

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

Etablierung eines *Workflows* zur CTC-Anreicherung bei
Mammakarzinompatientinnen mithilfe des rekombinanten
Malariaproteins VAR2CSA (rVAR2)

Dissertation

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

vorgelegt von

Hanna Louisa Wietz

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Meinen Eltern

Zusammenfassung

In Deutschland ist das Mammakarzinom mit 69.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung der Frau. Nach aktuellen Inzidenzraten erkrankt eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Dabei sind 90 % der Todesfälle auf eine Metastasierung und weniger auf den Primärtumor zurückzuführen. Während des Metastasierungsprozesses gelangen Tumorzellen durch Intravasation in nahegelegene Blutgefäße. Diese zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) können durch Extravasation Metastasen in entfernten Geweben bilden. CTCs sind ein unabhängiger Prognosefaktor für ein progressionsfreies Überleben sowie für das Gesamtüberleben. CTCs sind sehr selten und werden üblicherweise mittels Antikörper angereichert, welche sich gegen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) richten. Diese Anreicherungsmethode ist jedoch durch die epitheliale-mesenchymale Transition und dem damit einhergehenden Verlust von epithelialen Markern limitiert. Agerbæk *et al.* konnten erstmals zeigen, dass mittels eines rekombinanten Malariaproteins und dessen Bindung an onkofetales Chondroitinsulfat (ofCS) eine Anreicherung mesenchymaler und epithelialer Tumorzellen möglich ist. Das rekombinante Malariaprotein rVAR2 (*recombinant Variant Surface antigen 2*) konnte bereits zur Anreicherung von CTCs von Leber-, Lungen-, Pankreas-, Prostatakarzinom- und Glioblastom-Patienten verwendet werden.

Ziel dieser Arbeit ist das Etablieren eines *Workflows* für eine EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen.

Zunächst wurde die Bindung des rVAR2 an Tumorzellen von Brustkrebszelllinienzellen verschiedener Subtypen und CTCs geprüft. Weiterhin wurden verschiedene Einflussfaktoren auf eine stabile rVAR2-ofCS Bindung untersucht. Daraufhin wurde ein *Workflow* erarbeitet, um Tumorzellen mittels rVAR2 anzureichern. Es konnte eine indirekte Anreicherungsmethode etabliert werden, welche auf einer magnetischen Anreicherung mittels des KingFishers basiert.

Es konnte gezeigt werden, dass rVAR2 an Brustkrebszelllinienzellen unabhängig von deren Subtyp bindet, jedoch keine Bindung mit peripheren Blutzellen eingeht. Eine Anfärbung mittels rVAR2 identifiziert CTCs von metastasierten Mammakarzinompatientinnen. Anhand des neuen *Workflows* konnten mittels rVAR2 Zelllinienzellen verschiedener Brustkrebssubtypen mit Wiederfindungsraten von $42\% \pm 3,63\%$ bei SK-BR-3 Zelllinienzellen und $73,5\% \pm 7,67\%$ bei MDA-MB-231 Zelllinienzellen angereichert werden. Letztere exprimieren EpCAM gering und können daher nur schwer mittels EpCAM-abhängigen Methoden angereichert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass rVAR2 das Potential hat eine größere Population an CTCs in Mammakarzinompatientinnen anzureichern als die etablierten EpCAM-abhängigen Verfahren. Somit können zusätzliche molekulare Information über den Tumor gewonnen werden, welche wiederum essenziell für eine personalisierte Therapie sind.

Summary

Breast cancer is the most common cancer among women in Germany with up to 69.000 new cases annually. According to current incidence rates, one in eight women will develop breast cancer during her lifetime. However, 90 % of cancer-related deaths are caused by metastases and not the primary mammarian cancer itself. During metastasis, tumor cells gain the ability to enter nearby blood vessels via intravasation. Through extravasation, these circulating tumor cells (CTCs) can then form metastases in distant tissues.

Importantly, CTCs can serve as an independent prognostic factor for progression-free survival as well as overall survival. As CTCs are lowly abundant, screening for them relies on enrichment by antibodies directed against epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). However, the EpCAM enrichment method is limited by epithelial-mesenchymal transition of CTCs and the associated loss of epithelial markers. Agerbæk *et al.* demonstrated a novel enrichment method for mesenchymal and epithelial tumor cells using a recombinant malarial protein, recombinant Variant Surface antigen 2 (rVAR2), utilising its ability to bind to oncofetal chondroitin sulfate (ofCS). rVAR2 has already been used to enrich CTCs from patients with liver, lung, pancreatic and prostate cancer, and glioblastoma.

