

Aus dem Institut für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin bzw. Leiterin: Univ.-Prof. Dr. Tanja Fehm

CTC Isolation bei Mammakarzinompatientinnen mithilfe von
rekombinantem VAR2CSA (rVAR2)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Caroline Krahn

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Für meine Eltern: Nicole und Thomas Krahn

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist weltweit die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Jährlich sterben bis zu 17.000 Frauen an einem Mammakarzinom in Deutschland. Einer der Gründe ist die extreme Heterogenität des Tumors und das damit verbundene Problem einer gezielten Behandlung. In diesem Kontext könnten in der Zukunft insbesondere zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells* [CTCs]) eine wichtige Rolle zur Erstellung der bestmöglichen Therapie spielen. CTCs können sowohl für die Charakterisierung und die damit verbundene Therapie des Tumors, als auch für die Bestimmung des Schweregrades bzw. des Metastasierungspotentials und als Kontrolle des Ansprechens auf eine Therapie des Mammakarzinoms genutzt werden. Der aktuelle Goldstandard zur Isolation von CTCs ist das CellSearch System (Menarini, Bologna, Italien). Dieses System beruht auf der Anreicherung der CTCs mittels des Oberflächenproteins EpCAM (*Epithelial Cellular Adhesion Molecule*).

Das von Salanti *et al.* beschriebene Protein VAR2CSA (*variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A*), welches zunächst auf Malaria-infizierten Erythrozyten nachgewiesen wurde, stellt einen neuen Ansatz zur Isolation von CTCs dar. VAR2CSA bindet an Tumorzellen hämatopoetischen, epithelialen und mesenchymalen Ursprungs. Agerbæk *et al.* beschrieben erstmalig den Einsatz von rekombinantem VAR2CSA (rVAR2) zur Isolation von CTCs: Mittels rVAR2 konnten Tumorzellen von u.a. Leber-, Pankreas- und Lungen-Karzinomen angereichert werden.

In Vorarbeiten dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass rVAR2 sowohl an Zelllinien des Mammakarzinoms als auch an CTCs von Patientinnen mit Mammakarzinom bindet. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Isolation und der Nachweis von CTCs aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen unter Einsatz des rVAR2-Proteins. Nach Isolation epithelialer Zellen mittels rVAR2 wurde deren Abstammung vom Tumor mittels vollständiger Genomamplifikation (*Whole Genome Amplification* [WGA]) durch Panel-Sequenzierung (*Next Generation Sequencing* [NGS]) verifiziert und therapierelevante Mutationen nachgewiesen.

Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Blutproben der Mammakarzinompatientinnen mit dem rVAR2-SpyCatcher Komplex versetzt. Anschließend wurden magnetische Biotin-bindende *beads* hinzugegeben. Schließlich konnten mit dem KingFisher Instrument (Waltham, MA, USA) die *beads*-behafteten Tumorzellen mittels magnetischer Kräfte isoliert werden. Nach dem Ablösen der *beads* konnten die Tumorzellen in *Sievwel Multiwell slides* für Panzytokerin, CD45 und DAPI gefärbt werden. Mithilfe des CellCelectors wurden die Proben analysiert und Einzelzellen zur weiteren Charakterisierung isoliert.

Das von mir entwickelte Protokoll erlaubt erstmalig eine Aufarbeitung klinischer Blutproben von Mammakarzinompatientinnen. In vier von sechs Patientenproben wurden CTCs isoliert, bei CTCs von zwei dieser Proben wurde stellvertretend mittels WGA und NGS der Nachweis erbracht, dass es sich um Tumorzellen handelte. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass insbesondere triple-negative Brustkrebszelllinien erfolgreicher detektiert werden als lumbale Zelllinien. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es mithilfe des rVAR2-Proteins möglich ist, aus Blut von Mammakarzinompatientinnen CTCs zu isolieren und dies ein vielversprechender Ansatz ist, die Heterogenität von Mammakarzinomen zu erfassen.

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Every year around 17.000 women die due to breast cancer in Germany. One of the reasons is the extreme heterogeneity of the tumor and the associated problem of targeted therapy. In this regard circulating tumor cells (CTCs) might play an important role to enable an individual therapy. CTCs can be used for the characterization of the subtype and the coherent therapy, as well as the determination of the degree of severity or potential for metastasis and to control the response to a breast cancer therapy. The gold standard for isolation of CTCs is the CellSearch system (Menarini, Bologna, Italy). This system is based on the enrichment of CTCs using the surface protein EpCAM (Epithelial Cellular Adhesion Molecule).

A new approach could be the protein VAR2CSA (variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A), described by Salanti et al., which was found on the surface of malaria-infected erythrocytes and binds to tumor cells of hematopoietic, epithelial and mesenchymal origin. Agerbæk et al. published the use of recombinant VAR2CSA (rVAR2) to isolate CTCs for the first time: They showed that rVAR2 can be used to detect tumor cells of liver, pancreas and lung-carcinoma.

In the preliminary work to this dissertation it has been shown that rVAR2 binds to breast cancer cell lines and CTCs from samples of breast cancer patients. The aim of the present study is the detection and isolation of CTCs from breast cancer patients using the rVAR2 protein. After isolation of the CTCs their origin from a tumor was verified by whole genome amplification (WGA) and next generation sequencing (NGS) and therapy-relevant mutations were shown.

After blood lysis the rVAR2-SpyCatcher-complex was added to the blood samples of the breast cancer patients. Then magnetic biotin binder beads were added to the sample. Finally, tumor cells attached to the beads were isolated with the KingFisher Instrument (Waltham, MA, USA) by the use of magnetic force. After releasing the beads the tumor cells were transferred into Sievewell multiwell slides for the staining for pan-cytokeratin, CD45 and DAPI. The samples were analyzed with the CellCelector and individual cells were isolated for further characterization.

The established protocol allows the processing of clinical patient samples for the first time. CTCs from four out of six patient samples were isolated, in two of these four samples it was demonstrated via WGA and NGS that the isolated cells were tumor cells. In addition, it was found that triple-negative breast cancer cell lines in particular are more successfully detected than luminal cell lines. This dissertation shows that it is possible to isolate CTCs from blood of breast cancer patients using the rVAR2-protein and it is a very promising approach to comprehend the heterogeneity of breast cancer.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| APC | Allophycocyanin |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BRCA | Mammakarzinom (<i>breast cancer</i>) |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD44 | <i>cluster of differentiation 44</i> |
| CD45 | <i>cluster of differentiation 45</i> |
| CK | Zytokeratin |
| CNAs | Kopienzahlabweichung (<i>copy number aberrations</i>) |
| CSA | Chondroitinsulfat A |
| CTCs | Zirkulierende Tumorzellen (<i>circulating tumor cells</i>) |
| CTG | <i>CellTracker Green</i> |
| CXC | Zirkulierende epitheliale Zellen (<i>circulating epithelial cells</i>) |
| Cy5 | Cyanin 5 |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DiOC | <i>dihexyloxacarboyanine iodide</i> |
| DLA | Diagnostische Leukapherese |
| DNS/DNA | Desoxyribonukleinsäure/ <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DTC | Disseminierte Tumorzellen (<i>disseminated tumor cells</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor receptor</i>) |
| EpCAM | epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>) |
| ERBB2 | Erb-B2 Rezeptor Tyrosin Kinase 2 |
| FCS | fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| HER2 | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (<i>human epidermal growth factor 2</i>) |
| KRT5 | Keratin 5 |
| KRT14 | Keratin 14 |
| Mse-I | <i>restriction endonuclease of Micrococcus species</i> |
| NGS | <i>next generation sequencing</i> |
| ofCS | onkofetales Chondroitinsulfat |
| PALB2 | <i>partner and localizer of BRCA2</i> |
| PBMC | Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>) |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |

| | |
|--------------------|---|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PfEMP1 | <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane proteine 1</i> |
| PF10 | <i>Protein –Free Blocking Buffer</i> 10% in PBS |
| PI3K | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase |
| PIK3CA | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase katalytische Untereinheit alpha |
| RPM | revolutions per minute |
| RPMI Medium | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> |
| rVAR2 | <i>recombinant Variant Surface antigen 2</i> |
| SLN | Wächterlymphknoten (<i>sentinel lymph node</i>) |
| TRITC | Tetramethylrhodamine |
| VAR2CSA | <i>variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A</i> |
| WBC | Leukozyt (<i>white blood cell</i>) |
| WGA | <i>whole genome amplification</i> |

SI-Einheiten

| | |
|-------------|--------------|
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| ms | Millisekunde |
| nmol | Nanomol |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Das Mammakarzinom | 1 |
| 1.2 Zirkulierende Tumorzellen..... | 4 |
| 1.3 Isolation von CTCs | 5 |
| 1.4 rVAR2..... | 6 |
| 1.5 Ziele der Arbeit | 7 |
| 2. Material und Methodik..... | 8 |
| 2.1 Material | 8 |
| 2.1.1 Patientenproben..... | 8 |
| 2.1.2 Zelllinien | 8 |
| 2.1.3 Zellkultur..... | 9 |
| 2.1.4 Rekombinantes VAR2CSA..... | 9 |
| 2.1.5 Puffer/Chemikalien | 10 |
| 2.1.6 Geräte | 10 |
| 2.2 Methoden..... | 11 |
| 2.2.1 Anreicherung und Isolation von zirkulierenden Tumorzellen (<i>spike-in</i>) | 11 |
| 2.2.2 Aufarbeitung des Spenderblutes über Dichtegradienten-Zentrifugation..... | 12 |
| 2.2.3 Ablösen der magnetischen Beads von den isolierten CTCs..... | 13 |
| 2.2.4 Färbung in <i>Sievwel Multiwell slides</i> | 13 |
| 2.2.5 Isolation von Einzelzellen mit dem CellCelector..... | 13 |
| 2.2.6 Färbung und Ablösen der magnetischen <i>beads</i> im KingFisher Instrument | 14 |
| 2.2.7 Reduktion der störenden Leukozyten..... | 16 |
| 2.2.8 Erstellung von <i>cytopins</i> zum Nachweis von Leukozyten | 16 |
| 2.2.9 Färbung im CellSearch Instrument | 16 |
| 2.2.10 <i>Whole Genome Amplification</i> und <i>Next Generation Sequencing</i> | 17 |
| 2.2.11 Statistik..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 3. Ergebnisse | 20 |
| 3.1 Vergleich verschiedener rVAR2 Chargen..... | 20 |
| 3.2 Optimierung des Verfahrens | 20 |
| 3.3 <i>spike-in</i> vor Erythrozyten-Lyse..... | 21 |
| 3.4 <i>spike-in</i> vor Erythrozyten-Lyse im Vergleich zur Dichtegradienten-Zentrifugation | 22 |
| 3.5 Detektion und Isolation von Tumorzellen verschiedener Zelllinien in Blutproben | 23 |
| 3.6 Ablösen magnetischer <i>beads</i> von den isolierten zirkulierenden Tumorzellen..... | 23 |
| 3.7 Reduktion der störenden Leukozyten..... | 24 |
| 3.8 Wiederfindungsraten in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Tumorzellen..... | 27 |
| 3.9 Färbung und Ablösen der <i>beads</i> im KingFisher Instrument | 27 |
| 3.10 <i>spike-in</i> Experimente in DLA-Produkten..... | 30 |
| 3.11 Detektierte CTCs aus Patientenproben und zugehörige klinische Daten..... | 31 |
| 3.12 <i>Whole Genome Amplification</i> und <i>Next Generation Sequencing</i> | 33 |
| 3.13 Färbung im CellSearch Instrument | 35 |
| 4. Diskussion | 37 |
| 4.1 Vorbemerkung..... | 37 |
| 4.2 Diskussion der Ergebnisse einzelner Untersuchungsaspekte | 39 |
| 4.3 Potentieller Einfluss der Blutgruppe | 45 |
| 4.4 Limitationen der Arbeit..... | 45 |
| 4.5 Schlussbetrachtung und Ausblick | 46 |
| Materialliste..... | 48 |
| Literaturverzeichnis..... | 50 |
| Anhang..... | 57 |
| 1. Aufklärungsbogen der Augusta-Studie | 57 |

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen (1). Jährlich sterben bis zu 17.000 Frauen an einem Mammakarzinom in Deutschland (1). Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebstodesursache der Frau weltweit (1). Einer der Gründe dafür ist die extreme Heterogenität des Tumors und die damit verbundene Schwierigkeit, eine gezielte Therapie zur Bekämpfung der verschiedenen Tumorzellen zu identifizieren (2). Eine umfassende molekulare Analyse aller Zelltypen des Brusttumors und eventueller Metastasen ist zur Erstellung der bestmöglichen, personalisierten Therapie unerlässlich.

Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die das Auftreten eines Mammakarzinoms begünstigen. Diese Risikofaktoren lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Hormonelle Risikofaktoren stellen unter anderem eine frühe Menarche, eine späte Menopause, ein langer hormonell aktiver Zeitraum und keine bis wenige Schwangerschaften dar (3). Auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva (4) und Situationen mit hormonellem Ungleichgewicht (5), wie z.B. eine Hormonersatztherapie in der Postmenopause (3) erhöhen das Risiko ein Mammakarzinom zu entwickeln. Weitere Risikofaktoren sind unter anderem eine erhöhte mammographische Dichte, Rauchen, fettreiche Ernährung, Alkoholkonsum, Adipositas und Diabetes Typ II, geringe körperliche Aktivität und Bestrahlungen des Brustkorbes in der Kindheit (5). Zusätzlich existieren auch hereditäre Risikofaktoren. Darunter befinden sich insbesondere Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturproteinen (Tumorsuppressorgenen), z.B. den sogenannten *BRCA1*-, *BRCA2*- oder *PALB2*-Genen (6). Zusätzlich gibt es Krebs syndrome, die mit einem erhöhtem Mammakarzinomrisiko einhergehen, darunter u.a. das Li-Fraumeni-Syndrom (3).

Die UICC (*Union for International Cancer Control*) teilt das Mammakarzinom in vier Stadien ein, basierend auf der TNM-Klassifikation (7). Das „T“ (Tumor) beschreibt die Ausdehnung und das Verhalten des Primärtumors, das „N“ (Nodus) steht für den Befallstatus regionärer Lymphknoten und das „M“ (Metastase) stellt das Vorhandensein von Fernmetastasen dar.

Das Mammakarzinom metastasiert früh lymphogen und hämatogen. Die Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung steigt mit der Größe des Tumors. Hämatogen streut das Mammakarzinom vor allem in Knochen, gefolgt von Leber und Lunge/Pleura (3,8). Eine lymphogene Metastasierung (Tumorabsiedlungen über das Lymphsystem) erfolgt immer über den/die Wächterlymphknoten, auch Sentinel-Lymphknoten genannt, von engl. *sentinel lymph node* (SLN).

Zur Basisdiagnostik des Mammakarzinoms zählt die klinische Untersuchung von Mammae und Axillae, dabei werden die Mammae und angrenzende Lymphknoten inspiziert und palpiert (3). Frauen zwischen 50 und 69 Jahren wird in Deutschland alle zwei Jahre ein Mammographie-Screening angeboten (9). Mit Einführung des Mammographie-Screenings wurden Neuerkrankungen des Mammakarzinoms in früheren Stadien diagnostiziert (9). Die Früherkennung erhöht die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Behandlung (10). Bei einem auffälligen Tastbefund und unklarem mammographischem Befund wird eine Sonographie durchgeführt (3). Zur Diagnosesicherung bei bestehendem Karzinomverdacht erfolgt eine Biopsie der Mammae und ggf. der Lymphknoten.

In den letzten Jahren hat sich die Flüssigbiopsie (*liquid biopsy*) als diagnostische Ergänzung zur Gewebeprobe etabliert (11). *Liquid biopsy* beschreibt den Nachweis von Tumorzellen bzw. Tumor-DNA zur molekularen Analytik in Körperflüssigkeiten. Die typischen Quellen für Tumor-DNA stellen zum einen frei zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) und zum anderen zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells* [CTCs]) dar. Die molekulare Analyse im Rahmen der *liquid biopsy* spielt eine wichtige Rolle bei der Früherkennung, Diagnose, Therapie und Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen (11,12). Die großen Vorteile der *liquid biopsy* bestehen in der minimalen Invasivität des Verfahrens, der Erfassung der Heterogenität einer Tumorerkrankung sowie deren potenziellen Metastasen. Zudem ermöglicht die *liquid biopsy* wiederholte Analysen im Rahmen einer Verlaufskontrolle und eine bessere Standardisierung im Vergleich zur Immunhistochemie (13). Gegenüber bildgebenden Verfahren hat sie das Potenzial einer deutlich frühzeitigeren Erkennung von Rezidiven (12).

Zu den *Staging*-Untersuchungen beim Mammakarzinom zählen unter anderem CT-Aufnahmen vom Thorax und Abdomen, sowie die Skelettszintigraphie (3).

Zur weiteren Therapieplanung ist die Bestimmung des Mammakarzinom-Subtyps unerlässlich (14). Dabei lassen sich im Wesentlichen drei klinische Subtypen des Mammakarzinoms abgrenzen: *Human epidermal growth factors 2* (HER2)-positiv oder -negativ, Östrogen- und Progesteron-positiv oder -negativ und triple-negativ. Triple-negativ bedeutet, dass der Tumor eine geringe bis keine Expression der genannten Wachstums- bzw. Hormonrezeptoren aufweist. Dies geht mit einer schlechteren Prognose einher, da die Patientinnen weder auf eine endokrine Therapie, noch auf eine Therapie gegen HER2 ansprechen (15).

Je nach Metastasierungsgrad, Stadium des Mammakarzinoms und Patientenwunsch gibt es verschiedene therapeutische Optionen. Bei einem lokal begrenzten Primärtumor kann dieser operativ entfernt werden (6). Zur Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle wird im Anschluss an eine Operation meist eine Strahlentherapie durchgeführt (6). Neben chirurgischer Entfernung und Radiotherapie besteht die Möglichkeit einer Systemtherapie. Mithilfe von Chemotherapien können

als inoperabel geltende Mammakarzinome behandelt werden. Darüber hinaus wird die Chemotherapie und/oder Strahlentherapie auch in Form einer neoadjuvanten Therapie zur Reduktion der Tumormasse vor einem geplanten operativen Eingriff angewendet. Bei endokrin sensiblen Tumoren, v.a. bei postmenopausalen Frauen, werden Antihormontherapien, wie z.B. die Gabe von Aromatasehemmern, angestrebt (6).

Im Rahmen einer präziseren Diagnostik könnten in der Zukunft insbesondere CTCs eine wichtige Rolle spielen. CTCs können sowohl für die Charakterisierung und damit verbundene Therapie des Tumors, als auch für die Bestimmung des Schweregrades bzw. des Metastasierungspotentials genutzt werden (11,16).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen

Bereits 1869 bezeichnete Thomas Ashworth CTCs als „(...) *cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*“ (17). In der Medizin sind CTCs von besonderer Bedeutung, da ihre Anzahl im Blut mit dem progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben bei Mammakarzinompatientinnen korreliert (18,19). CTCs sind in der Lage, Metastasen zu bilden (20). Per Intravasation erreichen sie den Blutstrom. Einigen CTCs gelingt es in distales Gewebe einzudringen; sie werden dann als disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells* [DTCs]) bezeichnet (s. Abb. 1). Im Vergleich zu bildgebenden Verfahren erlauben CTC-Quantifizierungen eine frühere Aussage über das Metastasierungspotenzial bei Mammakarzinompatientinnen mit geringer Metastasierung (21,22).

