ermöglichte mir Einblicke in die wissenschaftliche Forschung des Labors der Frauenklinik, wofür ich ihr sehr danken darf.

Ich danke außerdem dem Team des Forschungslabors der Frauenklinik deren Hilfestellung und Motivation ich nicht missen möchte. Ganz besonders möchte ich Dorothee Köhler für die freundliche und zuverlässige Zusammenarbeit und den großen Erfahrungsschatz danken, den sie mit mir teilte.