The aim of this work is to establish a workflow for EpCAM-independent enrichment of CTCs from breast cancer patient-derived blood to overcome the limitations of EpCAM. Initially, the binding of rVAR2 to tumor cells independent of their subtypes was confirmed using various breast cancer cell lines of different subtypes and patient-derived CTCs. Furthermore, the stability of rVAR2-ofCS was investigated under different conditions various factors influencing a stable rVAR2-ofCS binding were investigated. Finally, a workflow for rVAR2-dependent tumor cell enrichment was developed. Ultimately, this established an indirect recovery method based on magnetic enrichment using the KingFisher device.

The work shows specific rVAR2 binding to breast cancer cells independent of their subtype without unspecific binding to peripheral blood cells. Furthermore, rVAR2 staining successfully identified CTCs from metastatic breast cancer patients. The novel workflow of rVAR2-based enrichment leads to a recovery rate of $42\% \pm 3,63\%$ from SK-BR-3 cell line derived cells and $73,5\% \pm 7,67\%$ from MDA-MB-231 cell line derived cells. Importantly, EpCAM-based enrichment of MDA-MB-231 cells is not applicable due to their low EpCAM expression levels.

Overall, the results suggest that rVAR2 can enrich larger subsets of CTCs in breast cancer patients compared to currently used EpCAM-dependent methods. Thus, rVAR2-based CTC screening might facilitate obtaining further molecular information about the tumor to improve prognosis and personalized cancer therapy.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
x g	x-fache Gravitation
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
array-CGH	Mikroarray-basierte genomische Hybridisierung (<i>array-based comparative genomic hybridization</i>)
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA1/2	Mammakarzinom (<i>breast cancer</i>) 1/2 Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
CD45	<i>Cluster of differentiation 45</i>
CK	Zytokeratin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSA	Chondroitinsulfat A
CSPG	<i>chondroitin sulfate proteoglycans</i>
CTC	Zirkulierende Tumorzellen (<i>circulating tumor cells</i>)
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBB	Dynabeads® Biotin Binder
DLA	Diagnostische Leukapherese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)
ER	Östrogenrezeptor
<i>et al.</i>	<i>et alii/aliae</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HR	Hormonrezeptor
kDa	Kilodalton
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität (<i>mean fluorescent intensity</i>)
mg	Milligramm

min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
nL	Nanoliter
nM	Nanomolar
ofCS	Onkofetales Chondroitinsulfat
PBMC	Mononukleäre Zellen 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>)
PF	Proteinfreier Blockierpuffer (<i>protein free blocking buffer</i>)
PF10	Proteinfreier Blockierpuffer 10% in PBS (<i>protein free blocking buffer 10% in PBS</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PR	Progesteronrezeptor
REF	Referenz
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
rVAR2	<i>recombinant Variant Surface antigen 2</i>
s	Sekunde
SpyC	SpyCatcher Protein
T-DM1	Trastuzumab-Emtansin
TNBC	Triple negatives Mammakarzinom (<i>triple negative breast cancer</i>)
TRITC	Tetramethylrhodamine
VAR2CSA	<i>variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A</i>
WGA	Genomamplifikation (<i>whole genome amplification</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Krebserkrankung.....	1
1.2	Metastasierung.....	2
1.3	Mammakarzinom.....	4
1.3.1	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	4
1.3.2	Einteilung.....	4
1.4	Zirkulierende Tumorzellen.....	5
1.4.1	Eigenschaften.....	5
1.4.2	<i>Liquid Biopsy</i>	6
1.4.3	Klinische Rolle.....	7
1.4.4	Klinische Studien zur Beurteilung des Stellenwerts der <i>Liquid Biopsy</i>	7
1.4.5	Anreicherungs- und Detektionsmethoden.....	9
1.5	rVAR2.....	12
1.6	Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Geräte und Material.....	16
2.1.2	Puffer, Reagenzien und <i>Kits</i>	17
2.1.3	Zellkultur.....	19
2.1.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	19
2.1.5	rVAR2.....	20
2.1.6	Software.....	22
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Patientenproben.....	22
2.2.2	Zelllinien.....	22
2.2.3	Kulturbedingungen.....	23
2.2.4	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien.....	23
2.2.5	Kultivieren, Ablösen und Auszählen von Zellen.....	23
2.2.6	Fluoreszenzmarkierung.....	24
2.2.7	Durchflusszytometrie.....	25
2.2.8	Einfluss von CellSave.....	26
2.2.9	Einfluss verschiedener Ablösepuffer.....	27
2.2.10	Bindung der <i>Beads</i> an Tumorzellen.....	27
2.2.11	Vorbereitung der <i>Beads</i> zur Anreicherung.....	29
2.2.12	Aufbereitung der Blutprobe durch Erythrozytenlyse.....	31