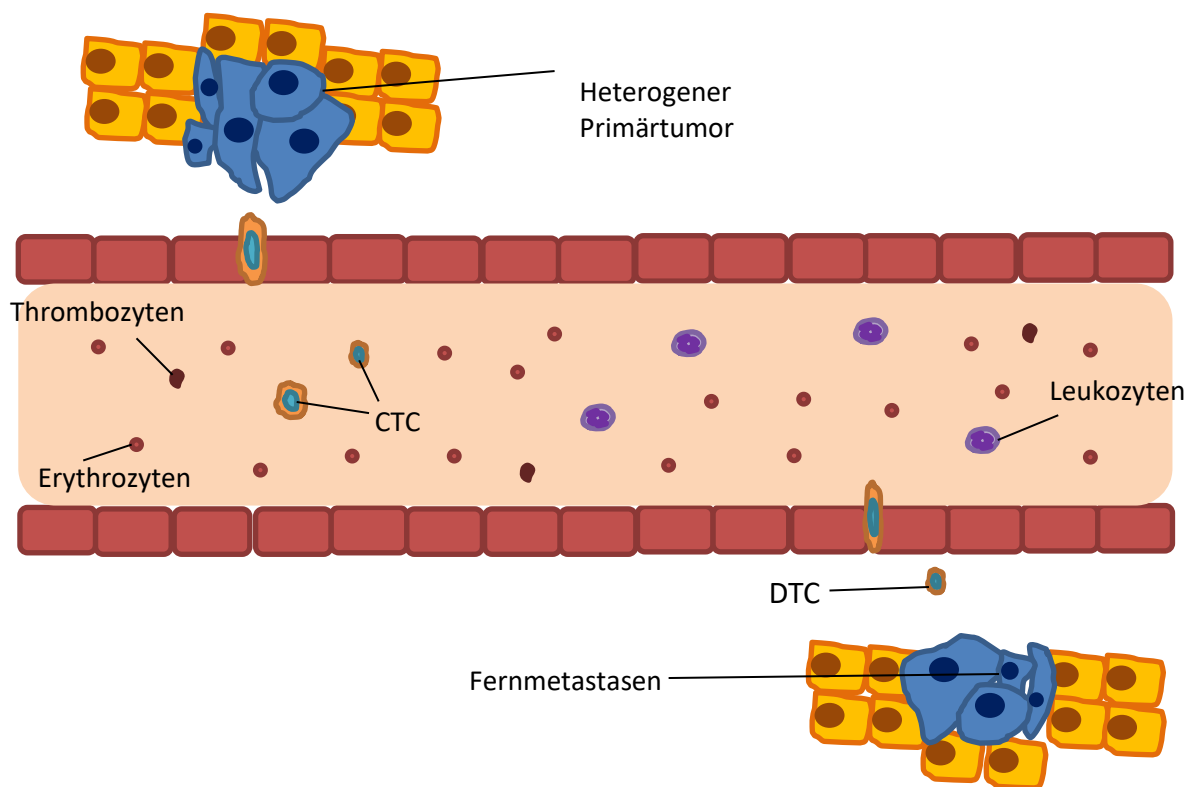


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Metastasierung durch CTCs (nach Neumann *et al.*, 2015 (23))

CTC: zirkulierende Tumorzelle; DTC = Disseminierte Tumorzelle

Zirkulierende Tumorzellen sind in der Lage Metastasen zu bilden. Sie erreichen per Intravasation den Blutstrom. Einigen CTCs gelingt es in distales Gewebe einzudringen. Sie werden dann als DTCs bezeichnet.

1.3 Isolation von CTCs

Der Goldstandard für die Isolation von CTCs ist das CellSearch System (Menarini, Bologna, Italien) (24). Dieses System beruht auf der Anreicherung der CTCs mittels eines Antikörpers gegen das Oberflächenprotein EpCAM (*Epithelial Cellular Adhesion Molecule*). Die Technologie hinter dem CellSearch System wurde von der FDA (*Food and Drug Administration*) für das metastasierte Prostata-, Mamma- und Kolorektalkarzinom zertifiziert. Mit immunomagnetischen Ferrofluiden gebunden an EpCAM-Antikörpern können CTCs angereichert werden. Mittels spezifischer Antikörper und entsprechender Fluoreszenzmikroskopie werden die isolierten Zellen als CTCs identifiziert und quantifiziert.

Zur Identifikation von CTCs werden vom CellSearch System und auch anderen CTC Isolationsverfahren vergleichbare Färbungen verwendet. CTCs werden für Zytokeratin (CK), *Cluster of Differentiation* 45 (CD45), ein allgemeiner Leukozyten-Marker, und DAPI gefärbt, ein DNA-bindendes Fluorochrom, welches den Zellkern markiert. CTCs sind definiert als CK+/CD45-/DAPI+ Zellen (CellSearch Kriterien) (s. Abb. 2) (25).

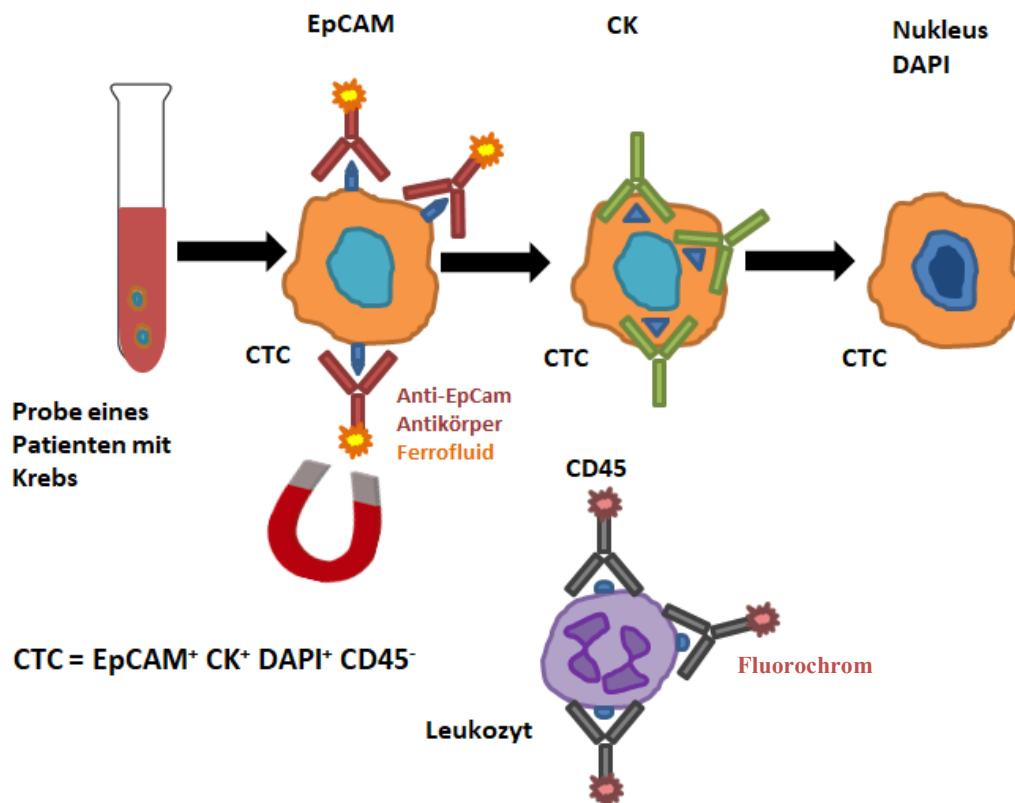


Abb. 2: CellSearch-Kriterien (nach Eslami-S et al., 2020 (25))

CK: Zytokeratin; CD45: *Cluster of differentiation* 45; CTC: zirkulierende Tumorzelle; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*

CTCs sind positiv für CK, EpCAM und DAPI. Sie exprimieren kein CD45 an ihrer Oberfläche.

CTCs können eine sehr heterogene Population mit Variationen im Bereich von Oberflächenmarkern und Morphologie – insbesondere der Größe – darstellen. Aufgrund dessen bedarf es neben der EpCAM-basierten CellSearch-Technologie weiterer Methoden zur Detektion und Isolation zirkulierender Tumorzellen. Ein großer Nachteil des aktuellen Goldstandards besteht darin, dass nur EpCAM-positiv Subpopulationen von CTCs isoliert werden.

1.4 rVAR2

Ein neuer Ansatz zur Isolation von CTCs könnte das von Salanti *et al.* beschriebene Protein VAR2CSA (*variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A*) darstellen (26). VAR2CSA wurde zunächst auf der Oberfläche Malaria-infizierter Erythrozyten nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass VAR2CSA an onkofetales Chondroitinsulfat (ofCS) bindet (26). Das ofCS ist ein spezifischer Marker, der auf der Oberfläche von Tumorzellen hämatopoetischen, epithelialen und mesenchymalen Ursprungs zu finden ist (26). Agerbæk *et al.* beschrieben erstmals den Einsatz von rekombinantem VAR2CSA (rVAR2), um CTCs zu isolieren. Sie beschreiben, dass rVAR2 zur Isolation von Tumorzellen von u.a. Leber-, Pankreas- und Lungen-Karzinomen geeignet ist. Es wurden im Vergleich zur EpCAM-basierten Isolationsmethode eine größere Anzahl und ein breiteres Spektrum an CTCs isoliert (27). Zusätzlich konnten mit rVAR2 zirkulierende Glioma-Zellen isoliert werden (28).

Darüber hinaus zeigt rVAR2 Potenzial in der Therapie verschiedener Krebsformen über seine Bindung an ofCS (29,30). Die Bindung von rVAR2 an ofCS stellt eine mögliche Zweitlinientherapie zur Behandlung eines Cisplatin-resistenten, muskelinvasiven Blasenkrebs dar (31).

1.5 Ziele der Arbeit

Die Arbeitsgruppe für translationale Gynäkoonkologie der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf erforscht die Anwendung von rVAR2 in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms.

Diese Arbeit baut auf den folgenden Vorarbeiten von Hanna Wietz (32) auf:

- Bestimmung der rVAR2-Affinität gegenüber verschiedenen Mammakarzinomzelllinien und Patienten-CTCs

- Etablierung eines CTC-Anreicherungsprotokolls mittels rVAR2 (indirekte Methode)

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist der Nachweis und die Isolation von CTCs aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen unter Einsatz des rVAR2-Proteins. Initial steht die Isolierung von in Blut eingebrachten Tumorzellen mittels rVAR2 bei verschiedenen Mammakarzinomzelllinien an. Dabei sollen die unterschiedlichen Subtypen berücksichtigt werden: luminal, triple-negativ und HER2-amplifiziert. Zu diesem Zweck werden Sk-Br-3, ZR-75-1, SUM44, MDA-MB-231, -436 und -468-Zelllinien eingesetzt. Darauf aufbauend erfolgen die Optimierung des Verfahrens und die Etablierung eines geeigneten Färbe- und Isolationsprotokolls für CTCs aus Patientenproben. Die eindeutige Abstammung der so isolierten Zellen aus Blutproben von Mammakarzinompatientinnen soll mittels vollständiger Genomamplifikation (*Whole Genome Amplification* [WGA]) und Sequenzierung (*Next-Generation Sequencing* [NGS]) nachgewiesen werden.

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Die Patientenproben stammen aus der AUGUSTA-Studie der Frauenklinik an der Universitätsklinik Düsseldorf. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer 3430). „Diese Studie dient der Identifikation neuer Biomarker zur Verbesserung der Genauigkeit üblicher Diagnoseverfahren sowie prognostischer und prädiktiver Faktoren bei Brustkrebs“ (33). Die Patientenproben wurden anonymisiert und der Datenschutz ist gewährleistet. Die Patientinnen wurden aufgeklärt und erklärten ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Blutproben (s. Anhang). In diese Studie wurden volljährige Patientinnen der Frauenklinik mit metastasiertem Mammakarzinom eingeschlossen. Für diese Dissertation wurden sechs Blutproben der AUGUSTA-Studie verwendet. Die Proben wurden in Ethylendiamintetraacetat (EDTA) - Röhren aufgenommen, dabei wirkt EDTA als Antikoagulant. Es wurden Patientinnen im Alter von 37 bis 72 Jahren untersucht (Mittelwert: 58,5 Jahre und Median: 60 Jahre).

2.1.2 Zelllinien

Die Brustkrebs-Zelllinien lassen sich in *basal-like* bzw. *stem-cell-like* und *non-stem-cell-like* einteilen (34). MDA-MB-231, -436 und -468 sind triple-negative Mammakarzinomzelllinien (HER2-, ER-, PR-negativ). Sk-Br-3 ist eine HER2-amplifizierte Zelllinie. ZR-75-1, MCF-7 und SUM44 zählen zu den luminalen Mammakarzinomzelllinien.

| Name | Beschreibung | ATCC Nr. |
|------------|--|-----------------|
| A549 | von einem 58-jährigem männlichem Patienten mit Lungenkarzinom (35) | ATCC CCL-185 |
| MDA-MB-231 | von einer 51 Jährigen Patientin mit Mamma-adenokarzinom aus ihrem Pleuraerguss (35). <i>stem-cell-like</i> und Vimentin positiv (34). <i>EpCAM-low/negative</i> (36) Expression von CD44 (37) | ATCC HTB-26 |
| MDA-MB-436 | von einer 43 Jährigen Patientin mit invasiv-duktalem Mammakarzinom aus ihrem Pleuraerguss (35). <i>stem-cell-like</i> und Vimentin positiv (34) <i>EpCAM-low/negative</i> (38). Expression von CD44 (39). | ATCC HTB-130 |

| | | |
|------------|---|---|
| MDA-MB-468 | von einer 51-Jährigen Patientin mit Mammaadenokarzinom aus ihrem Pleuraerguss (35) <i>non-stem-cell-like</i> und KRT5 / KRT14 positiv (34) EpCAM-positiv (40) Expression von CD44 (37) | ATCC HTB-132 |
| Sk-Br-3 | von einer 43-Jährigen Patientin mit Mammaadenokarzinom aus ihrem Pleurerguss (35) HER2-positiv bzw. –amplifiziert (41). | ATCC HTB-30 |
| ZR-75-1 | von einer 63 Jährigen Patientin mit invasiv-duktalem Mammakarzinom aus ihrem Aszites (35) luminal (35) | ATCC CRL-1500 |
| MCF-7 | von einer 69 Jährigen Patientin mit invasiv-duktalem Mammakarzinom aus ihrem Pleuraerguss (35) luminal (41) | ATCC HTB-22 |
| SUM44 | von einer Patientin mit invasiv-lobulärem Mammakarzinom aus ihrem Pleurerguss (42) luminal (43) | erhalten von Martin <i>et al.</i> (44) |
| Colo 205 | von einem 70 jährigen Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom (35) | ATCC CCL-222 |

A549 wurde im Folgenden als Positivkontrolle verwendet, da sie sich als mittelstark bis stark rVAR2 bindende Zelllinie herausgestellt hat (32,45).

2.1.3 Zellkultur

Die genannten Zelllinien wurden in 75 oder 250 ml Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) in einem Inkubationsschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Als Nährlösung wurde RPMI Medium mit L-Glutamin und den Zusätzen 10 % fetales Kälberserum (*fetal calf serum* [FCS]) und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Medien, FCS, Trypsin und Antibiotika wurden von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA bezogen. Die Tumorzellen wurden in 10 % Trypsin oder *cell dissociation buffer* im Abstand von 2-3 Tagen im Verhältnis von ca. 1:10 gesplittet bevor Konfluenz erreicht wurde.

2.1.4 Rekombinantes VAR2CSA

Plasmodium falciparum erythrocyte membrane proteine 1 (PfEMP1) ist eine Proteinfamilie, welche auf der Oberfläche Plasmodium falciparum – infizierter Erythrozyten exprimiert wird (46). Diese Proteinfamilie wird von *VAR*-Genen kodiert (47). Su *et al.* berichten, dass bis zu 50 *VAR*-Gene existieren könnten (48). VAR2CSA stellt unter diesen ein einzigartiges Protein dar (49). Es

wird hauptsächlich von der Plazenta während einer schwangerschaftsassozierten Malaria produziert. Es bindet an Chondroitinsulfat A (CSA), welches von der Oberfläche des vaskulären Endothels der Plazenta präsentiert wird. Die gesamte Struktur des VAR2-Proteins wird für die Bindung an CSA benötigt (50). Diese Bindung stellt die Hauptursache für Früh- und Todgeburten, sowie schwere anämische Verläufe seitens der Mutter dar (50). rVAR2 ist daher die führende Ansatzstelle zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen Schwangerschaft-assoziierte Malaria (51).

2.1.5 Puffer/Chemikalien

s. Materialliste S. 48

2.1.6 Geräte

s. Materialliste S. 49

2.2 Methoden

2.2.1 Anreicherung und Isolation von zirkulierenden Tumorzellen (*spike-in*)

Die Zellen (A549, MDA-MB-231,-436,-468, Sk-Br-3, MCF-7, ZR75-1, SUM44, Colo 205) wurden mit *cell dissociation buffer* vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die losgelösten Zellen wurden in 5 ml *cell dissociation buffer* in ein 10 ml Falconröhrchen übertragen und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 10 ml aufgefüllt. Das Falconröhrchen wurde bei 1100 RPM (227 g) für 5 Minuten bei 4 °C in der Megafuge 16R zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. 1 ml der *spike-in*-Zellen wurde mit 1 µl *CellTracker Green* (CTG) gefärbt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen erneut zweimal zentrifugiert und final in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Neubauer-Zählkammern verwendet. Zwischen Deckglas und Objektträger wurde 10 µl der Zellsuspension pipettiert und die Zellzahl pro ml bestimmt. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und das Volumen für 500 Zellen wie folgt berechnet:

$$\frac{500}{(\text{Zellzahl} : 4) * 10} = x$$

X gibt dabei das nötige Volumen in µl wieder.

Währenddessen wurden 5 ml Spenderblut von gesunden Probanden in 45 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Proben bei 400 g für 8 Minuten in der Megafuge 16R zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 6 ml PBS resuspendiert und erneut bei den obengenannten Einstellungen zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 600 µl PF10 resuspendiert und in ein *Protein LoBind tube* übertragen. PF10 setzt sich zusammen aus 90 % PBS und 10 % *Pierce protein-free blocking buffer*. In das so aufgearbeitete Spenderblut wurden jeweils 500 Tumorzellen gegeben. Parallel dazu wurde zur Kontrolle die gleiche errechnete Tumorzellzahl auf *3-well-slides* gegeben. Währenddessen wurde zu dem rVAR2-Protein (Charge: MP3643, Var2 Pharmaceuticals, Kopenhagen, DK) SpyCatcher (Charge: MP3298) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde 200 nmol des rVAR2-SpyCatcher Komplexes zu der Probe hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben für 30 Minuten auf dem *slow rotator* (*Stuart rotator SB3*) bei 4 °C inkubiert. Die magnetischen Biotin-bindenden *beads* wurden vorbereitet, indem sie zweimal in 1 ml PF10 gewaschen wurden. Pro Blutprobe wurden je 30 µl *bead*-Lösung hinzugegeben. Nach 30 Minuten im *slow rotator* erfolgte der Transfer in das KingFisher Instrument (Waltham, MA, USA) (s. Abb. 3) (52), welches mittels eines Magneten die Zellen isoliert, an welche eine ausreichende Zahl von magnetischen *beads* über das rVAR2-Protein gebunden hat. Das so erhaltene Probenmaterial wurde dann zur weiteren Auswertung auf *3-well-slides* übertragen. So konnte unter anderem die Wiederfindungsrate der

Tumorzellen bestimmt werden, sie stellt den Quotienten aus gefundenen gegenüber eingesetzten Tumorzellen dar.

Bei dieser Methodik wurde zuerst das rVAR2-Protein zu der Probe gegeben und danach die magnetischen *beads* hinzugefügt. Diese Abfolge wird als indirektes Verfahren bezeichnet. Bei der direkten Methode wird rVAR2 zuerst an magnetische *beads* gekoppelt und dieses Konjugat der Probe zugegeben.

Jede Versuchsdurchführung beinhaltet zwei Replikate.



Abb. 3: KingFisher Instrument

KingFisher Duo Prime zur Isolation von mit magnetischen *beads* behafteten Zellen. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5400110#/5400110>) (52)

2.2.2 Aufarbeitung des Spenderblutes über Dichtegradienten-Zentrifugation

Um das optimale Verfahren zur Entfernung der Erythrozyten zu identifizieren, wurde der Erythrozyten-Lyse-Puffer mit der Dichtegradienten-Zentrifugation verglichen. Als Trennlösung wurden hierzu synthetische Polymere aus Saccharose (Ficoll) eingesetzt (53). Dabei wurden 5 ml des Spenderblutes auf 15 ml Ficoll in ein *SepMate™ PBMC Isolation tube* gegeben. Daraufhin wurden 500 Tumorzellen hinzugefügt. Dies wurde bei 1200 g für 10 Minuten mit einer Dezeleration von 9 (Bremsverzögerung) zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Serum und die Leukozyten in 10 ml Falconröhrchen abgeschüttet. Die Falconröhrchen wurden mit PBS bis 14 ml aufgefüllt und mehrfach invertiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 g für 10 Minuten wurde der Überstand in je ein weiteres Falconröhrchen pipettiert und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1200 g für 10 Minuten. Zuletzt wurde der Überstand aller Falconröhrchen abgenommen und die Zellpellets in 600 µl PF10 resuspendiert und in *Protein LoBind tubes* transferiert.

2.2.3 Ablösen der magnetischen Beads von den isolierten CTCs

In einem alternativen Verfahren wurde das Probenmaterial statt auf *3-well-slides* in Eppendorf *Protein LoBind tubes* transferiert. Der Vorteil des alternativen Verfahrens ist, dass die CTCs in den *tubes* für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Nach Zentrifugation der Probe bei 1300 RPM (317 g) für 8 Minuten wurde der Überstand verworfen und 100 µl Trypsin hinzugegeben. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden zwei verschiedene Inkubationszeiten (5 und 15 Min) bei 37 °C unter Zugabe von Trypsin getestet, um die *beads* von den Tumorzellen zu lösen. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte in dem Hybaid Shake'n'Stack Hybridisierungssofen. Daraufhin wurden die Proben auf einen Handmagneten gestellt und der Überstand mit den Tumorzellen auf ein *3-well-slide* pipettiert. Die *3-well-slides* wurden zuvor mit 50 µl FCS behandelt. In einem zweiten Waschschriff mit 100 µl PBS wurden eventuell verbliebene Tumorzellen aufgenommen und auf dasselbe *well* gegeben. Um die Effizienz der Trypsin-Ablösung zu beurteilen, wurden die abgelösten *beads* ebenfalls auf ein *3-well-slide* pipettiert. Nach der Etablierung einer geeigneten Färbemethode wurden die Tumorzellen, an denen keine *beads* mehr hafteten, auf *Sievewell Multiwell slides* übertragen.

2.2.4 Färbung in Sievewell Multiwell slides

Die isolierten Tumorzellen wurden in *Sievewell Multiwell slides* (54) gefärbt. Zwecks Vorbereitung der *Sievewell Multiwell slides* wurden die Filtermembranen initial 30 Sekunden mit Ethanol inkubiert und danach dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Vor der Probenzugabe wurden die *slides* für mindestens 30 Minuten mit 1 ml 0,1% Bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS inkubiert. BSA wurde eingesetzt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern und Zellen an die *Sievewell Multiwell slides* zu verhindern (55). Nach Abnahme von 200 µl BSA in PBS, wurden 200 µl der Zellprobe hinzugegeben. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Tumorzellen innerhalb von 60 Minuten angefärbt. Mit spezifischen anti-humanen Antikörpern erfolgten der Nachweis von CK (CK ALL: Pancytokeratin Antikörper Cocktail (CK1, CK3, CK4, CK5, CK6, CK8, CK10, CK13, CK14, CK15, CK16, CK18, CK19; Mausklone C11/AE1/AE3), AcZon SRL, Italien; Farbstoff: TRITC), der Ausschluss von CD45 (CD45 (35-Z6) Alexa Flour 647, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA; Farbstoff: Cy5) sowie die Färbung der DNA des Zellkerns mittels DAPI. Nach erneutem Waschen konnten die *slides* am CellCelector (Waltham, MA, USA) ausgewertet werden. Mittels manueller Auswahl und Steuerung konnten die CTCs detektiert und als Einzelzellen isoliert werden.

2.2.5 Isolation von Einzelzellen mit dem CellCelector

Mithilfe des automatischen Zell-Imaging- und Pickingsystems CellCelector (s. Abb. 4) erfolgte die Isolation der Patienten-CTCs. Der CellCelector besteht aus einem inversen Mikroskop mit Kamera, einem Roboter-Arm zur Mikromanipulation, einer Glaskapillare zur Aspiration von Zellen und

einem Ablagesystem (56,57). Die Probe in den *Sievwell Multiwell slides* wurde bei 40facher Vergrößerung (Olympus CKX 41; Kamerasystem: CCD-Kamera XM10-IR, ALS CellCelector-Software 3.0) in folgenden Fluoreszenzkanälen gescannt: Cy5 (CD45), DAPI (Nukleus) und TRITC (Zytokeratin). Nach dem Scannen wurde eine Liste mit folgenden Merkmalen erstellt: CD45-Negativität, DAPI-Positivität und CK-Positivität. Diese Ergebnisse wurden manuell ausgewertet und potenzielle CTCs für den Isolationsvorgang markiert. Nach vorheriger Aufnahme von 9 µl PBS-Puffer in die Glaskapillare erfolgte die anschließende Aspiration der CTC in einem Volumen von 20-100 nL. Die isolierte Tumorzelle wurde in ein 100µl-PCR-Röhrchen überführt. 9 µl PBS spülten die Zelle in das Zielgefäß. Die Probe mit der abgelegten Einzelzelle wurde für 5 min bei 370 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, daraufhin wurde der Überstand bis auf 1 µl abgenommen und die Probe anschließend bei -80 °C für spätere molekulare Analysen wie z.B. eine WGA eingefroren.

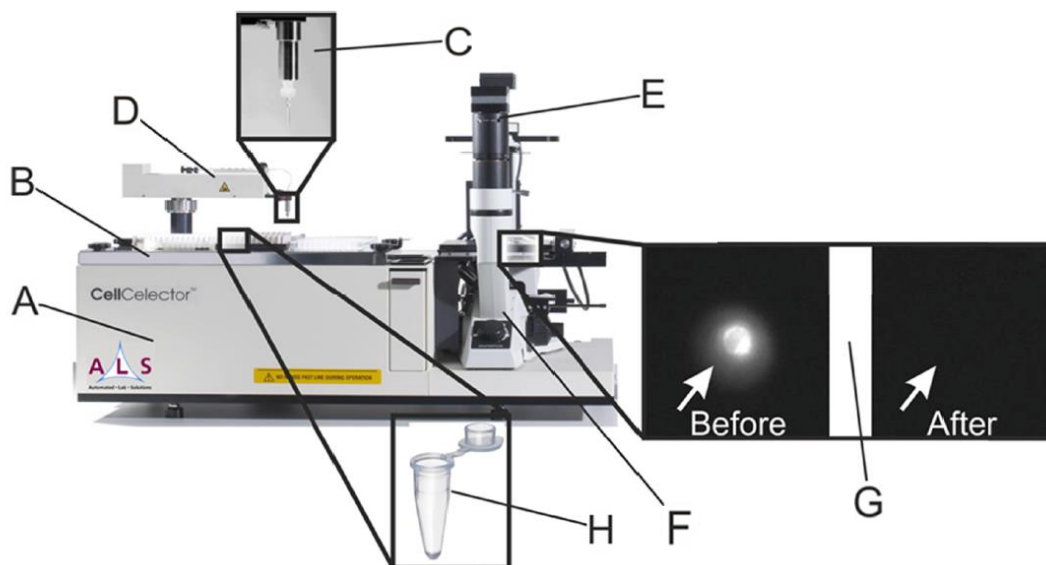


Abb. 4: CellCelector

Der CellCelector besteht aus zwei Komponenten: dem automatischen Mikromanipulator (A-D) und dem optischen System (E, F). Auf der Basiseinheit des CellCelectors (A) liegt das sogenannte Decktray (B). Das Decktray kann 96-PCR-Tubes aufnehmen (H) und enthält Positionen für Glasobjektträger und eine n-Wellplatte. Die Glaskapillare (C) zur Aufnahme von Zellen wird über einen Roboterarm (D) gesteuert. Das optische System setzt sich zusammen aus dem Olympus-Mikroskop (F), der monochromen CCD Kamera (E) und dem Kreuztisch, auf dem sich die Probe befindet. Unter G ist exemplarisch eine isolierte Einzelzelle gezeigt. (Nach Neumann *et al.*, 2016 (23) und Lampignano *et al.*, 2017 (58))

2.2.6 Färbung und Ablösen der magnetischen *beads* im KingFisher Instrument

Im Rahmen der Etablierung eines optimierten Verfahrens wurde getestet, inwieweit es möglich ist, die Tumorzellen im KingFisher Instrument zu färben. Die Probe wurde in *well A* der *Deepwell*-Platte gegeben. In *well B* befand sich 600 µl PF10-Lösung. Die Zellen wurden für 15 Minuten in *well C* in 600 µl Formalin fixiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 60 Minuten in *well E* im oben genannten Antikörper/Farbstoff-Mix gefärbt. Auf ein erneutes Waschen folgte die

Übertragung der Probe auf *3-well-slides*. Nach der beschriebenen Färbung im KingFisher Instrument war keine verwertbare Analyse der Zellen möglich, da die *beads* zu einer starken Hintergrundfluoreszenz geführt haben (s. Abb. 5).

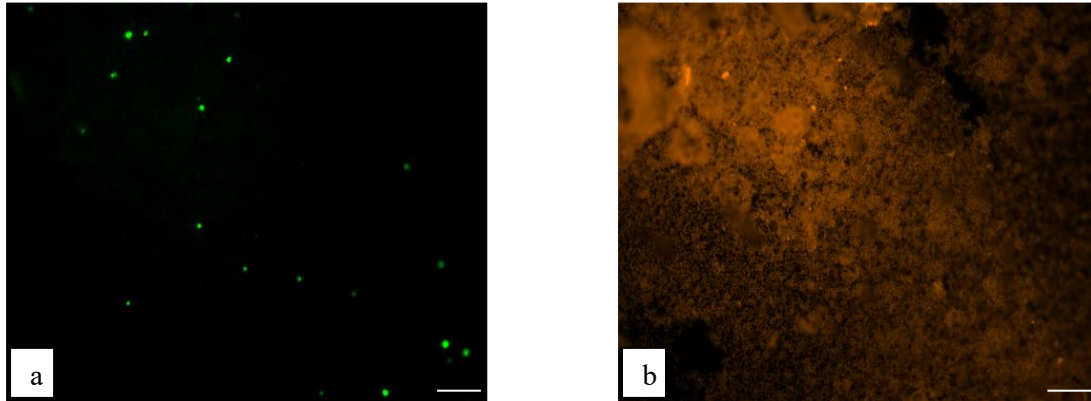


Abb. 5: Färbung im KingFisher Instrument

a = CTG-gefärbte CTCs mit *beads* im FITC-Kanal (957ms Belichtung)

b = CK-gefärbte CTCs mit *beads* im TRITC-Kanal (1000ms Belichtung)

CK = Zytokeratin, CTG = *Celltracker Green*, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, TRITC = Tetramethylrhodamine; weißer Balken = 50µm

Die Abbildungen zeigen eine Probe mit Tumorzellen nach Färbung im KingFisher Instrument im FITC-Kanal (a) und im TRITC-Kanal (b). Die *beads* führten zu einer starken Hintergrundfluoreszenz im TRITC-Kanal (b), sodass eine Abgrenzung der Tumorzellen schwerfällt.

Die Bilder wurden mit dem Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

Folglich wurde getestet, ob die *beads* im KingFisher Instrument von den Zellen abgelöst werden können. Dabei wurde die Probe in *well A*, der Waschpuffer in *well B* und 200 µl Trypsin in *well C* gegeben. Final wurde das Trypsin mit den *bead*-freien Zellen zur weiteren Auswertung mit 50 µl FCS auf *3-well-slides* gegeben. Es wurden verschiedene Eintauchgeschwindigkeiten und -tiefen der Spitzen des KingFisher Instruments [*tips*] in die *wells* zum Mixen der Probe getestet. Die *tips* des KingFisher Instruments sind Einweg-Kunststoff-Spitzen, welche den Magneten umhüllen. Die Geschwindigkeit im KingFisher Instrument nimmt zu in den Stufen „*slow*“, „*medium*“ und „*fast*“. Bei diesen Geschwindigkeiten fahren die Spitzen des KingFishers durch die gesamte Probe. Bei der Einstellung „*bottom mix*“ mischen die *tips* des KingFishers die Probe nur am Boden des *wells* mit derselben Geschwindigkeit wie bei der „*fast*“-Einstellung. In diesem Versuch wurden drei dieser Geschwindigkeiten und Eintauchtiefen getestet: *medium*, *fast* und *bottom mix*. Im Weiteren wurde die *fast*-Einstellung verwendet. Zur Optimierung dieses *bead-release* Protokolls wurde das Trypsin in *well A* gegeben, da dieses beheizbar ist und bei 37 °C eine entsprechend höhere Aktivität des

Trypsins zu erwarten ist (59). Um das Anheften von verklumpten *beads* an den *tips* zu verhindern, wurden die *tips* des KingFishers Instrument in PF10- oder FCS-Lösungen vorinkubiert.

Da sich das Protokoll für einen manuellen *bead-release* als effektiver darstellte, wurde anschließend mit diesem weitergearbeitet. Nach der Färbung im KingFisher Instrument wurden die *beads* nach dem unter 2.2.2 beschriebenen Verfahren abgelöst.

2.2.7 Reduktion der störenden Leukozyten

Nach dem ersten Durchlauf mit *spike-in* Zellen stellte sich ein starker Hintergrund, bestehend aus mononukleären Blutzellen, dar. Daher wurden verschiedene Verfahren zur Reduktion der Leukozytenzahl untersucht. Es wurde der Einfluss mehrerer Waschschriffe auf die Wiederfindungsrate der Tumorzellen und die Leukozytenzahl-Reduktion untersucht.

Im Rahmen der weiteren Optimierung wurde die optimale Konzentration von rVAR2 ermittelt mit dem Ziel einer Reduktion der störenden Leukozyten bei gleichbleibend hoher Wiederfindungsrate. Dazu wurden verschiedene rVAR2-Konzentrationen, 25 nmol, 50 nmol, 100 nmol und 200 nmol miteinander verglichen (s. 2.2.1).

2.2.8 Erstellung von *cytospins* zum Nachweis von Leukozyten

Zum Nachweis von Leukozyten bzw. der Reduktion dieser wurden *cytospins* der Überstände aus den Waschschriffen im KingFisher Instrument sowie der finalen Proben erstellt. Hierzu wurde ein Tropfen *NucBlue* pro 500 µl auf den Objektträger gegeben und der Waschpuffer hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten wurden die Objektträger bei 800 g für 4 Minuten zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgenommen und die Objektträger erneut bei 600 g für eine Minute zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstands wurde die Probe mit einem Fettstift umrandet und mit einem Tropfen *Mounting Medium* eingedeckelt. So stand sie für weitere Analysen unter dem CellCelector zur Verfügung.

2.2.9 Färbung im CellSearch Instrument

Zur Färbung von Tumorzellen mit rVAR2 im CellSearch Instrument (s. Abb. 6) wurde SpyCatcher-PE verwendet. Es wurde 7,5 ml Blut mit 300 MCF-7 Zellen versetzt und in ein CellSearch *tube* überführt. Dieses wurde mit 6,5 ml CXC Puffer aufgefüllt und bei 800 g für 13 Minuten zentrifugiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurde der Komplex aus rVAR2 und SpyCatcher-PE mit PBS auf 450 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und in das CellSearch Instrument gestellt. Nach Hinzugabe der Probe wurde das CXC-Protokoll im CellSearch Instrument ausgeführt. Es wurden die Konzentrationen 33 nmol und 100 nmol rVAR2 und SpyCatcher-PE und die Belichtungszeiten des PE-Kanals von 10 ms, 30 ms, 100 ms und 500 ms getestet.



Abb. 6: CellSearch bestehend aus dem CellSearch Autoprep System und CellTracks Analyzer II

Das CellSearch-Instrument besteht aus dem CellSearch Autoprep System (A) zur Anreicherung und Färbung der CTCs und dem CellTracks Analyzer II (B) zur Detektion dieser. (<https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsearch-system-overview>) (24)

2.2.10 Whole Genome Amplification und Next Generation Sequencing

Zum Nachweis tumorspezifischer Mutationen in mittels rVAR2 isolierten CTCs wurde die gesamte DNA einzelner isolierter CTCs aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen mittels Ampli1 WGA Kit (Menarini, Bologna, Italien) (60) amplifiziert. Hierbei wurden die Zellen lysiert und die DNA mit dem Restriktionsenzym Mse-I fragmentiert. An die einzelnen DNA-Fragmente wurden Adaptoren gebunden, über die mit spezifischen PCR-Primern die Fragmente linear amplifiziert werden konnten. Die Integrität der DNA wurde mittels Ampli 1 QC Kit (Menarini) ermittelt. Zur Bestimmung krebsspezifischer Mutationen der CTCs wurde das von Franken *et al.* etablierte Multiplex PCR-basierte *next generation sequencing*-Panel verwendet (61). Dabei wurden *Hotspot*-Regionen für Mutationen, u.a. in den Genen *PIK3CA* und *ERBB2*, mit genspezifischen Primern (s. Tabelle 1) amplifiziert und mit einem Barcode versehen. Die anschließende Sequenzierung wurde auf einem MiSeq System (Illumina, San Diego, CA, USA) durchgeführt (61). Als Negativkontrolle für die PCR wurde eine zellfreie Lösung verwendet, als Negativkontrolle für die Mutationsanalyse wurden Leukozyten genutzt. Als Positivkontrolle wurden für die *PIK3CA*-Position H1047 T47-D Zellen genutzt. Die Tumorzellen aus den Patientenproben wurden parallel mittels rVAR2 oder im CellSearch System isoliert, daher kann das Mutationsspektrum der unterschiedlich angereicherten CTCs direkt miteinander verglichen werden.

Tabelle 1: Genspezifische *Primer* (61)

| | <i>Forward Primer</i> | <i>Reverse Primer</i> |
|-------------------|--|---|
| PIK3CA Exon 5 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAG CATTTCACAGCTACACCA 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGT TCTCCTAACCATCTGA 3' |
| PIK3CA Exon 10 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAG GGAAAATGACAAAGAACAG 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAATTT TAGCACTTACCTGTGAC 3' |
| PIK3CA Exon 21 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAT TGATGACATTGCATACATTCG 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTGGA AGATCCAATCCATTT 3' |
| ERBB2 Exon 8 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAG GCTACATGTTCTGATCTCC 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAGGGTC TGAGGAAGGATAGGA 3' |
| ERBB2 Exon 18 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAA AGTACACGATGCGGAGACT 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAACCTT CACCTTCCTCAGCTC 3' |
| ERBB2 Exon 19 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAA TCCTCCTCTTTCTGCCAG 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAAGTCT AGGTTTGCGGGAGTC 3' |
| ERBB2 Exon 20 | 5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAT GGTTTGTGATGGTTGGGAG 3' | 5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAGACAT GGTCTAAGAGGCAGC 3' |

Legende: ERBB2 = Erb-B2 Rezeptor Tyrosin Kinase 2; PIK3CA= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase katalytische Untereinheit alpha

2.2.11 Statistik

Die in dieser Arbeit dargestellten Grafen und Abbildungen wurden mittels PRISM 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) erstellt. Bei Experimenten mit $n = 2$ Durchläufen werden die Ergebnisse in Form von Mittelwert mit Standardfehler (*Mean with SEM*) dargestellt. Experimente mit $n > 2$ Durchläufen werden hier mit Mittelwert und Standardabweichung aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich verschiedener rVAR2 Chargen

Zunächst wurden verschiedene Chargen des rVAR2 Proteins verglichen. Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass mit der Charge (MP3643) rVAR2 äquivalente Ergebnisse wie mit der zuvor eingesetzten Charge (MP3352) erreicht werden (s. Abb. 7). Unter Einsatz der Zelllinie A549 wurden mit beiden rVAR2-Chargen Wiederfindungsraten von ca. 79 % erzielt. Folglich sind die nachfolgenden Versuchsergebnisse mit den rVAR2-Chargen MP3352 und MP3643 vergleichbar.

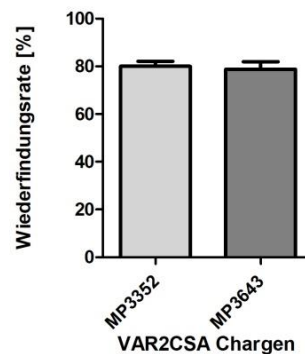


Abb. 7: Vergleich VAR2CSA Chargen (n = 1, je 2 Replikate)

VAR2CSA= variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A

3.2 Optimierung des Verfahrens

Um die Wiederfindungsrate deutlich zu erhöhen, wurde das oben beschriebene indirekte Verfahren (s. 2.2.1) verwendet – mit der Änderung, dass die Tumorzellen nach der Färbung mit *CellTracker Green* für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Dabei wurde zuerst das Spenderblut lysiert und mit *CellTracker Green* gefärbte Tumorzellen eingespikt. Nach Zugabe des rVAR2-SpyCatcher-Komplexes und mehreren Waschschrritten wurden die magnetischen *beads* hinzugefügt, sodass die Probe in den KingFisher transferiert werden konnte. Dieser isoliert die Zellen, an welche eine ausreichende Zahl von magnetischen *beads* über das rVAR2-Protein gebunden ist. Für die folgenden Versuche wurden zwei verschiedene Mammakarzinomzelllinien verwendet (MDA-MB-231, Sk-Br-3). Allerdings wurden mit dieser Vorgehensweise weniger Zellen detektiert als ohne Inkubation (s. Abb. 8). Die Differenz zwischen den Wiederfindungsraten mit und ohne Inkubation nach Färbung lag bei den MDA-MB-231 Zellen bei ca. 30 % und bei den Sk-Br-3 Zellen bei ca. 10 %.