2.2.13	CellTracker Green Färbung	32
2.2.14	Anreicherung mittels IsoFlux	32
2.2.15	Anreicherung mittels KingFisher	33
2.2.16	Anreicherung von Tumorzellen (<i>Spike-in</i> Experimente)	33
2.2.17	Färbung Patientenzellen in Suspension mittels rVAR2	34
2.2.18	Isolation von Einzelzellen mittels CellCelector	35
2.2.19	Whole Genome Amplification, Qualitätskontrolle und Array-CGH	36
2.2.20	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	rVAR2 Bindung an Brustkrebszelllinienzellen	37
3.2	rVAR2 Bindung an CTCs von Mammakarzinompatientinnen	38
3.3	Experimente zur Anreicherung	41
3.3.1	Einfluss des Ablösepuffers auf die rVAR2 Bindeaffinität	41
3.3.2	Einfluss von CellSave auf die rVAR2 Bindeaffinität	42
3.3.3	Bindung der <i>Beads</i> an Tumorzellen	42
3.3.4	Vergleich verschiedener rVAR2 Proteine	43
3.3.5	Vergleich KingFisher, IsoFlux und Anreicherungsverfahren	45
3.3.6	Anreicherung Brustkrebszelllinienzellen	51
3.3.7	Workflow zur Anreicherung von CTCs	52
4	Diskussion	53
4.1	Vorbemerkung	53
4.2	Diskussion der Ergebnisse	54
4.2.1	rVAR2 Bindeaffinität und Anreicherung der Zelllinienzellen	54
4.2.2	Rahmenbedingungen	56
4.2.3	Vergleich verschiedener rVAR2 Proteine	57
4.2.4	Vergleich verschiedener rVAR2 zu SpyCatcher Verhältnisse	58
4.2.5	Etablierung von <i>Beads</i> und Anreicherungstechnik	59
4.2.6	Anreicherungsverfahren	62
4.3	Limitation der Arbeit	62
4.4	Schlussbetrachtung und Ausblick	63
5	Literaturverzeichnis	65
6	Anhang	72

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankung

Im Jahr 2018 erkrankten 18.078.957 Menschen laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) neu an Krebs. Von diesen starben 9.555.027 an ihrer Erkrankung [1]. Damit gehört Krebs nach wie vor zu einer der relevantesten Erkrankungen der Menschheit. In Deutschland erkranken nach Robert Koch-Institut schätzungsweise 500.000 Menschen, bei einer Bevölkerung von ungefähr 82 Millionen, jedes Jahr neu an Krebs [2]. Die demografische Entwicklung könnte dazu beitragen, dass in dem Zeitraum 2015 bis 2030 in Deutschland ein Anstieg der Krebsneuerkrankungen um 23 % zu erwarten ist [2].

Die tendenziell steigenden Inzidenzen sowie die hohe Sterblichkeit zeigen die Notwendigkeit auf dem Gebiet der Krebserkrankungen weiter zu forschen, neue Risikofaktoren zu identifizieren und neue Therapiemethoden zu etablieren.

Der Begriff Tumor umfasst zwei Kategorien an Tumoren: Zum einen die malignen Tumore, welche unkontrollierbar und aggressiv wachsen, sich sowohl lokal als auch in entfernten Geweben ausbreiten und so Metastasen, sogenannte Tumorabsiedelungen, formen und zum anderen die benignen Tumore, die lokal begrenzt wachsen und Probleme eher durch die Verdrängung vitaler Organe und Gewebe verursachen [3]. Maligne Tumore breiten sich meist schnell aus und brauchen zeitnahe Therapie, um weitere Ausbreitung zu verhindern. Die Mehrheit der auf maligne Tumore zurückzuführenden Todesfälle basiert auf deren Metastasierung [3].

Tumorzellen sind als eine Ansammlung von übermäßig proliferierenden, in der Funktion nicht dem Ursprungsgewebe entsprechenden Zellen definiert, die bestimmte Eigenschaften erfüllen [4]. Diese Eigenschaften wurden von Hanahan und Weinberg als die sogenannten „*Hallmarks of cancer*“ postuliert. Tumorzellen können sich durch Eigenproduktion von Wachstumsfaktoren selbst erhalten, sie sind nicht sensibel gegenüber Wachstumsinhibitoren, sie können programmierten Zelltod umgehen, sie besitzen unlimitiertes Replikationspotential, sie können fortlaufend Angiogenese betreiben und besitzen die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung [4]. Aufgrund des großen Fortschritts in der Tumorforschung wurden 2011 die oben beschriebenen „*Hallmarks*“ ergänzt. Als weitere Charakteristika