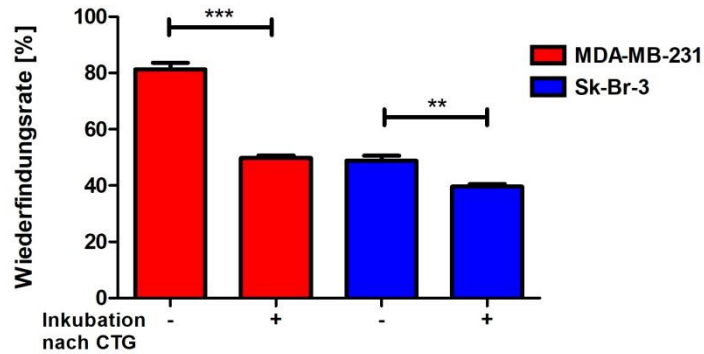


Abb. 8: Wiederfindungsrate mit und ohne zusätzliche Inkubation nach *CellTracker Green* (CTG) Färbung (n = 2)

3.3 *spike-in* vor Erythrozyten-Lyse

Um eine Patientenprobe zu simulieren und die Auswirkungen der Erythrozyten-Lyse auf die Tumorzellen zu bestimmen, wurde das Experiment mit dem Unterschied zu 2.2.1 durchgeführt, dass die Tumorzellen vor der Erythrozyten-Lyse zum Blut hinzugegeben wurden. Die Erythrozyten-Lyse zeigte keinen Effekt auf die rVAR2-basierte Wiederfindungsrate (s. Abb. 9). Als Vergleich wurde die Zelllinie Colo 205 verwendet, die rVAR2 stark bindet (32,45). Die Wiederfindungsraten lagen bei Colo 205 Zellen im Durchschnitt bei 91,2 % (vor Erythrozyten-Lyse: 92,4 %, nach Erythrozyten-Lyse: 89,9 %), bei MDA-MB-231 Zellen bei ca. 81,1 % (vor Erythrozyten-Lyse: 82,1 %, nach Erythrozyten-Lyse: 80,2 %) und bei Sk-Br-3 Zellen bei ca. 53,4 % (vor Erythrozyten-Lyse: 55,1 %, nach Erythrozyten-Lyse 51,7 %).

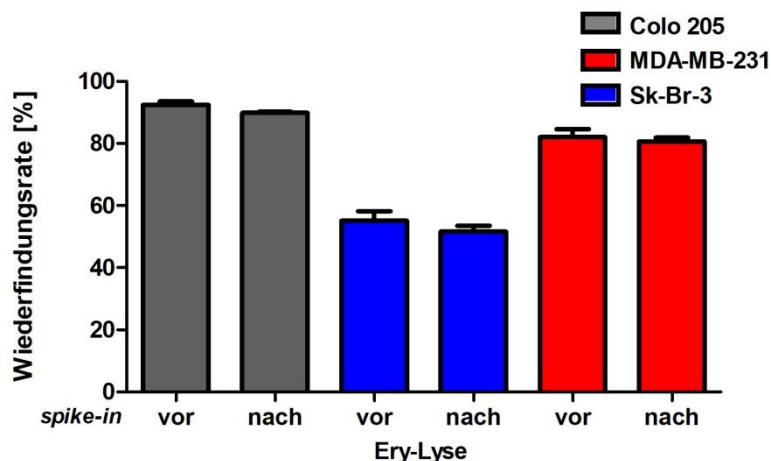


Abb. 9: Vergleich der Wiederfindungsraten bei *spike-in* vor bzw. nach Erythrozyten-Lyse (n = 2)

3.4 *spike-in* vor Erythrozyten-Lyse im Vergleich zur Dichtegradienten-Zentrifugation

Um zu bestimmen welches Verfahren am besten zur Entfernung von Erythrozyten geeignet ist, wurde das Experiment mit dem Unterschied zu 2.2.1 durchgeführt, dass die Tumorzellen vor der Erythrozyten-Lyse dem Blut hinzugegeben wurden. Parallel dazu wurden Tumorzellen in Blut in ein *SepMate™ PBMC Isolation tube* gegeben und dies mittels Ficoll aufgearbeitet (s. 2.2.2). In diesem Ansatz wurde die Zelllinie A549 verwendet. Die Wiederfindungsrate lag nach Erythrozyten-Lyse bei ca. 79,0 % und nach Dichtegradienten-Zentrifugation bei ca. 36,3 % (s. Abb. 10). Zwei von sechs Proben zeigten am Ende des Ficoll-Experiments Verklumpungen, die Wiederfindungsrate der verklumpten Proben lag bei < 1 %. Nach Ausschluss der verklumpten Proben lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate nach Dichtegradienten-Zentrifugation bei 54,0 %.

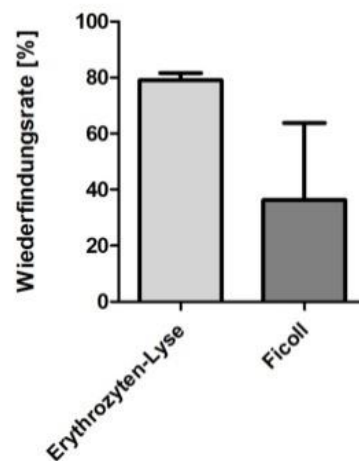


Abb. 10: Vergleich verschiedener Erythrozyten-Entfernungen (n = 3)

3.5 Detektion und Isolation von Tumorzellen verschiedener Zelllinien in Blutproben

Um die Wiederfindungsraten verschiedener Krebszelllinien zu bestimmen, wurde das oben beschriebene Protokoll (s. 2.2.1) durchgeführt. Dabei ließen sich die in Abb. 11 dargestellten Wiederfindungsraten ermitteln.

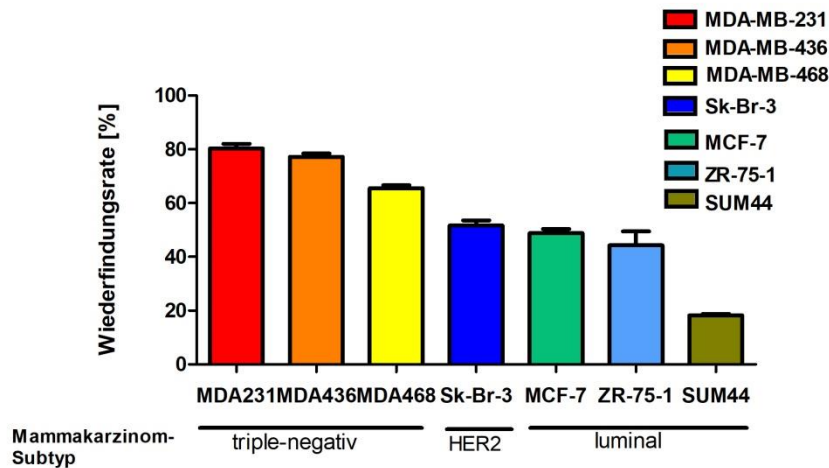


Abb. 11: Zelllinien-Vergleich (n = 2)

HER2 = *human epidermal growth factor 2*

Die Wiederfindungsrate der triple-negativen Zelllinien variierte zwischen 65 % und 80 %. Die Wiederfindungsrate von MDA-MB-231 Zellen lag bei ca. 80,3 %, die von MDA-MB-436 Zellen bei 77,2 % und die von MDA-MB-468 Zellen bei 65,6 %. Die Wiederfindungsrate der HER2-amplifizierten Zelllinie Sk-Br-3 lag bei 51,7 %. Die luminalen Zelllinien MCF-7 und ZR-75-1 wiesen eine Wiederfindungsrate von 48,8 % und 44,4 % auf. Die Wiederfindungsrate von SUM44 lag bei 18,2 %.

Triple-negative Mammakarzinomzelllinien wurden grundsätzlich erfolgreicher detektiert als luminalen Zelllinien.

3.6 Ablösen magnetischer *beads* von den isolierten zirkulierenden Tumorzellen

Bei der Ablösung der *beads* mittels Trypsin wurden Inkubationszeiten von 5 und 15 Minuten getestet (s. 2.2.3). Hierbei wurde die Zelllinie A549 verwendet. Im direkten Vergleich konnten nach 15 Minuten Inkubation mehr *beads* von den Zellen gelöst werden (s. Abb. 12). Nach 5 Minuten wurden 57,2 % der Zellen wiedergefunden, davon waren 96,5 % *bead*-frei und 3,5 % noch an *beads* gebunden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden 63,7 % der Zellen wiedergefunden, von diesen waren 97,3 % *bead*-frei und 2,7 % noch an *beads* gebunden. Folglich wurde fortan mit einer Trypsin-Inkubationszeit von 15 Minuten weitergearbeitet.

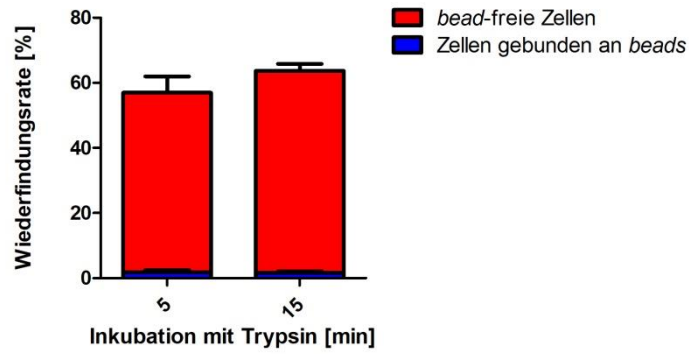


Abb. 12: Ablösen der *beads* mit Trypsin (n = 2)

3.7 Reduktion der störenden Leukozyten

Bei der Färbung in den *Siewewell Multiwell slides* stellte sich ein störendes Hintergrundsignal dar, verursacht von mitisolierten Leukozyten. Zur Reduktion der Leukozytenzahl wurden mehrere Waschschrte im KingFisher Instrument durchgeführt. Die Waschschrte hatten keinen Einfluss auf die Wiederfindungsrate der Tumorzellen (s. Abb. 13). Die Experimente wurden mit der Zelllinie A549 durchgeführt und die Wiederfindungsrate lag bei allen drei getesteten Ansätzen im Bereich von 80,0 %. In *cytopins* aller Waschpuffer wurden Leukozyten nachgewiesen und das Verfahren wurde fortan um zwei zusätzliche Waschschrte ergänzt. Mehrfaches Waschen führte zu einer Senkung der Leukozytenzahl, welche jedoch als nicht ausreichend erachtet wurde.

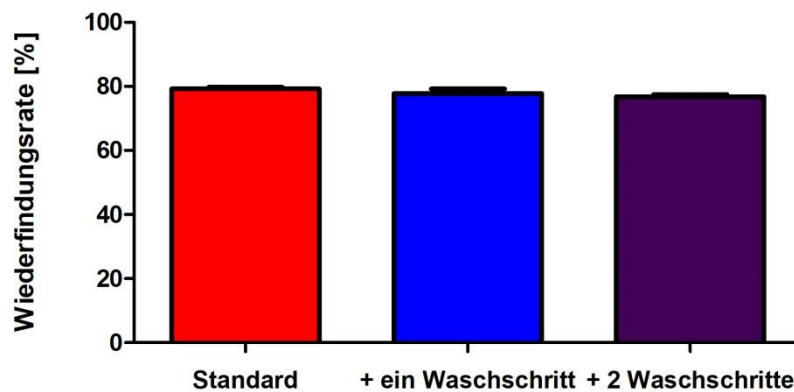


Abb. 13: Wiederfindungsraten bei unterschiedlicher Menge an Waschschrten (n = 2)

Mit dem Ziel die Leukozytenzahl noch weiter zu senken, wurde eine Reduktion der rVAR2-Konzentration getestet. Bei rVAR2-Konzentrationen zwischen 50 nmol und 200 nmol blieb die Wiederfindungsrate der Tumorzellen konstant (s. Abb. 14). Die Experimente wurden mit der Zelllinie A549 durchgeführt. Die Wiederfindungsrate lag bei einer Konzentration von 25 nmol bei 40,0 %, bei 50 nmol bei 77,4 %, bei 100 nmol bei 77,7 % und bei 200 nmol bei 80,0 %. Zusätzlich konnte mittels *cytopins* (s. Abb. 15) nachgewiesen werden, dass mit niedrigeren rVAR2 Konzentrationen auch die Leukozytenzahl im Hintergrund abnimmt.

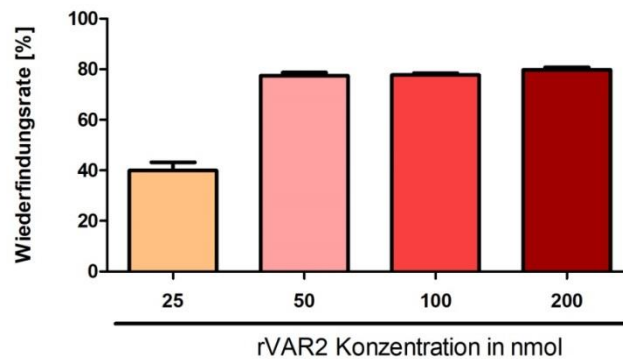
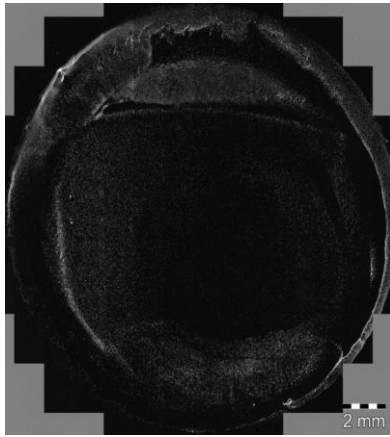
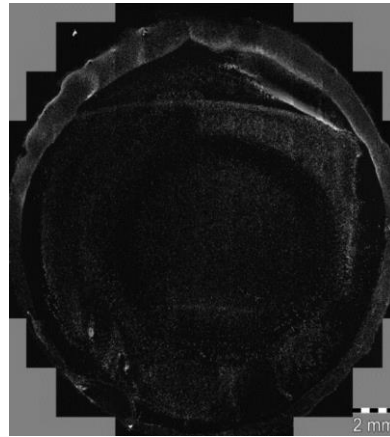


Abb. 14: rVAR2-Konzentrationen Vergleich (n = 2)

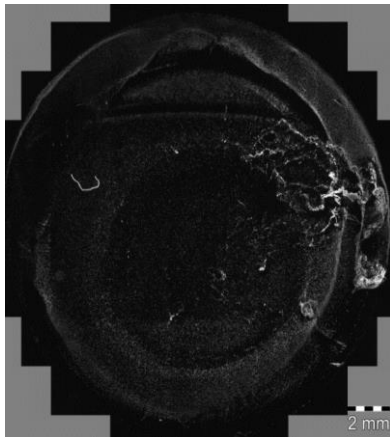
nmol = nanomol; rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*



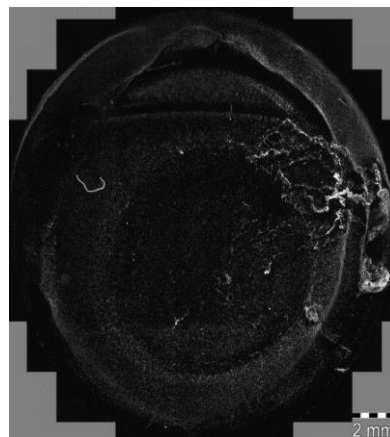
50 nmol Probe 1



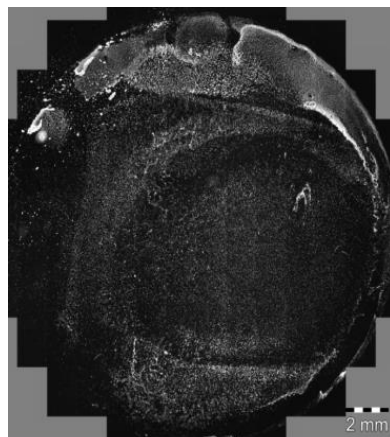
50 nmol Probe 2



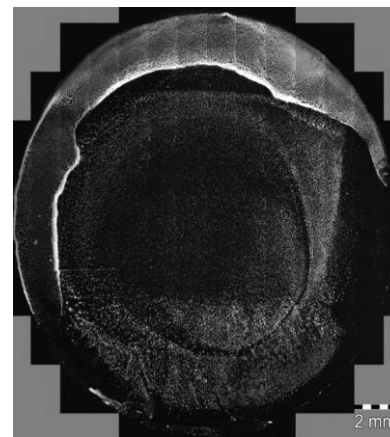
100 nmol Probe 1



100 nmol Probe 2



200 nmol Probe 1



200 nmol Probe 2

Abb. 15: Beispielhafte cytospins von Proben mit verschiedenen rVAR2 Konzentrationen

Belichtungszeit: DAPI: 200 ms (x2 Verstärkungsfaktor), 10x Vergrößerung;
nmol= nanomol; rVAR2= *recombinant Variant Surface antigen 2*

Mit niedrigeren rVAR2 Konzentrationen ist eine Abnahme der Leukozytenzahl im Hintergrund verbunden.

3.8 Wiederfindungsraten in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Tumorzellen

Um nachzuweisen, dass mit dem etablierten Verfahren auch geringere Tumorzellzahlen als 500 Zellen pro 600 µl Probenmaterial isoliert werden können, wurden *spike-in* Experimente mit den folgenden Zellzahlen durchgeführt: 5, 10, 50, 100 und 500 pro 600 µl. Die entsprechende Anzahl an Tumorzellen wurden mithilfe des MoFlo XDP Durchflusszytometers (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) in die Proben hineingegeben. Auch geringere Konzentrationen an Tumorzellen konnten isoliert werden (s. Abb. 16). Bei einer Tumorzellzahl von 5 pro 600 µl lag die Wiederfindungsrate bei 100 %, bei 10 Zellen bei 90%, bei 50 Zellen bei 81 %, bei 100 Zellen bei 80 % und bei 500 Zellen bei 78 %. Es wurde gezeigt, dass mit abnehmender Anzahl an *spike-in*-Zellen die Wiederfindungsrate ansteigt.

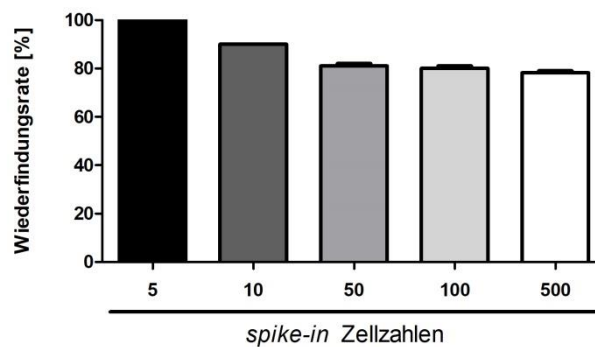


Abb. 16: Vergleich der Wiederfindungsraten bei verschiedenen Tumorzellmengen (n = 1, je 2 Replikate)

3.9 Färbung und Ablösen der *beads* im KingFisher Instrument

Mit dem Ziel ein robustes Verfahren zu etablieren, wurde getestet, ob es möglich ist, die Tumorzellen im KingFisher Instrument zu färben und die *beads* dort zu lösen (s. 2.2.6). Bei der Färbung im KingFisher Instrument gingen ca. 10 % der Tumorzellen verloren (s. Abb. 17). Das Ablösen der *beads* unter den bei 2.2.6 genannten Gegebenheiten im KingFisher Instrument führte zu folgenden Ergebnissen (s. Abb. 18): Bei der Einstellung „*medium*“ am KingFisher Instrument waren 4,2 % der Zellen ohne *beads* und 35,2 % der Zellen mit gebundenen *beads*. Bei der Einstellung „*fast*“ waren 18,6 % *bead*-freie Zellen und 28,9 % Zellen gebunden an *beads*. Bei der Einstellung „*bottom mix*“ waren 20,5 % der Zellen *bead*-frei und 20,2 % noch an *beads* gebunden.

Wiederholt wurde dabei die Beobachtung gemacht, dass *beads* nach dem Ablösen mit Trypsin an den *tips* des KingFishers Instrument verblieben. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der Optimierung des Verfahrens die *tips* mit FCS bzw. PF10 vorinkubiert (s. Abb. 19). Dabei lagen bei der Inkubation der *tips* mit FCS 11 % der Zellen *bead*-frei und 31 % der Zellen noch an *beads* gebunden vor. Bei der Inkubation mit PF10 waren 10 % ohne *beads* und 26 % mit gebundenen

beads. Im Versuchsdurchlauf ohne Inkubation der *tips* lagen 8 % der Zellen frei von *beads* und 21 % der Zellen mit gebundenen *beads* vor.

Dieser Versuch zeigt, dass durch die Färbung der Probe im KingFisher Instrument ca. 10% der Zellen verloren gehen. Im Anschluss an die Färbung ließen sich die *beads* nur eingeschränkt von den Zellen lösen und auch eine Vorinkubation der *tips* mit PF10- und FCS-Lösung ergab keine Besserung (s. 4.2).

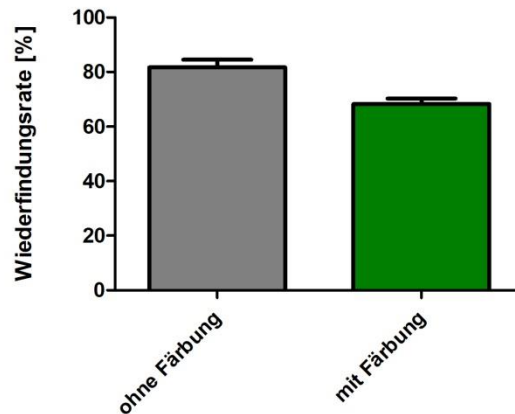


Abb. 17: Wiederfindungsrate bei Färbung für CK, DAPI und CD45 im KingFisher Instrument (n = 1, je 2 Replikate)

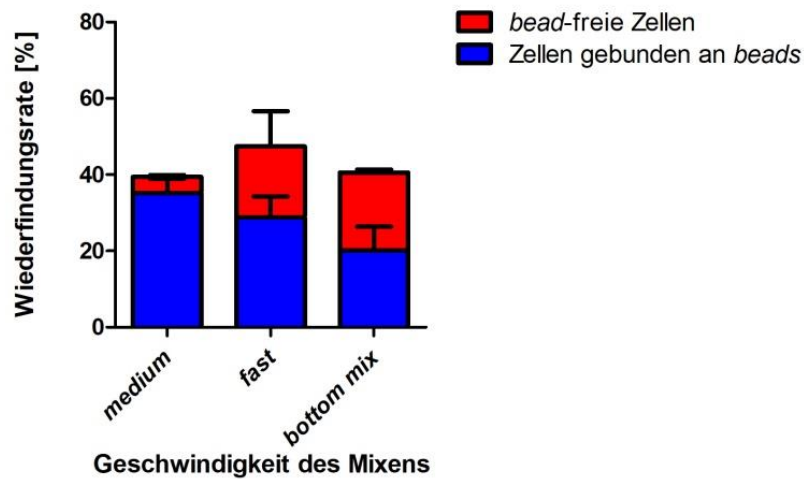


Abb. 18: *bead* Ablösen im KingFisher Instrument (n = 1, je 2 Replikate)

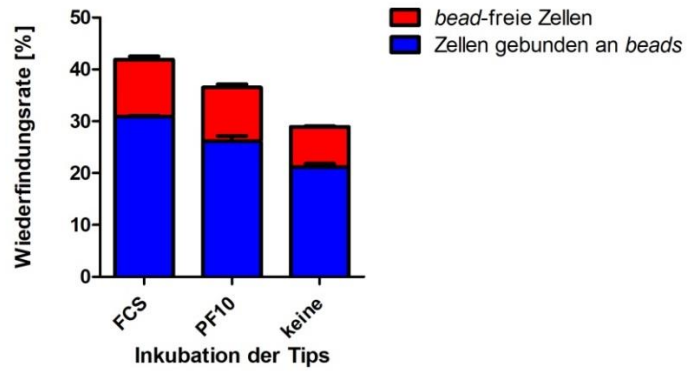


Abb. 19: optimiertes *bead* Ablösen im KingFisher Instrument (n = 1, je 2 Replikate)

FCS = *fetal calf serum*; PF10= *protein -free blocking buffer* 10% in phosphathaltiger Pufferlösung (PBS)

3.10 *spike-in* Experimente in DLA-Produkten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Tumorzellen in Produkten der diagnostischen Leukapherese (DLA) wurden MDA-MB-231 Zellen in DLA-Produkte pipettiert. Dabei wurde die Wiederfindungsrate stark von der Leukozytenkonzentration der DLA-Produkte beeinflusst (s. Abb. 20). Durchschnittlich lag die Wiederfindungsrate von MDA-MB-231 Zellen im Blut bei 79,2 %, bei einer Leukozyten Konzentration von 30×10^6 bei 78,8 %, von 50×10^6 bei 53,2 %, von 100×10^6 bei 42,8 % und von 200×10^6 bei 15,4 %.

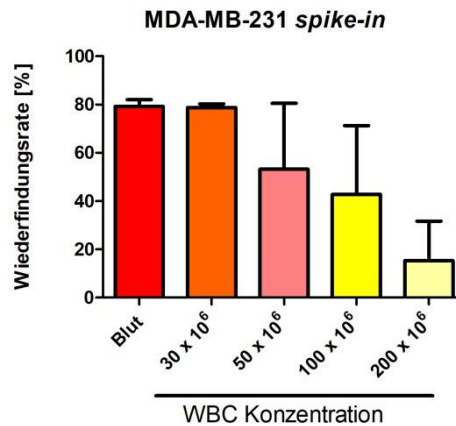


Abb. 20: *spike-in* Versuch in DLA (n = 3)

DLA = Diagnostische Leukapherese; WBC = *white blood cell*

Nach der Abnahme wurden DLA-Produkte zur späteren Analyse bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Tumorzellen wurden MDA-MB-231 Zellen in frisch gewonnene DLA-Produkte hinzugegeben und die so präparierten DLA-Produkte tiefgefroren. Dies wurde einmalig durchgeführt, um den Einfluss des Einfrierens auf die Wiederfindungsrate der Tumorzellen zu bestimmen. Dabei lag die Wiederfindungsrate bei einer Leukozyten Konzentration von 30×10^6 bei 18,6 %, von 50×10^6 bei 12,4 % und von 100×10^6 bei 2,4 %. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Abnahme der Wiederfindungsrate mit zunehmender Leukozyten Konzentration.

3.11 Detektierte CTCs aus Patientenproben und zugehörige klinische Daten

Nach Etablierung eines geeigneten Protokolls für die Verarbeitung von Patientenproben konnten CTCs von Patientinnen isoliert werden. Folgende Tabelle gibt dies wieder:

Tabelle 2: Patientenproben und detektierte zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

| Patienten-ID | detektierte CTCs |
|-------------------------------|------------------|
| Patient 1 | 8 |
| Patient 2 | 0 |
| Patient 3 | |
| verarbeitet mit 200nmol rVAR2 | 12 |
| verarbeitet mit 100nmol rVAR2 | 15 |
| Patient 4 | 7 |
| Patient 5 | 4 |
| Patient 6 | 0 |

Legende: nmol: nanomol; rVAR2: *recombinant Variant surface antigen 2*

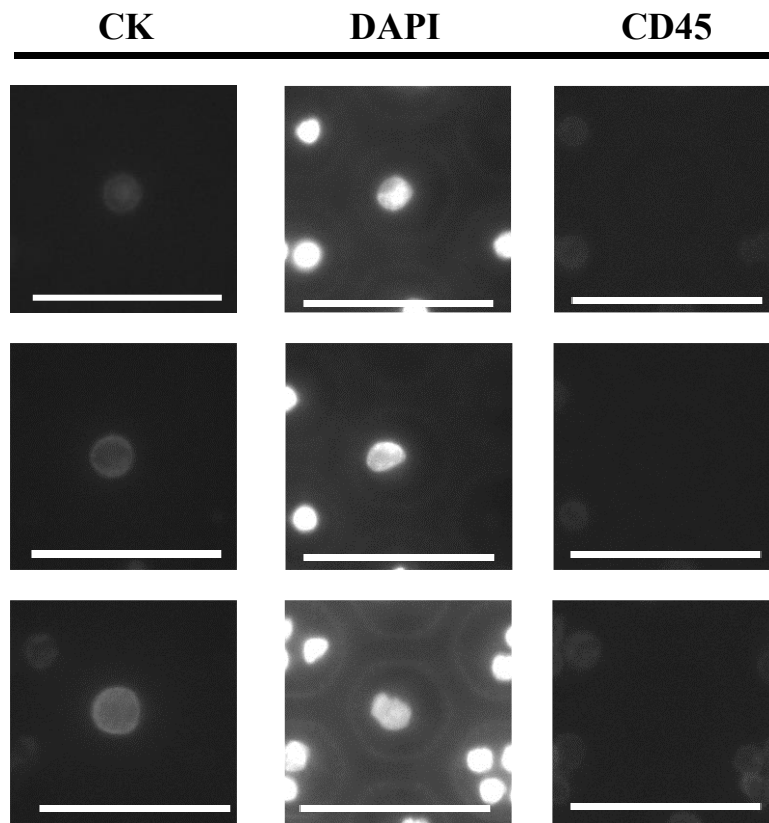


Abb. 21: CTCs aus einer Patientenprobe (Patient 4)

Belichtungszeiten: CK TRITC: 200 ms (x8 Verstärkungsfaktor), DAPI: 50 ms (x8 Verstärkungsfaktor), CD45 Cy5: 500 ms (x8 Verstärkungsfaktor), Weißer Balken = 50 µm
 CD45= *Cluster of differentiation 45*; CK= *Zytokeratin*; Cy5 = *Cyanin 5*; DAPI= *4',6-Diamidin-2-phenylindol*; TRITC: *Tetramethylrhodamine*
 Die Bilder wurden bei 40x Vergrößerung im CellCelector aufgenommen.

Tabelle 3: Information zu den Augusta Patientinnen (Teil 1)

| Proben-ID | Alter bei Blutentnahme | Blutgruppe | Histologie | Subtyp | Grading |
|-----------|------------------------|------------|-----------------|---------|---------|
| Patient 1 | 54 | A Rh - | NST | luminal | 2 |
| Patient 2 | 65 | A Rh + | invasiv lobulär | luminal | 2 |
| Patient 3 | 68 | A Rh - | NST | TNBC | 3 |
| Patient 4 | 72 | B Rh + | NST | luminal | 2 |
| Patient 5 | 37 | n.d. | NST | TNBC | 3 |
| Patient 6 | 55 | A Rh - | NST | luminal | 2 |

Legende: n.d. = *not defined*, NST = Invasives Karzinom ohne speziellen Typ, Rh = Rhesus, TNBC = *triple-negative breast cancer*

Tabelle 4: Information zu den Augusta Patientinnen (Teil 2)

| Proben-ID | Tumor Größe, T | Nodal Status bei Erstdiagnose, N | M Status im Verlauf der Erkrankung, Metastasen |
|-----------|----------------|----------------------------------|--|
| Patient 1 | T2 | N2 | M1 (ossär/lymphogen/hepatisch) |
| Patient 2 | cT4c | cN+ | M1 (ossär/lymphogen) |
| Patient 3 | pT2m | pN0 | M1 (pulmonal/hepatisch) |
| Patient 4 | T2 | N2 | M1 (ossär/Knochenmark) |
| Patient 5 | pT2 | pN0 | M1 (pulmonal) |
| Patient 6 | cT4d | cN0 | M1 (ossär/lymphogen) |

Legende: c = klinisches Stadium, p = pathologisches Stadium, m = Multiple Tumore der gleichen Region, T2 = 2-5cm, T4c = Befall der Brustwand und Haut, T4d = entzündliches Karzinom

3.12 Whole Genome Amplification und Next Generation Sequencing

In den mit Hilfe von rVAR2 isolierten CTCs aus den Patientenproben 3 und 4 wurden exemplarisch krebsspezifische Mutationen mittels WGA und Multiplex PCR-basierter Sequenzierung bestimmt (s. 2.2.10).

Tabelle 5: Ergebnisse der WGA und Multiplex PCR-basierten Sequenzierung (NGS)

| Proben ID | Anreicherung | Cell ID | PIK3CA | | ERBB2 |
|-------------------------------|--------------|---------|--------|--------|-------|
| | | | H1047L | H1047R | S310F |
| Zellfreie Negativkontrolle | | | | | |
| WBCs | | | | | |
| T47-D | CellSearch | 1 | | 21% | |
| | | 2 | | 24% | |
| | | 3 | | 100% | |
| Patientenprobe 3 | CellSearch | 1 | | 51% | |
| | | 2 | | 51% | |
| | | 3 | | 52% | 40% |
| | | 4 | | 34% | 32% |
| | | 5 | | 49% | 36% |
| | | 6 | | 51% | 35% |
| | | 7 | | 50% | |
| | rVAR2 | 1 | | 37% | 31% |
| | | 2 | | 55% | |
| Patientenprobe 4 | CellSearch | 1 | 48% | | |
| | | 2 | 52% | | |
| | | 3 | 35% | | |
| | | 4 | 61% | | |
| | | 5 | | | |
| | rVAR2 | 1 | | | |
| | | 2 | 36% | | |
| | | 3 | 69% | | |

Legende:

farbige Felder = Die Prozentzahlen geben die Frequenz des mutanten Allels an; weiße Felder = kein mutantes Allel nachgewiesen (Wert unter Cut-off von 12,5%); graue Felder = entsprechende Sequenz des Allels nicht vorhanden; T47-D = Positivkontrolle; ERBB2= Erb-B2 Rezeptor Tyrosin Kinase 2; NGS = *Next Generation Sequencing*; PIK3CA = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase katalytische Untereinheit alpha; rVAR2 = *recombinant Variant surface antigen 2*; WBCs = Leukozyten; WGA = *Whole Genome Amplification*.

Die zellfreie Negativkontrolle zeigt, dass es nicht zu einer Kontamination mit DNA gekommen ist.

In den mit rVAR2 angereicherten CTCs lassen sich die gleichen Mutationen finden wie in den mit CellSearch angereicherten CTCs. Die hier analysierten Mutationen in den Sequenzen von *PIK3CA* und *ERBB2* sind für das Mammakarzinom typisch (s. Tabelle 5). Der Nachweis identischer krebspezifischer Mutationen in den mit unterschiedlichen Verfahren angereicherten Zellen ist ein Beleg dafür, dass es sich bei den mit rVAR2 angereicherten Zellen um CTCs handelt.

3.13 Färbung im CellSearch Instrument

Um auch bei CTCs aus Patientenproben im CellSearch Instrument bestimmen zu können, ob diese rVAR2-positiv oder -negativ sind, sollte eine Methode zur Färbung von CTCs im CellSearch Instrument entwickelt werden. Dazu wurden MCF-7 Zellen mithilfe des SpyCatcher-PE für rVAR2 im CellSearch Instrument gefärbt.

Wird mehr als ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, kann es zu einem Überstrahlen („*bleed-through*“) kommen, dabei können Färbungen aus dem CK-DiOC-Farbkanal im PE-Farbkanal erfasst werden (62,63). Daher wurden zur Kontrolle MCF-7 Zellen ohne Färbung für rVAR2 im CellSearch Instrument aufbereitet (s. Abb. 22). Diese MCF-7 Zellen führten nicht zu einem positiven Signal im PE-Farbkanal. So konnte ein Überstrahlen des CK-DiOC Farbkanals auf den PE-Farbkanal ausgeschlossen werden und der PE-Farbkanal für den rVAR2-Nachweis genutzt werden. Mit den unten dargestellten rVAR2-Färbungen im PE-Farbkanal (s. Abb. 23) wurde der Nachweis erbracht, dass der PE-Farbkanal für den rVAR2-Nachweis genutzt werden kann und nicht durch ein Überstrahlen aus dem CK-DiOC-Farbkanal beeinflusst wird.

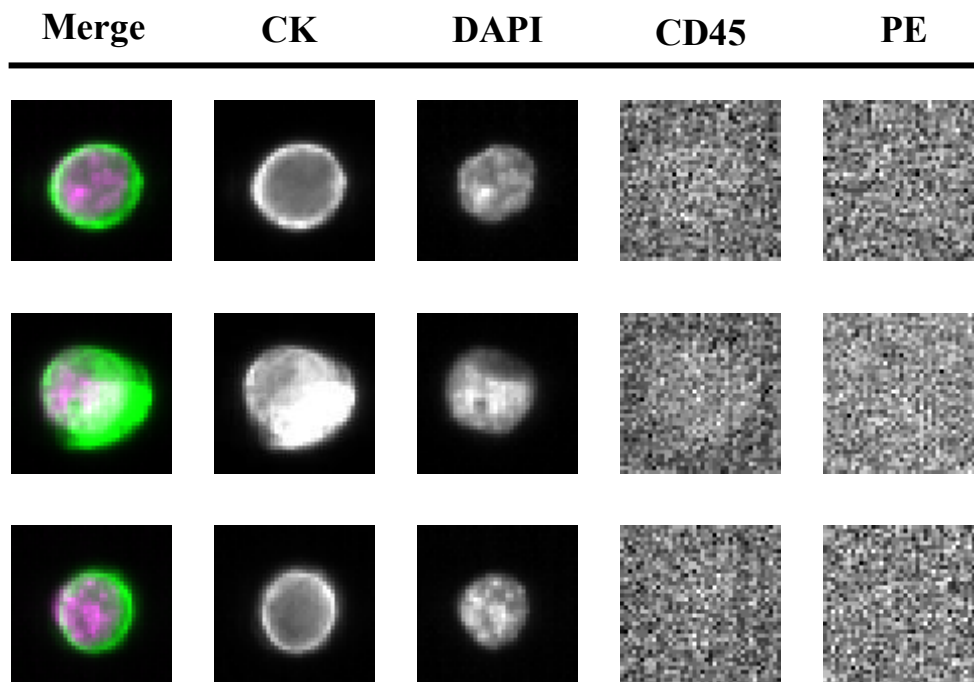


Abb. 22: MCF-7-Zellen im CellSearch ohne Färbung für rVAR2 (n = 1)

Belichtungszeiten: CK-DiOC = 800 ms, DAPI = 30 ms, CD45-APC = 600 ms, rVAR2-PE = 10 ms

APC = allophycocyanin; CD45 = *Cluster of differentiation 45*; CK = Zytokeratin; DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DiOC= dihexyloxacarboyanine iodide; PE = Phycoerythrin; rVAR2 = *recombinant Variant surface antigen 2*

Die Aufnahmen wurden mit dem Celltrack Analyzer II gemacht.

Das Ziel des Versuches war die Bestimmung einer geeigneten rVAR2 und SpyCatcher-PE Konzentration und einer optimalen Belichtung. Die besten Ergebnisse wurden mit einer rVAR2 und SpyCatcher-PE Konzentration von 33 nmol bei einer Belichtungszeit von 10 ms im PE-Farbkanal erzielt (s. Abb. 23). Leukozyten konnten eindeutig durch ein positives CD45-Signal und fehlende CK-Färbung abgegrenzt werden.

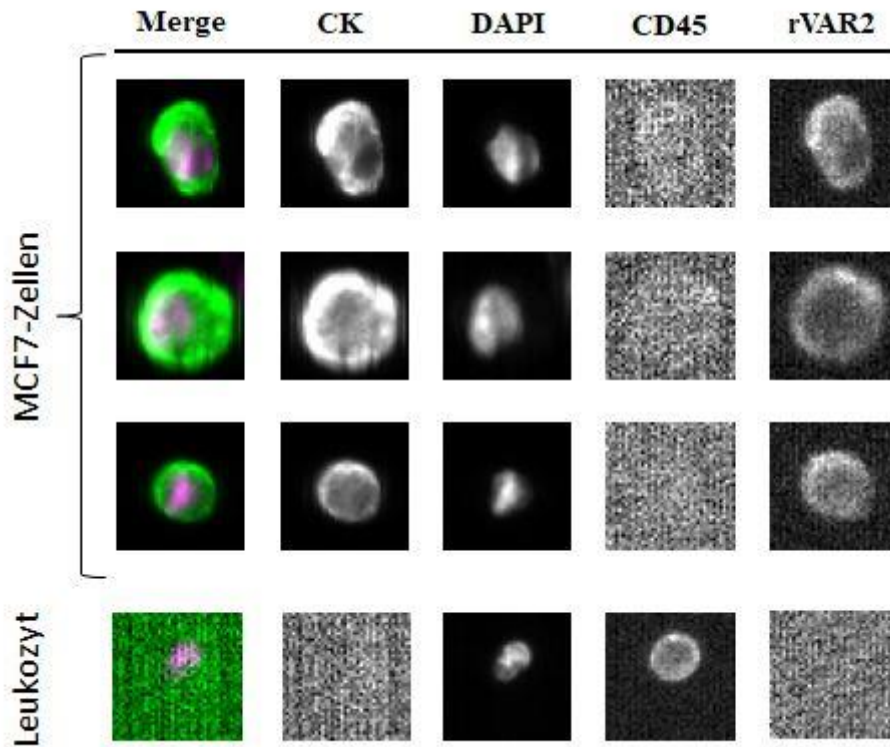


Abb. 23: Färbung von MCF-7 Zellen und eines exemplarischen Leukozyten mit rVAR2 im CellSearch Instrument (n = 1)

Belichtungszeiten: CK-DiOC = 800 ms, DAPI = 30 ms, CD45-APC = 600 ms, rVAR2-PE = 10 ms

APC = allophycocyanin; CD45 = *Cluster of differentiation 45*; CK = Zytokeratin; DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DiOC= dihexyloxycarbocyanine iodide; PE = Phycoerythrin; rVAR2 = *recombinant Variant surface antigen 2*

Die Aufnahmen wurden mit dem Celltrack Analyzer II gemacht.

4. Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Die minimal-invasive Gewinnung und Analyse einer Blutprobe stellt einen Fortschritt in der Diagnose und Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen bei minimaler Belastung der Patientinnen durch die Probengewinnung dar. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es möglich ist, mittels rVAR2CSA CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (*liquid biopsy*) zu isolieren und für weitergehende molekulare Analysen zugänglich zu machen.

Ein Grund für die hohe Letalität des Mammakarzinoms ist die extreme Heterogenität des Tumors (2). Aufgrund dessen ist eine molekulare Analyse des Tumors zur Erstellung der bestmöglichen Therapie unerlässlich. In dem Kontext „personalisierte Medizin“ könnten in Zukunft besonders CTCs eine wichtige Rolle spielen. Sie können sowohl für die Charakterisierung des Tumors und der Metastasen, als auch der damit verbundenen Therapie einschließlich der Bestimmung des Metastasierungspotenzials genutzt werden (11).

Der Goldstandard für die Isolation von CTCs ist das CellSearch System. Dieses System beruht auf der Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen mittels des Oberflächenproteins EpCAM. Die klinische Anwendbarkeit des CellSearch Systems zur Abschätzung der Prognose bei Krebspatienten/-innen wurde von der FDA für das metastasierte Prostata-, Mamma- und Kolorektalkarzinom zertifiziert. Mittels spezifischer Antikörper und entsprechender Fluoreszenzmikroskopie werden die isolierten Zellen als CTCs identifiziert.

CTCs können eine sehr heterogene Population darstellen mit Variationen im Bereich von Oberflächenmarkern und Morphologie, insbesondere der Größe. Aufgrund dessen bedarf es neben der CellSearch-Technologie weiterer Verfahren zur Detektion und Isolation zirkulierender Tumorzellen. Ein großer Nachteil des aktuellen Goldstandards besteht darin, dass nur EpCAM-positive CTC-Subpopulationen isoliert werden.

Der Bedarf an EpCAM-unabhängigen Methoden ist hoch, daher gibt es weitere Verfahren zur Detektion von CTCs (64,65). Diese werden in „markierungsabhängige“ und „markierungsfreie“ Verfahren unterteilt. Bei der positiven Selektion im Rahmen der markierungsabhängigen Detektion von CTCs wird auf Oberflächenmarker zurückgegriffen. Neben dem bereits genannten EpCAM wurden auch Methoden etabliert, bei welchen z.B. HER2-spezifische Antikörper (66) zum Einsatz kommen. Auch Antikörper-Kombinationen bestehend aus u.a. anti-EGFR, anti-HER2 und anti-Trop-2 (tumorassoziiertem Kalziumsignalwandler 2) (67) sind zur Detektion von CTCs in Gebrauch (68). Neben diesen Verfahren gibt es unter anderen das immunomagnetisch-basierte IsoFlux System. Dabei werden Antikörper-konjugierte magnetische *beads* in Kombination mit

Durchflusszytometrie eingesetzt (69). Die negative Selektion setzt auf die Eliminierung von Erythrozyten und Leukozyten aus den Blutproben, indem Oberflächenmarker genutzt werden, die nur von Blutzellen exprimiert werden, wie z.B. CD2, CD16, CD19, CD38, CD45, CD66b, Glycophorin A und je nach Krebstyp CD36 oder CD56 (58,70). Dabei kann es aber auch im Rahmen von unspezifischen Bindungen zu einem Verlust von CTCs kommen (70,71). Mit der negativen Selektion ist es bisher nicht gelungen, eine reine Tumorzellfraktion darzustellen (56,71). Markierungsfreie Verfahren nutzen biologische und physikalische Eigenschaften der CTCs, die sich von den Eigenschaften der WBCs unterscheiden. Eine bekannte Methode ist das Filtrationssystem von Parsortix. Dieses findet u.a. Anwendung im Rahmen der diagnostischen Leukapherese und erlaubt so die Isolation mononukleärer Zellen und CTCs (72). Die Leukapherese ist ein geeignetes Verfahren, um hohe Mengen an CTCs anzureichern, sie ermöglicht den Vergleich verschiedener CTC-Isolationstechniken (73–75).

Das von Salanti *et al.* beschriebene Protein VAR2CSA, welches zunächst auf Malaria-infizierten Erythrozyten nachgewiesen wurde, stellt einen möglichen neuen Ansatz zur Isolation von CTCs dar. VAR2CSA bindet an Tumorzellen hämatopoetischen, epithelialen und mesenchymalen Ursprungs (26). Agerbæk *et al.* beschrieben erstmalig den Einsatz von rekombinantem VAR2CSA zur Isolation von CTCs. Sie haben publiziert, dass rVAR2 zur Isolation von Tumorzellen von u.a. Leber-, Pankreas- und Lungen-Karzinomen geeignet ist (27).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von rekombinantem VAR2CSA zur Isolation von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut von Patientinnen mit der Diagnose metastasiertes Mammakarzinom optimiert und getestet.

4.2 Diskussion der Ergebnisse einzelner Untersuchungsaspekte

Vergleich verschiedener rVAR2 Chargen

Vorarbeiten der vorliegenden Arbeit wurden mit der rVAR2 Proteincharge MP3352 durchgeführt. Da weiterhin an der Optimierung der Herstellung und Aufreinigung des rVAR2-Proteins gearbeitet wird, wurden weitere Chargen hergestellt. Die Unterschiede zwischen den Proteinchargen bestehen in dem Produktionslauf und der Proteinkonzentration. MP3352 wurde am 22.02.2019 hergestellt und hat eine Proteinkonzentration von 1,6 mg/ml. MP3643 wurde am 06.09.2019 hergestellt und hat eine Proteinkonzentration von 1,9 mg/ml. Der Unterschied in der Proteinkonzentration wurde in dem oben beschriebenen Vergleich (s. 3.3.1) berücksichtigt und es wurde mit entsprechend angepassten rVAR2-Konzentrationen gearbeitet. Die funktionelle Äquivalenz der beiden Chargen des rVAR2-Proteins MP3352 und MP3643 wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, indem vergleichbare Wiederfindungsraten von A549-Zellen unter Verwendung der beiden rVAR2-Chargen erzielt wurden und somit gleichwertige Ergebnisse darstellen. Reproduzierbare Ergebnisse mit verschiedenen Chargen sind eine Grundvoraussetzung für die klinische Anwendbarkeit.

Optimierung des Verfahrens

Zur Steigerung der Wiederfindungsrate wurde das unter 2.2.1 beschriebene, optimierte Verfahren mit dem Zusatz angewendet, dass die Tumorzellen nach der Färbung mit *CellTracker Green* für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Sand *et al.* (45) beschreiben, dass sie mit einer Inkubation von 30 Minuten in Medium der Zellen nach der *CellTracker Green* Färbung zu folgenden Ergebnissen kommen: Die Wiederfindungsrate lag bei der Colo 205 Zelllinie bei 98,6 % und bei der A549 Zelllinie bei 98,9 %. Basierend auf den Ergebnissen aus den hier beschriebenen Versuchen führt ein vergleichbares Vorgehen nicht zu einer Steigerung der Wiederfindungsrate. Vielmehr lässt sich die Aussage treffen, dass eine schnellere Bearbeitung der Proben ohne eine Inkubationsphase zu einer höheren Wiederfindungsrate an Tumorzellen führt.

spike-in vor Erythrozyten-Lyse im Vergleich zur Dichtegradienten-Zentrifugation

Um den Verlust von Tumorzellen bei der Entfernung der Erythrozyten möglichst gering zu halten, wurde der Einsatz von Erythrozyten-Lyse-Puffer mit dem Dichtezentrifugationsverfahren (Ficoll) verglichen. Dabei führte der Erythrozyten-Lyse-Puffer zu einer höheren Wiederfindungsrate als das Ficoll-Verfahren. Zwei von sechs Proben zeigten am Ende des Ficoll-Experiments Verklumpungen. Dies erklärt möglicherweise die geringe Wiederfindungsrate von < 1 %. Die Wiederfindungsrate lag im Durchschnitt der drei Dichtezentrifugationsversuche bei 36,3 %, unter Berücksichtigung der verklumpten Proben. Nach Ausschluss der verklumpten Proben ergibt sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate in dem Ficoll-Verfahren von 54,0 %. Es ist davon auszugehen, dass es bei der Verarbeitung von Patientenproben ebenfalls zu Verklumpungen kommen kann. Da die durchschnittliche Wiederfindungsrate unter Einsatz des Erythrozyten-Lyse-

Puffers bei ca. 79,0 % lag, wurden die Versuche mit Patientenproben mit dem Lyse-Puffer durchgeführt. Sand *et al.* arbeiteten bei ihrer Analyse von Blutproben ebenfalls mit einem Erythrozyten-Lyse-Puffer (45). Mögliche Gründe für die geringere Wiederfindungsrate bei den Ficoll-Experimenten liegen in dem Aufbau des Verfahrens. Es wurde ein Verlust von Zellen durch starke Zentrifugationsschritte beschrieben (76). Ficoll ist eine Saccharose-Lösung, daher sind unspezifische Interaktionen mit rVAR2 denkbar. Unspezifische Interaktionen von Ficoll mit Proteinen wie z.B. BSA sind vorbeschrieben (77).

Detektion und Isolation von Tumorzellen verschiedener Zelllinien in Blutproben

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig eine Versuchsanordnung zur Isolierung dissoziierter Zellen der Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, Sk-Br-3, MCF-7, ZR-75-1 und SUM44 mittels rVAR2 und die quantitative Bestimmung der entsprechenden Wiederfindungsraten (s. 2.1.2). Sand *et al.* beschreiben in ihren *in vitro* Experimenten eine Wiederfindungsrate von ca. 98,6 % mit der humanen kolorektalen Tumorzelllinie Colo 205 und von 98,9 % bei der Tumorzelllinie A549 eines humanen Lungenadenokarzinoms (45). Dabei wurde ebenfalls die indirekte Methode und 200nmol rVAR2 verwendet. Mit dem unter 2.2.1 beschriebenen Verfahren wurde in den vorliegenden Experimenten mit der Colo 205 Zelllinie eine Wiederfindungsrate von 91,2 % und mit der A549 Zelllinie von 79,4 % erzielt. Unterschiede zu der in dieser Arbeit verwendeten Methodik bestehen in der Aufarbeitung der Tumorzellen A549 und Colo 205 und der Weiterverarbeitung der Probe u.a. Verwendung anderer *beads* (45). Dies ist eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Wiederfindungsraten, ebenso wie eventuelle Unterschiede in der Expression des rVAR2 bindenden Zielmoleküls. Aufgrund der geringen Anzahl der Versuche sind die Abweichungen statistisch nicht signifikant und zeigen übereinstimmend eine Wiederfindungsrate von über 90 % bei der humanen kolorektalen Tumorzelllinie Colo 205.

Die indirekte Methode funktioniert besser als die direkte Methode. Dies kann damit erklärt werden, dass freies rVAR2 einen besseren Zugriff auf ofCS hat als an *beads*-gebundenes rVAR2 (45).

Der Vergleich verschiedener Mammakarzinomzelllinien zeigt, dass mit triple-negativen Zelllinien höhere Wiederfindungsraten erzielt werden im Vergleich zu Tumorzelllinien luminalen Ursprungs. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnten neben der Expressionsdichte auch Variationen im rVAR2-bindenden Zielmolekül, dem onkofetalem Chondroitinsulfat, der unterschiedlichen Zelllinien sein, als auch andere rVAR2 bindende Zielmoleküle. Dies soll im Rahmen von geplanten massenspektrometrischen Analysen im Detail untersucht werden.

Triple-negative Mammakarzinomproben zeigen eine hohe EpCAM-Expression, 63% der *tissue samples* mit triple-negativem Mammakarzinom waren EpCAM-positiv. Eine erhöhte EpCAM-Expression ging mit einer geringeren Überlebensrate einher (78). In einer retrospektiven Studie

wurden bei 82 von 124 Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom mittels CellSearch ≤ 5 CTCs pro 7,5ml detektiert, die anderen 42 Patientinnen hatten ≥ 5 CTCs pro 7,5ml (79). In dieser Studie stellt das triple-negative Mammakarzinom den Subtyp mit der geringsten Anzahl von CTCs dar. Eine erhöhte Anzahl von CTCs ging mit einem erniedrigten Überleben einher (79,80). Trotz einer relativ hohen EpCAM-Expression war die CTC-Ausbeute mittels EpCAM relativ gering. Die hier beschriebene rVAR2-basierte Methode könnte insbesondere bei triple-negativen Patienten eine erfolgreichere Isolation von CTCs erlauben und somit eine verbesserte Diagnostik darstellen.

Ablösen magnetischer *beads* von den isolierten CTCs

Zum Ablösen der magnetischen *beads* von den Tumorzellen wurde Trypsin (EC 3.4.21.4) verwendet, da es sich als sehr effektiv darstellte. Eine Alternative zu Trypsin könnte unter anderem Chondroitinase (EC 4.2.2.4) darstellen. Chondroitinase spaltet Chondroitinsulfat-Proteoglycane. Der Einsatz von Chondroitinase kann so die Bindung zwischen rVAR2 und onkofetalem Chondroitinsulfat auflösen (26). Zusätzlich wurde die Nutzung von D-Biotin oder D-Desthiobiotin zur Ablösung magnetischer Biotin-bindender *beads* beschrieben (81). D-Desthiobiotin ermöglicht eine sanfte Elution von Strep-Tag II-Proteinen von der Biotin-Bindungsstelle von Strep-Tactin-Harzen (engl. *strep-tactin resins*). Die Verwendung von Hochleistungs- (*high performance*) Streptavidin Sepharose zur Aufhebung biotinylierter Verbindungen wurde ebenfalls beschrieben (82). Schonende Methoden zum Ablösen der magnetischen *beads* von den CTCs sind wichtig, da Trypsin bei längerer Anwendung und/oder höherer Konzentration die Oberflächenproteine auf der Zellmembran schädigt (83). Dies behindert die Färbung der Oberflächenproteine (83,84).

Reduktion der störenden Leukozyten

Eine Reduktion der störenden Leukozyten konnte u.a. durch eine Reduktion der eingesetzten rVAR2-Konzentration erreicht werden. Der Vergleich der Konzentrationen von 100 nmol mit 200 nmol rVAR2 in einer Patientenprobe ließ keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Tendenziell zeigte der Vergleich äquivalente Ergebnisse, mit einer Konzentration von 200 nmol konnten 12 CTCs detektiert werden und bei einer Konzentration von 100 nmol wurden 15 CTCs detektiert. Da die CTCs in der untersuchten Patientenprobe nur ein sehr schwaches CK-Signal aufwiesen, sollte dieser Vergleich mit weiteren Patientenproben wiederholt werden.

Wiederfindungsraten in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Tumorzellen

Bei einer geringeren Anzahl an Tumorzellen im Probenansatz wurden höhere Wiederfindungsraten erreicht als bei einer höheren Anzahl an Tumorzellen. Dieses Ergebnis wird insgesamt positiv interpretiert bezogen auf die Anwendung in klinischen Proben, da CTCs in Patientenproben tendenziell in geringer Konzentration vorkommen. Allard *et al.* berichten, dass nur in 37 % der Proben von Mammakarzinompatientinnen ≥ 2 CTCs in 7,5 ml Blut detektiert werden konnten (85). Cristofanilli *et al.* untersuchten 177 Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom der

unterschiedlichen Subtypen, 88 % der Patientinnen hatten in der CellSearch-Analyse in einem Blutvolumen von $7,5 \text{ ml} \leq 10 \text{ CTCs}$ (18). Die höhere Wiederfindungsrate bei einer geringeren Anzahl an Tumorzellen lässt sich möglicherweise damit erklären, dass die Menge an freiem rVAR2 bei höheren Zellzahlen limitiert ist.

Färbung und Ablösen der *beads* im KingFisher Instrument

Bei der Färbung im KingFisher Instrument konnten die Tumorzellen nicht von den anhaftenden *beads* abgegrenzt und beurteilt werden, da die *beads* zu einer starken Hintergrundfluoreszenz führten. Unspezifische Hintergrundfluoreszenz ist ein Problem bei vielen diagnostischen Verfahren (81,86). Pezzi *et al.* beleuchten in ihrer Arbeit die Vor- und Nachteile verschiedener magnetischer *beads* und beschreiben die Autofluoreszenz verschiedener *beads* nach Färbung der Zellen (81). Sie testeten fünf verschiedene magnetische *beads* (Dynabeads FlowComps, Dynabeads CELLlection, GE Healthcare Sera-Mag SpeedBeads streptavidin-blocked magnetic particles, Dynabeads M-270s, Dynabeads M-280s) und fünf verschiedene Marker bzw. Farbkanäle (DAPI, Androgen Rezeptor, EpCAM, CK, Blindfield). Alle von ihnen getesteten *beads* zeigten Autofluoreszenzen, welche je nach Farbkanal in ihrer Intensität variierten (81). Daher besteht die Notwendigkeit, ein Verfahren zur Ablösung der *beads* zu etablieren. Das Ablösen der *beads* mit Trypsin im KingFisher Instrument führte zum Teil zu einer Anheftung der *beads* an den *tips*. Um das Anheften der *beads* an die *tips* zu verhindern, wurden die *tips* mit verschiedenen Lösungen vorinkubiert. Keine der getesteten Inkubationslösungen führte zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Aufgrund dessen wurden die *beads* nach der Färbung im KingFisher Instrument manuell abgelöst (s. 2.2.2). Die *beads* ließen sich nach der Färbung im KingFisher Instrument nur eingeschränkt mit Trypsin von den Zellen lösen. Eine mögliche Ursache dafür könnte die vorherige Fixierung der Zellen mit Formalin darstellen. Formaldehyd denaturiert in einer nicht umkehrbaren Reaktion Proteine, sodass vermutlich auch die Angriffsstelle für Trypsin verändert wird (87).

***spike-in* Experimente in DLA-Produkten**

Die Qualität der DLA-Produkte beeinflusste die Wiederfindungsrate. Dabei kam es möglicherweise zu einer geringeren Wiederfindungsrate aufgrund von verklumpten Leukozyten oder einem hohen Erythrozyten-Anteil. Eine Probe setzte sich aus stark verklumpten Leukozyten zusammen, wohingegen eine weitere Probe einen hohen Anteil Erythrozyten vorwies. Eine weitere Probe war diesbezüglich unauffällig.

Die in 3.10 beschriebenen Ergebnisse des Versuches mit aufgetauten DLA-Produkten weichen von den Ergebnissen der *spike-in* Versuche aus frischen DLA-Produkten (s. Abb. 20) deutlich ab. Ungenauigkeiten beim Hinzufügen der Tumorzellen können nicht ausgeschlossen werden. Bessere Ergebnisse mit frischen DLA-Produkten gegenüber gefrorenen DLA-Produkten erscheinen zunächst nicht überraschend, da ein Gefrier-Tau-Zyklus grundsätzlich zu Zellschädigungen mit

Freisetzung von lytischen Enzymen führen kann. Da eine Anwendung auch in gefrorenen Proben wünschenswert ist, empfiehlt es sich den Versuchsansatz zu wiederholen, bevor in Zukunft DLA-Produkte mit dem rVAR2-Protein zur Gewinnung von CTCs bearbeitet werden.

Detektion, Isolation und Charakterisierung von CTCs aus Blutproben von Mammakarzinompatientinnen

Es konnte ein geeignetes Verfahren etabliert werden, dass neben der Detektion von CTCs in Patientenblut auch die Isolation der CTCs und eine weiterführende molekulare Analyse der Einzelzellen ermöglicht. Im direkten Vergleich von geteilten Proben mit der EpCAM-basierten Methode in dem CellSearch Verfahren wurde mit dem hier beschriebenen Verfahren unter Einsatz von rVAR2-Protein bei Mammakarzinomzellen eine geringere Anzahl an CTCs isoliert. Agerbæk *et al.* gelang es mit dem rVAR2-Protein bei Prostatakarzinom-Patienten mehr CTCs zu detektieren als mit einer EpCAM-basierten Methode und dem CellSearch Instrument (27). Agerbæk *et al.* arbeiteten mit einer Resuspension der Tumorzellen in RPMI Medium. Zusätzlich wurde nicht die indirekte Methode wie beschrieben unter 2.2.1 verwendet, sondern die direkte Methode mit rVAR2-beschichteten *beads*. In der vorliegenden Arbeit wurde das KingFisher Instrument genutzt, Agerbæk *et al.* nutzten das IsoFlux System (Fluxion Biosciences, CA, USA). In Bezug auf eine EpCAM-basierte CTC Isolation wurden mit dem KingFisher Instrument im Vergleich zum IsoFlux höhere Wiederfindungsraten erzielt. Außerdem war der Einsatz des KingFisher-Instruments kosteneffizienter und erlaubte einen höheren Durchsatz (88). Zusätzlich verwendeten Agerbæk *et al.* wesentlich größere CELLection™ Biotin Binder Dynabeads® mit einem Durchmesser von 4,5 µm und unternahmen keinen Ansatz zum Ablösen der *beads*, da die Auswertung unter Einsatz eines konfokalen 3D Laserscanning-Mikroskopes erfolgte. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *beads* haben einen wesentlich geringeren Durchmesser von 2,8 µm. Außerdem kann die Übertragung der Zellen im vorliegenden Verfahren auf *Sievewell Multiwell slides* zu einem Verlust von Zellen führen. In mehreren unabhängigen Versuchen lag die Verlustrate bei bis zu 10 %.

In dieser Arbeit wurde der CellCelector zur Evaluation der CTC-Zahl genutzt. Das CellCelector System verwendet ein Durchlicht- und Fluoreszenzlichtverfahren. Es erlaubt Hellfeld-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen in bis zu 7 Kanälen (57). Agerbæk *et al.* nutzen ein konfokales Laserscanning-Mikroskop. In der Konfokalmikroskopie wird im Vergleich zur normalen Fluoreszenzmikroskopie die Zelle nicht in ihrer Gänze durchleuchtet, sondern von einem fokussierten Lichtpunkt streifenweise abgetastet. Auf diese Weise wird die Entstehung von Streulicht in den umliegenden Bereichen und die Behinderung des Durchlichtstrahls durch an die Tumorzelle gebundene *beads* deutlich reduziert. Die Vermeidung von Streulicht resultiert in einer sehr guten Auflösung (89). In der Konfokalmikroskopie kann bei der Bestimmung der CTC-Zahl

die kontrastreichste Ebene gewählt werden, welche eine Darstellung der Zellen ohne störende Signale der *beads* ermöglicht.

Whole Genome Amplification und Next Generation Sequencing

Die WGA ist eine Methode zur Vervielfältigung geringer DNA-Mengen (90,91). In Kombination mit dem *Multiplex PCR-based Next Generation Sequencing* erlaubt sie die Erfassung spezifischer Mutationen von Einzelzellen (s. 3.12). Zu Variationen innerhalb der Frequenz des mutanten Allels bei Tumorzellen kommt es im Rahmen von Aneuploidien. Die in Tabelle 5 dargestellten Schwankungen der Frequenz innerhalb der T47-D Zellen sind durch Variationen in der Kopienzahl des Allels zu erklären. Bei den Zellen 1 und 2 liegen vier Kopien des Allels vor, dabei stellten sich drei als Wildtyp und eine als Mutation dar, folglich ist die Frequenz des mutanten Allels 25%.

Im Rahmen der Whole Genome Amplification kann es zu Allelausfällen („*drop outs*“) kommen. Dabei können durch apoptosebedingte DNA-Degradation oder durch die Fixierung der Zellen Allele verloren gehen. Zudem ist es möglich, dass den Primern während der Amplifikation nicht alle Allele zugänglich sind.

Bei der Patientenprobe 4 fällt auf, dass CTC 5 aus der CellSearch-Anreicherung und CTC 1 aus der rVAR2-Anreicherung (s. Tabelle 5) keine der beiden analysierten Mutationen aufweisen. Dies weist auf eine mögliche Heterogenität innerhalb der CTC Population hin. Ein Verlust beider Allele im Rahmen der Amplifikation lässt sich allerdings nicht sicher ausschließen.

Die analysierten Mutationen in den Sequenzen von *PIK3CA* und *ERBB2*, sind für das Mammakarzinom typische Mutationen. Der PI3K-Signalweg ist essenziell für verschiedenste zelluläre Funktionen wie Proliferation, Wachstum und Überleben. Aktivierende Mutationen in *PIK3CA* spielen eine relevante Rolle in der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms (92,93). *ERBB2* ist das kodierende Gen für HER2. HER2 ist ein epidermaler Wachstumsfaktor. Der Nachweis einer Überexpression von HER2 wird mit einer erhöhten Invasivität, Progression und Metastasierungstendenz des Mammakarzinoms in Verbindung gebracht (94).

Färbung im CellSearch Instrument

Die unter 3.13 beschriebenen Ergebnisse wurden mit MCF-7 Zellen gewonnen. Mithilfe der ungefärbten MCF-7 Zellen konnte ein Übersprechen des CK-DiOC Farbkanals auf den PE-Kanal ausgeschlossen werden. Auf dieser Grundlage sollte eine Übertragbarkeit des Färbeprotokolls im CellSearch Instrument von dem Zellkulturansatz auf Patientenproben ohne nennenswerte Änderung möglich sein.

4.3 Potentieller Einfluss der Blutgruppe

VAR2 ist ein Malariaprotein. In der Literatur wird immer wieder der Einfluss der Blutgruppe auf den Verlauf der Malaria-Erkrankung beschrieben (95). Personen mit Blutgruppe 0 sind vor einem schwereren Verlauf einer Malaria besser geschützt. Goel *et al.* gelang es dabei den Mechanismus des Schutzes der Blutgruppe 0 herauszufinden. Sie erbrachten den Nachweis, dass Plasmodium falciparum in infizierten Erythrozyten für die Sekretion des RIFIN Proteins sorgt, welches wiederum an andere Erythrozyten binden kann (96). Dadurch wird die sogenannte Rosettierung eingeleitet, dabei handelt es sich um einen zellbiologischen Vorgang, bei dem sich die Erythrozyten kreisförmig um eine zentrale Zelle anordnen. Goel *et al.* konnten nachweisen, dass das RIFIN Protein stark an die Oberfläche von Erythrozyten der Blutgruppe A bindet und nur schwach an die der Blutgruppe 0 (96). Andere Arbeiten zeigten, dass die Größe der Rosetten in Blut der Blutgruppe 0 kleiner ist als in den anderen Blutgruppen (97,98). Bisher wurde noch kein Zusammenhang zwischen der Blutgruppe und der Oberflächenexpression von Chondroitinsulfat dargestellt. Zudem ist nicht klar inwiefern Zytokine, wie z.B. IL-6, welches eine relevante Rolle in der Pathogenese von Malaria spielt (99), einen Einfluss auf Chondroitinsulfat oder die Bindung von rVAR2 und Chondroitinsulfat hat. In der vorliegenden Arbeit standen interessanterweise keine Patientenproben mit Blutgruppe 0 zur Verfügung. Aussagen über Blutgruppen-abhängige Erfolgsrate der CTC-Isolation sind daher nicht möglich. Diese Thematik könnte für zukünftige Arbeiten von Interesse sein.

4.4 Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines neuen Verfahrens zur Detektion und Isolation von CTCs auf Einzelzellebene aus Blutproben von Mammakarzinompatientinnen. Die Fallzahl der untersuchten Patientenproben ist wegen der eingeschränkten Verfügbarkeit von klinischen Proben noch gering. Um valide Aussagen über die Charakteristika von rVAR2-detectieren CTCs zu treffen, sollten in Zukunft weitere Patientenproben mit dem hier beschriebenen Verfahren untersucht werden.

4.5 Schlussbetrachtung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit rVAR2 die Wiederfindungsraten von MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, Sk-Br-3, MCF-7, ZR-75-1 und SUM44 bestimmt. Durch den Vergleich und die damit verbundene Optimierung verschiedener Methoden konnte ein geeignetes Protokoll zur Detektion, Isolation und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen aus Proben von Patientinnen mit der Diagnose metastasiertes Mammakarzinom etabliert werden.

Folgende weiterführende Experimente leiten sich aus den hier beschriebenen Ergebnissen ab. Es sollten massenspektrometrische Analysen rVAR2 bindender Proteine auf der Oberfläche der verschiedenen Mammakarzinomzelllinien zur Bestimmung möglicher Variationen des Zielmoleküls onkofetales Chondroitinsulfat durchgeführt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass rVAR2 neben ofCS auch an weitere Oberflächenmoleküle von Tumorzellen bindet. Insbesondere der Vergleich luminaler gegenüber triple-negativer Mammakarzinomzelllinien ist diesbezüglich von Interesse. Versuche mit einer geringeren rVAR2 Konzentration als 200 nmol in Patientenproben sollten ergänzt werden. Schließlich sollten *spike-in* Experimente mit aufgetauten DLA-Produkten durchgeführt werden.

Eine durchgehende Herausforderung in der Auswertung der Proben war das starke Hintergrundsignal verursacht durch Leukozyten. Eine Optimierung des Verfahrens mit dem Ziel einer weiteren Reduktion der Leukozytenzahl, gerade im Hinblick auf die angestrebte Auswertung von DLA-Produkten, ist erstrebenswert. Eine weitere Option ist eine Reduktion der störenden Leukozyten mittels negativer Selektion oder deren Ausblendung mittels Konfokalmikroskopie. Die Anwendung eines konfokalen Mikroskops reduziert störendes Streulicht und Hintergrundsignal auf der einen Seite signifikant (27). Auf der anderen Seite steht ein solches Instrument in vielen Laboren nicht zur Verfügung.

Um in Zukunft eine möglichst heterogene Subpopulation von CTCs isolieren zu können, sollten verschiedene Biomarker zur Detektion von CTCs kombiniert werden (100). Ahrens *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit einen potentiellen Ansatz, in welchem die Verwendung tumorspezifischer Veränderungen in den Glykosaminoglykanen oder anderen Komponenten der Glykokalyx die Detektion und Isolation einer heterogeneren Subpopulation von CTCs ermöglichen sollte (100).

Mit einer weiteren Optimierung der Sensitivität und Spezifität bietet die blutbasierte molekularpathologische Analytik zirkulierender Tumorzellen Chancen in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Tumorpatienten. Enorme Vorteile der *liquid biopsy* sind deutlich reduzierte Risiken und eine wesentlich geringere Belastung der Patienten/-innen gegenüber der klassischen gewebebasierten Diagnostik. Die *liquid biopsy* hat das Potenzial Tumorveränderungen in Echtzeit

nachzuweisen und den Patienten/-innen spezifische Therapien anzubieten, ein Ziel der personalisierten Medizin.

Materialliste

| Reagenzien/Puffer | Hersteller | Ort |
|--|--------------------------|-------------------------|
| PBS Puffer | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| RPMI Medium | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| Pierce Protein-Free Blocking Buffer | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| Erythrozyten-Lyse-Puffer | Zentralapotheke | Düsseldorf, Deutschland |
| Ficoll | Sigma-Aldrich | Saint Louis, MO, USA |
| Zelldissoziationspuffer | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| CellTracker Green CMFDA | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| Fluorescence Mounting Medium | Dako | Santa Clara, CA, USA |
| Bovines Serumalbumin | Sigma-Aldrich | Saint Louis, MO, USA |
| Saponin | Sigma-Aldrich | Saint Louis, MO, USA |
| Dynabeads Biotin Binder | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| NucBlue Live Cell Stain Readyprobes (Verdünnung 1:20) | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| CD45 (35-Z6) Alexa Flour 647 (Verdünnung 1:25) | Santa Cruz Biotechnology | Dallas, TX, USA |
| CK ALL: Pan Cytokeratin Antikörper Cocktail TRITC lot: 19014CS-6229 (Verdünnung 1:200) | Aczon SRL | Bologna, Italien |
| Trypsin | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| FCS | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| rVAR2 | Var2 Pharmaceuticals | Kopenhagen, Dänemark |
| SpyCatcher | Var2 Pharmaceuticals | Kopenhagen, Dänemark |

| Geräte/Materialien | Hersteller | Ort |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Megafuge 16R | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| Pipetten | eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Protein LoBind Tubes | eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| EDTA Röhrenchen | Becton Dickinson | Franklin Lakes, NJ, USA |
| Falcon | Greiner | Kremsmünster, Österreich |
| SepMate™ PBMC Isolation Tube | Stemcell | Köln, Deutschland |
| KingFisher® | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| MoFlo XDP | Beckman-Coulter | Brea, CA, USA |
| Stuart Rotator SB3 | Stuart | Staffordshire, UK |
| CellCelector® | ALS | Jena, Deutschland |
| CellSearch® | Menarini Silicon Biosystems | Bologna, Italien |
| Celltrack Analyzer II ® | Menarini Silicon Biosystems | Bologna, Italien |
| Rotofix 32A | Hettich | Tuttlingen, Deutschland |
| Beckman GS-15 Zentrifuge | Hyland Scientific | Stanwood, WA, USA |
| Hybaid Shake 'n' Stack | Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |
| Hybridisierungsöfen | | |
| Siewewell Multiwell Slides | Tokyo Ohka Kogyo Co. Ltd. | Kawasaki, Japan |
| Waage | Mettler Toledo | Columbus, OH, USA |
| Zählkammer Neubauer | Paul Marienfeld GmbH Co | Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Improved 0,1mm Tiefe | Kg. | Deutschland |
| MiSeq-System | Illumina | San Diego, CA, USA |
| Axioplan 2 Mikroskop | Zeiss | Oberkochen, Deutschland |

| Kits | Hersteller | Ort |
|----------------|-----------------------------|------------------|
| Ampli1 WGA Kit | Menarini Silicon Biosystems | Bologna, Italien |
| Ampli 1 QC Kit | Menarini Silicon Biosystems | Bologna, Italien |

Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Krebsdaten 2013 / 2014. 2014;55–128.
2. McDonald K-A, Kawaguchi T, Qi Q, Peng X, Asaoka M, Young J, et al. Tumor Heterogeneity Correlates with Less Immune Response and Worse Survival in Breast Cancer Patients. *Ann Surg Oncol*. 2019;26(7):2191–9.
3. Janni W, Fehm T, Scholz C, Rack B, Hancke K. *Gynäkologie Facharztwissen*. 2017.
4. *Ärzteblatt D*. Auch aktuelle hormonelle Kontrazeption erhöht das Brustkrebsrisiko. 2017. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/86909/Auch-aktuelle-hormonelle-Kontrazeption-erhoeht-das-Brustkrebsrisiko> (Zugriffsdatum: 04.02.2020)
5. Brustkrebs Ursachen. Verfügbar unter: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/ursachen-und-risikofaktoren.html> (Zugriffsdatum: 03.06.2020)
6. Leitlinienprogramm Onkologie Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung , Nachsorge des Mammakarzinoms Version 4.3. 2020;32–45. Verfügbar unter: www.leitlinienprogramm-onkologie.de (Zugriffsdatum: 10.01.2021)
7. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition. 2017;
8. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *npj Precis Oncol*. 2018;2(1).
9. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 2016;274.
10. Broeders M, Moss S, Nystrom L, Njor S, Jonsson H, Paap E, et al. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: A review of observational studies. *J Med Screen*. 2012;19(SUPPL. 1):14–25.
11. Stoecklein NH, Fischer JC, Niederacher D, Terstappen LWMM. Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016 Feb 1;16(2):147–64.
12. Dahl E, Jung A, Fassunke J, Hummel M, Penzel R, Dietmaier W, et al. Chancen und Risiken der blutbasierten molekularpathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie: Eine Stellungnahme des Arbeitskreises „Liquid Biopsy“ der AG Molekularpathologie in d. *Pathologe*. 2015;36(1):92–7.
13. Taylor CR. Predictive biomarkers and companion diagnostics. The future of immunohistochemistry: “in situ proteomics,” or just a “stain”? Vol. 22, *Applied immunohistochemistry & molecular morphology* : AIMM. 2014. p. 555–61.
14. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.
15. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010;23:60–4.

16. Banys-Paluchowski M, Fehm T, Janni W, Solomayer E-F, Hartkopf A. Zirkulierende und disseminierte Tumorzellen beim Mammakarzinom. *Senol - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*. 2020;17(02):121–8.
17. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;14:146–149.
18. 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 Aug 19;351(8):781–91.
19. Janni WJ, Yab TC, Hayes DF, Cristofanilli M, Bidard F-C, Ignatiadis M, et al. Clinical utility of repeated circulating tumor cell (CTC) enumeration as early treatment monitoring tool in metastatic breast cancer (MBC) - a global pooled analysis with individual patient data. *Cancer Res [Internet]*. 2021 Feb 15;81(4 Supplement):GS4-08 LP-GS4-08. Verfügbar unter: http://cancerres.aacrjournals.org/content/81/4_Supplement/GS4-08.abstract (Zugriffsdatum: 24.02.2021)
20. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274–84.
21. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, De Giorgi U, Mego M, Cohen EN, et al. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res*. 2014;16(5):1–9.
22. Reduzzi C, Cosimo S Di, Gerratana L, Motta R, Vingiani A, Zhang Y, et al. Dissemination of circulating tumor cell clusters occurs early in non-metastatic breast cancer patients. :1–33.
23. Neumann MHD. Funktionale Charakterisierung des macrophage capping protein (CapG) und dessen Nachweis auf zirkulierenden Tumorzellen des Mammakarzinoms. 2015;
24. CellSearch. Verfügbar unter: <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsearch-system-overview> (Zugriffsdatum: 08.11.2020)
25. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*. 2020;9(8).
26. Salanti A, Clausen TM, Agerbæk M, Al Nakouzi N, Dahlbäck M, Oo HZ, et al. Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein. *Cancer Cell*. 2015;28(4):500–14.
27. Agerbæk M, Bang-Christensen SR, Yang MH, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun*. 2018;9(1).
28. Bang-Christensen SR, Pedersen AG, Pereira MA, Clausen TM, Løppke C, Sand NT, et al. Capture and Detection of Circulating Glioma Cells Using the Recombinant VAR2CSA Malaria Protein. *Cells*. 2019;8(9):998.
29. Agerbæk M, Bang-Christensen S, Salanti A. Fighting Cancer Using an Oncofetal Glycosaminoglycan-Binding Protein from Malaria Parasites. *Trends Parasitol*. 2019 Mar;35(3):178–81.
30. Khazamipour N, Al-Nakouzi N, Oo HZ, Ørum-Madsen M, Steino A, Sorensen PH, et al. Oncofetal Chondroitin Sulfate: A Putative Therapeutic Target in Adult and Pediatric Solid Tumors. *Cells*. 2020 Mar;9(4).

31. Seiler R, Oo HZ, Tortora D, Clausen TM, Wang CK, Kumar G, et al. An Oncofetal Glycosaminoglycan Modification Provides Therapeutic Access to Cisplatin-resistant Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2017 Jul;72(1):142–50.
32. Wietz H. “Dissertation in Vorbereitung.” Universität Düsseldorf; 2021.
33. Frauenklinik Studien. Verfügbar unter: https://www.uniklinik-duesseldorf.de/fileadmin/Fuer-Patienten-und-Besucher/Kliniken-Zentren-Institute/Kliniken/Klinik_fuer_Frauenheilkunde_und_Geburtshilfe/Studienzentrale/Newsletter_Studienzentrale.pdf (Zugriffsdatum: 22.06.2020)
34. Kathryn JC, Sireesha V G, Stanley L. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* 2012;32:35–48.
35. American Type Culture Collection. Verfügbar unter: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx?geo_country=de (Zugriffsdatum: 19.03.2020)
36. Schneck H, Gierke B, Uppenkamp F, Behrens B, Niederacher D, Stoecklein NH, et al. EpCAM-independent enrichment of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *PLoS One.* 2015;10(12):1–23.
37. Tzircotis G, Thorne RF, Isacke CM. Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding. *J Cell Sci.* 2005;118(21):5119–28.
38. Li WM, Zhou LL, Zheng M, Fang J. Selection of Metastatic Breast Cancer Cell-Specific Aptamers for the Capture of CTCs with a Metastatic Phenotype by Cell-SELEX. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2018;12(77):707–17.
39. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24-Breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: An early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):1–13.
40. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012;12.
41. Mota A de L, Evangelista AF, Macedo T, Oliveira R, Scapulatempo-Neto C, Vieira RA da C, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4708–12.
42. Cellosaurus. Verfügbar unter: <https://web.expasy.org/cellosaurus/> (Zugriffsdatum: 21.02.2020)
43. Depmap. Verfügbar unter: <https://depmap.org/portal/> (Zugriffsdatum: 19.03.2020)
44. Martin LA, Ribas R, Simigdala N, Schuster E, Pancholi S, Tenev T, et al. Discovery of naturally occurring ESR1 mutations in breast cancer cell lines modelling endocrine resistance. *Nat Commun.* 2017;8(1).
45. Sand NT, Petersen TB, Bang-Christensen SR, Ahrens TD, Løppke C, Jørgensen AM, et al. Optimization of rVAR2-Based Isolation of Cancer Cells in Blood for Building a Robust Assay for Clinical Detection of Circulating Tumor Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
46. Lalchandama K. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. *WikiJournal Med.* 2017;4(1).

47. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, et al. Switches in expression of plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):101–10.
48. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell*. 1995 Jul;82(1):89–100.
49. Rask TS, Hansen DA, Theander TG, Pedersen AG, Lavstsen T. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes - divide and conquer. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(9).
50. Khunrae P, Dahlbäck M, Nielsen MA, Andersen G, Ditlev SB, Resende M, et al. Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies. *J Mol Biol*. 2010/01/25. 2010 Apr 2;397(3):826–34.
51. Fried M, Duffy PE. Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria. *Vaccine*. 2015 Dec;33(52):7483–8.
52. KingFisher. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5400110?SID=srch-srp-5400110> (Zugriffsdatum: 20.01.2020)
53. Leise EM, Morita TN, Gray I, LeSane F. Lymphocyte and polymorphonuclear enzymes in stress. *Biochem Med*. 1970 Nov;4(3–4):327–35. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000629447090058X> (Zugriffsdatum: 22.06.2020)
54. SIEVEWELL Slides. Verfügbar unter: <http://www.sievevell.com/how-it-works> (Zugriffsdatum: 03.04.2020)
55. Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JRJ. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*. 2011 Jul;414(1):38–46.
56. Neumann MHD, Schneck H, Decker Y, Schömer S, Franken A, Endris V, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch® system and the CellCelector™. *Biotechnol Prog*. 2017 Jan 1;33(1):125–32.
57. CellCelector. Verfügbar unter: <https://www.als-jena.com/de/cellcelector-zell-und-kolonie-picker.html> (Zugriffsdatum: 23.06.2020)
58. Lampignano R. Enrichment, isolation and molecular characterization of circulating tumour cells for treatment optimization in metastatic breast cancer. 2017;
59. Chelulei Cheison S, Brand J, Leeb E, Kulozik U. Analysis of the Effect of Temperature Changes Combined with Different Alkaline pH on the β -Lactoglobulin Trypsin Hydrolysis Pattern Using MALDI-TOF-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 9;59(5):1572–81.
60. WGA Kit. Verfügbar unter: <http://www.siliconbiosystems.com/ampli1-wga-kit> (Zugriffsdatum: 15.04.2020)
61. Franken A, Rivandi M, Yang L, Jäger B, Krawczyk N, Honisch E, et al. A multiplex PCR-based next generation sequencing-panel to identify mutations for targeted therapy in breast cancer circulating tumor cells. *Appl Sci*. 2020;10(10).
62. Bleed-Through. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life->

science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/protocols-troubleshooting/troubleshooting/bleed-through.html (Zugriffsdatum: 28.12.2020)

63. Lowes LE, Hedley BD, Keeney M, Allan AL. Adaptation of semiautomated circulating tumor cell (CTC) assays for clinical and preclinical research applications. *J Vis Exp*. 2014;(84):1–11.
64. Sharma S, Zhuang R, Long M, Pavlovic M, Kang Y, Ilyas A, et al. Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4):1063–78.
65. Bankó P, Lee SY, Nagygyörgy V, Zrínyi M, Chae CH, Cho DH, et al. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1–20.
66. Galletti G, Sung MS, Vahdat LT, Shah MA, Santana SM, Altavilla G, et al. Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device. *Lab Chip*. 2013/11/07. 2014 Jan 7;14(1):147–56.
67. Lipinski M, Parks DR, Rouse R V., Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(8 1):5147–50.
68. Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, et al. Detection of EpCAM-negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood. *J Oncol*. 2011;2011.
69. Isoflux System. Verfügbar unter: <https://liquidbiopsy.fluxionbio.com> (Zugriffsdatum: 09.06.2020)
70. Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittel A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, et al. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*. 2011;9(1):70.
71. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A novel workflow to enrich and isolate patient-matched EpCAM^{high} and EpCAM^{low}/negative CTCs enables the comparative characterization of the PIK3CA status in metastatic breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
72. Franken A, Driemel C, Behrens B, Meier-Stiegen F, Endris V, Stenzinger A, et al. Label-free enrichment and molecular characterization of viable circulating tumor cells from diagnostic leukapheresis products. *Clin Chem*. 2019;65(4):549–58.
73. A. Stresemann, J. Fischer, D. Niederacher, K. Raba, A. Schmitz, M. Schwartz, et al. A comprehensive comparison study: Capturing CTCs by different technologies followed by molecular analysis. 2012;2012. Verfügbar unter: https://static1.squarespace.com/static/573506a001dbaec47dcf0a28/t/57c8cee1e3df2808f0a45c9c/1472777955165/ACTC+2012_Stresemann_4.pdf (Zugriffsdatum: 29.01.2021)
74. Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, et al. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16580–5.
75. Guglielmi R, Lai Z, Raba K, van Dalum G, Wu J, Behrens B, et al. Technical validation of a new microfluidic device for enrichment of CTCs from large volumes of blood by using buffy coats to mimic diagnostic leukapheresis products. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–10.
76. Dianat-moghadam H, Azizi M, Eslami-s Z, Enrique L, Heidarifard M, Nouri M, et al. The

- Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. *Cancers (Basel)*. 2020;
77. Fodeke AA, Minton AP. Quantitative characterization of polymer-polymer, protein-protein, and polymer-protein interaction via tracer sedimentation equilibrium. *J Phys Chem B*. 2010;114(33):10876–80.
 78. Soysal SD, Muenst S, Barbie T, Fleming T, Gao F, Spizzo G, et al. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2+, basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(7):1480–7.
 79. 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.
 80. Dong X, Alpaugh RK, Cristofanilli M. Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: A diagnostic tool for prognosis and molecular analysis. *Chinese J Cancer Res*. 2012;24(4):388–98.
 81. Pezzi HM, Niles DJ, Schehr JL, Beebe DJ, Lang JM. Integration of Magnetic Bead-Based Cell Selection into Complex Isolations. *ACS Omega*. 2018;3(4):3908–17.
 82. Sigma Aldrich Streptavidin. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/affinity-chromatography/separating-biotin-biotinylated-substances-with-streptavidin.html> (Zugriffsdatum: 22.06.2020)
 83. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci*. 2010;17(1):1–10.
 84. Cell Dissociation with Trypsin. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-dissociation-with-trypsin.html#background> (Zugriffsdatum: 04.01.2021)
 85. 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.
 86. Rich RM, Stankowska DL, Maliwal BP, Sørensen TJ, Laursen BW, Krishnamoorthy RR, et al. Elimination of autofluorescence background from fluorescence tissue images by use of time-gated detection and the AzaDiOxaTriAngulenium (ADOTA) fluorophore. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(6):2065–75.
 87. Kayser F, Böttger E, Zinkernagel R, Haller O, Eckert J, Deplazes P. *Medizinische Mikrobiologie: Taschenlehrbuch*. 2010 Jan 1;
 88. Wu J, Raba K, Guglielmi R, Behrens B, Van Dalum G, Flügen G, et al. Magnetic-based enrichment of rare cells from high concentrated blood samples. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4).
 89. Konfokalmikroskopie Universität Wien. Verfügbar unter: https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluoreszenz_mikroskop/5c_konfokal.htm (Zugriffsdatum: 09.06.2020)
 90. Zhang LIN, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidit W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. 1992;89(July):5847–51.

91. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. 1992 Jul;13(3):718–25.
92. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006 Aug;7(8):606–19.
93. Alowiri NH, Hanafy SM, Haleem RA, Abdellatif A. PIK3CA and PTEN genes expressions in breast cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2019;20(9):2841–6.
94. Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res*. 1992;12(2):419–25.
95. Rowe JA, Opi DH, Williams TN. Blood groups and malaria: Fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(6):480–7.
96. Goel S, Palmkvist M, Moll K, Joannin N, Lara P, R Akhouri R, et al. RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nat Med*. 2015;21(4):314–7.
97. Carlson J, Wahlgren M. *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med*. 1992;176(5):1311–7.
98. Vigan-Womas I, Guillotte M, Juillerat A, Hessel A, Raynal B, England P, et al. Structural basis for the ABO blood-group dependence of *plasmodium falciparum* rosetting. *PLoS Pathog*. 2012;8(7):33.
99. Fresno M, Angulo I. Cytokines in the Pathogenesis of and Protection against Malaria. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1145.
100. Ahrens TD, Bang-Christensen SR, Jørgensen AM, Løppke C, Spliid CB, Sand NT, et al. The Role of Proteoglycans in Cancer Metastasis and Circulating Tumor Cell Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(August):1–27.

Anhang

1. Aufklärungsbogen der Augusta-Studie

Universitätsklinikum Düsseldorf



Frauenklinik

Patienteninformation *Biomarkeruntersuchung*

Identifikation neuer Biomarker zur Verbesserung der Genauigkeit üblicher Diagnoseverfahren sowie prognostischer und prädikativer Faktoren bei Brustkrebs

AUGUSTA

Sehr geehrte Patientin,

die steigende Lebenserwartung weltweit ist im Wesentlichen durch die Fortschritte in der Medizin bedingt. Krankheiten können rascher diagnostiziert und wesentlich schonender behandelt werden. Allerdings sind diese und weitere Fortschritte nur durch wissenschaftliche Untersuchungen möglich. Dabei werden neue diagnostische und therapeutische Verfahren überprüft, aber es müssen auch an gesundem und krankem Gewebe wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt werden, um Krankheiten besser zu erkennen und neue Therapien entwickeln zu können. Dazu sind Wissenschaftler auf Patienten angewiesen, die sich bereit erklären, Gewebe bzw. Blut für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.

Im Zuge Ihrer Behandlung in der Frauenklinik ist zur geweblichen (histologischen) Sicherung bei Ihnen eventuell eine Stanzbiopsie der Brust nötig, bei der erkranktes oder verdächtiges Gewebe zur weiteren Untersuchung teilweise entfernt wird, oder Sie haben sich als gesunde Kontrollperson gemeldet, in diesem Fall wird bei Ihnen lediglich Blut abgenommen. Das aus der Brust entfernte Gewebe wird dann im Weiteren durch einen Pathologen feingeweblich untersucht. Allerdings benötigt der Pathologe häufig nur ein kleines Gewebeareal, um eine exakte Diagnose stellen zu können. Das überschüssige Gewebe ist für die Diagnosestellung nicht mehr nötig, könnte jedoch für weitere wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung stehen. Dieses Gewebe, sowie gegebenenfalls eine zusätzliche **Gewebeprobe** die ebenfalls im Rahmen der diagnostischen Stanzbiopsie mit entnommen wird, möchten wir gerne sammeln, um daran wissenschaftliche Untersuchungen vornehmen zu können. Dabei wird der Eingriff, der bei Ihnen ansteht, keinesfalls in unangemessener Weise ausgedehnt, sondern gegebenenfalls bei liegender Hohlnadel (es erfolgt kein erneuter Hauteinstich) wird über diese weiteres Tumorgewebe mit der Stanznadel entnommen. Als weitere studienbezogene Maßnahmen benötigen wir lediglich eine **Blut- und Urinprobe** von Ihnen **zum Zeitpunkt vor der Gewebeentnahme** sowie (wenn möglich) **zum Termin der Ergebnisbesprechung etwa eine Woche später und nach 12 und 24 Monaten**. Bei gesunden Kontrollpersonen sind keine weiteren Nachuntersuchungen oder Blutentnahmen vorgesehen.

Zusätzlich zu der Aufbewahrung der Blut-/Urin und Gewebeprobe möchten wir aus Ihrer Krankenakte zentrale **Behandlungsdaten** (insbesondere Diagnose, Therapiedaten, etc.) entnehmen und gesondert für die Gewebeprobe speichern. Sowohl die Proben als auch die zentralen Behandlungsdaten werden nicht mit Ihren Personalien (Name, Adresse, vollständiges Geburtsdatum) gespeichert, sondern unter einem Code. Den Code können nur die Biobank-Verantwortlichen (Prof. Janni, Dr. Niederacher, Hr. Hepp) Ihren Personalien zuordnen.

Direktorin der Frauenklinik:

Univ.-Prof. Dr. T. Fehm

Sekretariat Frau Sanli
Telefon 0211 81-17501
Fax 0211 81-18483
direktion.frauenklinik@
med.uni-duesseldorf.de

Hausanschrift

Moorenstraße 5
40225 Düsseldorf

Stv. Direktor:

Prof. Dr. med. M. Fleisch

Oberärzte

Ltd. Oberärztin
Prof. Dr. med. M. Hampl

Geschäftsführender Oberarzt:

PD Dr. med. E. Ruckhäberle

Oberärzte:

Dr. med. P. Balan
Dr. med. I. Beyer
Dr. med. G. Bizjak
PD Dr. med. B. Karbowski
Prof. Dr. med. J. S. Krüssel
Dr. med. J. Lux
Dr. med. S. Mohrmann
Dr. med. A. Schönherr
Dr. med. A.-S. Vesper

Ambulante Terminvergabe/

OP-Vorstellung
Telefon 0211 81-16092

Befundabfrage

Allgemeine Ambulanz 0211 81-17524
Privatambulanz 0211 81-17531

Mutter-Kind-Zentrum

Dr. med. P. Balan
Dr. med. G. Bizjak
Leitstelle Kreißsaal 0211 81-19830
Pränatalmedizin 0211 81-17546

Wiederherstellende Operationen in Gynäkologie und Senologie

Leiter: Dr. med. J. Hoffmann

Brustzentrum:

Stv. Leiter: Dr. med. J. Hoffmann
Kordinatorin:
Dr. med. S. Mohrmann
Leitstelle 0211 81-16644
Sekretariat Brustzentrum 0211 81-19090
Studienzentrale 0211 81-17550

Konservative Gynäkologische Onkologie

Komm. Leiter:
PD Dr. med. E. Ruckhäberle
Sekretariat 0211-81 08087
Studienzentrale 0211-81 17550

Reproduktionszentrum UniKiD

Koordinator
Prof. Dr. med. J. S. Krüssel
Leitstelle 0211 81-04060

www.uniklinik-duesseldorf.de/frauenklinik



Was geschieht nun mit Ihrem Gewebe?

Ein Teil des entnommenen Gewebes wird sofort bis auf -80°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem Kühlautomaten gelagert. Das Gewebe ist somit fast unbegrenzt haltbar. Im Weiteren können dann wissenschaftliche Untersuchungen damit durchgeführt werden. Im Blut wird nach verstreuten Tumorzellen gesucht. Darüber hinaus werden Umweltstoffe (wie Metalle), Erbgut-(DNA und RNA)-Veränderungen, und Eiweißmoleküle im Blut, Urin und im Gewebe bestimmt, die im Verdacht stehen das Brustkrebsrisiko zu beeinflussen. Im Rahmen der genetischen Analyse Ihres Gewebes wird eventuell auch ein so genannter „Whole genome scan“ durchgeführt werden. Hierbei wird das gesamte Erbmaterial systematisch auf Veränderungen hin untersucht, um somit genetische Varianzen zu identifizieren, die z.B. das Risiko für eine Brustkrebserkrankung erhöhen können. All diese Analysen haben keinen direkten Einfluss auf die weitere Therapie bei Ihnen und dienen nicht der Diagnostik in ihrem individuellen Fall, sie dienen vielmehr der Forschung und Grundlagenforschung, in der Hoffnung für die zukünftige Diagnostik und Behandlung bei Brustkrebs Fortschritte zu erzielen. Bitte haben Sie daher Verständnis, dass wir keine Auskünfte über einzelne Ergebnisse der an Ihrem Gewebe/Blut durchgeführten Untersuchungen geben können. **Sie sind aber herzlich dazu eingeladen, sich jederzeit nach dem Verbleib Ihres Gewebes/Blutes und nach den Ergebnissen der wissenschaftlichen Untersuchungen zu erkundigen.**

Wer hat Zugriff auf das Gewebe bzw. ihre Daten?

Prinzipiell haben nur Wissenschaftler und Ärzte der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf Zugriff auf das mit dem Code versehene Gewebe und die entsprechend codierten Krankheitsdaten. Die Verantwortlichkeit für die Proben und die erfassten Daten liegt beim Direktor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf. Die Datenerfassung erfolgt zum einen handschriftlich (zur Vermeidung des Datenverlustes bei Problemen mit technischen Datenerfassungssystemen), zum anderen computergestützt. Die Daten sind im molekularbiologischen Labor der Universitätsfrauenklinik unter Verschluss. Zugang zum Labor haben nur Wissenschaftler und Ärzte der Klinik. Für weitere, spezielle Untersuchungen gemäß dem Studienprotokoll, die in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen (Universität Erlangen, Universitätsklinikum Tübingen, München und Aachen) erfolgen sollen, werden die Proben und Krankendaten ohne Ihre Personalien und ohne Code weitergegeben. Einen Zugang zu Ihrer personenbezogenen Krankenakte haben ausschließlich einzelne Wissenschaftler der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf und nur sofern dies für dieses konkrete Forschungsprojekt erforderlich ist. Eine gewerbliche Nutzung der späteren wissenschaftlichen Daten bzw. Patentanmeldungen sind nicht geplant, aber prinzipiell nicht auszuschließen. Anspruchsrechte Ihrerseits in diesem Zusammenhang können nicht berücksichtigt werden.

Freiwilligkeit:

Die Bereitschaft Ihr Blut, Ihren Urin und Ihr Gewebe für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung zu stellen, können Sie selbstverständlich jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne persönliche oder medizinische Nachteile zurückziehen. Dann werden sowohl die Proben, als auch ihre persönlichen Daten vernichtet, sofern nicht gesetzlich anderweitig festgelegt. Falls Sie Informationen zu den mit Ihrem Gewebe durchgeführten Untersuchungen wünschen, kann dies durch eine Anfrage über die o.g. Adresse erfolgen. Für weitere Fragen stehen wir Ihnen gerne jederzeit in einem persönlichen Gespräch zur Verfügung. Ein Entgelt für die Überlassung Ihrer Blut- und/oder Gewebeproben erhalten sie nicht.

Mögliche Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen:

Es entstehen über das spezifische Risiko des geplanten Stanzbiopsieeingriffes hinaus, über das Sie Ihr Arzt bereits informiert hat, keine zusätzlichen Risiken durch die Gewebeentnahme, da im Rahmen der regulären Stanzbiopsie über die bereits platzierte Hohnadel (kein zusätzlicher Hauteinstich) je nach Tumorgöße und Struktur 1-2 weitere Stanzzyylinder von 1-2mm Durchmesser entnommen werden. Es werden somit statt der routinemäßigen 5 Stanzzyylinder insgesamt 6-7 Stanzzyylinder entnommen. Unabhängig von der Studie ist jede Stanzbiopsie mit Risiken behaftet, über die Sie gesondert aufgeklärt werden oder schon aufgeklärt worden sind. Zusammenfassend besteht wie bei jedem Eingriff die Gefahr einer Blutung, Nachblutung mit Hämatom-(Bluterguss-) Bildung, einer Infektion oder einer Wundheilungsstörung. In manchen Fällen kann auch die Wiederholung des Eingriffes notwendig werden, sollte kein repräsentativer Teil des abzuklärenden Befundes getroffen werden. Die Dauer des Eingriffes sowie die verbunden Risiken wie Verletzungen oder Nachblutungen werden durch die zusätzliche Gewebeentnahme lediglich minimal erhöht, weitere Risiken kommen nicht hinzu. Die Risiken durch die Blutentnahme sind ebenfalls sehr gering und beschränken sich auf seltene Komplikationen wie bei jeder routinemäßigen Blutentnahme (z.B. Bluterguss oder leichte Schmerzen an der Einstichstelle, sowie sehr selten Nervenverletzung oder versehentliche arterielle Punktion).

Versicherung:

Da Ihnen keine erheblichen gesundheitlichen Risiken über den im Rahmen Ihrer Behandlung geplanten Eingriff hinaus entstehen, ist eine zusätzliche Versicherung nicht erforderlich.

Falls Sie mit der Aufbewahrung und weiteren wissenschaftlichen Untersuchung Ihres Gewebes einverstanden sind, sollte die beiliegende Einverständniserklärung von Ihnen unterzeichnet werden. Eine Kopie wird zum Verbleib bei Ihnen ausgehändigt. Wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft und Ihr Verständnis.

Fragen bezüglich der Studie:

Sie haben das Recht, sich jederzeit über den aktuellen Stand dieser Studie zu informieren und erhalten auf Nachfrage auch jederzeit Neuinformationen, die sich im Laufe der Untersuchung ergeben. Falls Sie irgendwelche Fragen zu dieser Studie haben, so wenden Sie sich bitte an Ihren Prüfarzt:

Frau/Herr (Dr.)

Oder den Leiter der Studie: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm
Anschrift: Frauenklinik Universitätsklinikum Düsseldorf
Moorenstr. 5 40225 Düsseldorf
Studienzentrale Tel: 0211 81 17550
Brustzentrum Tel: 0211 81 16644

Danksagung

Ohne die Unterstützung wichtiger Personen hätte diese Dissertation in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Neubauer, der meine Arbeit stets mit viel Verständnis unterstützt hat. Für konstruktive Anregungen danke ich ebenso Prof. Dr. Stoecklein, der meine Doktorarbeit als zweiter Gutachter betreut hat. Zudem gilt mein Dank Herrn Dr. Niederacher für die freundliche Einführung, die Ausarbeitung des Themas meiner Dissertation und sein Engagement während meiner Arbeiten im Labor.

Für vielfältige Unterstützung bin ich besonders André Franken von der Arbeitsgruppe für translationale Gynäkoonkologie der Universitäts-Frauenklinik verbunden. Durch sein großes Engagement, fachliche Hinweise und kompetente Anleitung hat er wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen. Den Mitarbeitern Liwen Yang und Mahdi Rivandi aus dieser Arbeitsgruppe bin ich für ihre Unterstützung dankbar.

Im Labor für experimentelle, chirurgische Onkologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stoecklein wurde meine Forschungen durch Dr. Rui Neves und JunHao Wu entscheidend unterstützt, dafür bin ich Ihnen sehr dankbar.

Ein großer Dank gebührt Ali Salanti, Mette Agerbæk und Hanna Wietz, ohne dessen Vorarbeiten und Unterstützung die vorliegende Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben meinem Verlobten Max Jacob, meinen Eltern Nicole und Thomas Krahn, die mein gesamtes Studium mit großem Engagement unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.