werden die Fähigkeiten genannt den Zellmetabolismus zu modifizieren oder neu zu programmieren, um neoplastische Proliferation am effektivsten zu unterstützen und die Fähigkeit der Tumorzellen sich einer immunologischen Zerstörung durch T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen zu entziehen [5]. Um diese acht Eigenschaften der Tumorzellen zu ermöglichen, kommen die sogenannten „*enabling characteristics*“ hinzu: Zum einen die genomische Instabilität und Mutation, welche zu genetischen Veränderungen der Tumorzellen führen, die die Tumorprogression vorantreiben und zum anderen die tumorbegünstigende Entzündungsreaktion, die von Zellen des angeborenen Immunsystems eigentlich zur Bekämpfung von Infektionen und Heilen von Wunden hervorgerufen wird [5]. Im Jahr 2022 wurden von Hanahan zu den bereits beschriebenen „*Hallmarks of cancer*“ zwei weitere Eigenschaften vorgestellt, die die phänotypische Plastizität und die Zellseneszenz umfassen. Weitere befähigende Eigenschaften, die dies ermöglichen, betreffen die nicht-mutationsbedingte epigenetischen Umprogrammierung und das Mikrobiom [6].

In den letzten Jahren zeigten viele Studien eine intratumoralen Heterogenität, was bedeutet, dass Subpopulationen an Tumorzellen mit verschiedenen genetischen und phänotypischen Charakteristika in einem Primärtumor koexistieren [7-9]. Auch die „Driver-Mutation“ kann sowohl innerhalb des Primärtumors als auch zwischen Primärtumor, Metastase und zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) variieren [7]. Diese Diversität kann genetischen und epigenetischen Faktoren genauso wie Adaptationsprozessen und Fluktuationen in Signalwegen geschuldet sein [7]. Die Theorien, die die Tumorerheterogenität beschreiben, sind zum einen die Krebsstammzell-Hypothese und zum anderen das klonale Evolutionsmodell. Einblicke in diese Mechanismen und Konsequenzen der intratumoralen Heterogenität sind essenziell für die Verbesserung und Individualisierung der Therapie [7].

1.2 Metastasierung

Unter Metastasierung versteht man die Dissemination von Tumorzellen eines Primärtumors in das Gewebe entfernter Organe. Trotz signifikanter Verbesserung in Diagnostik und Therapie ist die Mehrheit der Patienten mit einer unheilbaren, letalen Erkrankung konfrontiert [10].

Wie in den „*Hallmarks of cancer*“ bereits beschrieben, ist die Invasion in umliegendes Gewebe sowie die Metastasierung in entfernteres Gewebe eine wichtige Eigenschaft von Tumorzellen [4]. Tumorzellen, die aus Epithelgewebe entstehen, erlangen die Fähigkeit sich aus dem Zellverband mittels Matrix degradierender Enzyme herauszulösen und erhalten somit eine gesteigerte Motilität [5]. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Verlust des Adhäsionsproteins E-Cadherin. Mit dem Verlust der Adhärenz-Kontakte zu benachbarten Zellen und der Basalmembran gehen auch morphologische Veränderungen einher. Die Tumorzelle konvertiert von einem vormals epithelialen Phänotyp zu einem spindelzellig anmutenden, fibroblastischen Phänotyp. Dieser Prozess ist bekannt als epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) [5]. Die gewonnene Motilität bietet den Tumorzellen die Möglichkeit zur lokalen Invasion, gefolgt von einer Intravasation in nahegelegene Blutgefäße und lymphatische Gefäße. Über das Gefäßsystem können die CTCs vom Primärtumor weit entfernte Gewebe erreichen. Durch Extravasation aus dem Gefäß in das Parenchym können die Zellen kleine Mikrometastasen im entfernten Gewebe bilden, die schließlich zu einem makroskopischen Sekundärtumor heranwachsen können [5]. Die EMT ist auch in anderen Kontexten bekannt. Physiologisch ist sie auf der einen Seite mit Implantation, Embryogenese und Organentwicklung, aber auch mit Geweberegeneration und Fibrose nach inflammatorischen Ereignissen assoziiert [11].

Die Kolonisation im entfernten Gewebe ist ein ineffizienter Prozess, da die meisten Zellen des Primärtumors nach der Extravasation in Apoptose gehen [12]. Die überlebenden Tumorzellen im entfernten Gewebe können sich in drei Stadien befinden: in einem nicht proliferativen Stadium, als Mikrometastase oder als eine aktiv wachsende metastatische Läsion [12]. Die Zellen, die sich im sogenannten „*Dormancy*“ Stadium befinden, werden vermutlich erst Monate oder Jahre später zu einem Fortschreiten des Metastasierungsprogress führen [12]. Konventionelle Chemotherapien, die vor allem proliferierende Zellen angreifen, haben einen geringen Einfluss auf diese Zellen und es besteht die Gefahr, dass Residuen verbleiben [12]. Patienten können auch ohne manifeste Metastasen eine systemische, adjuvante oder neoadjuvante Therapie erhalten, um minimale Residuen zu bekämpfen. Diese Therapie zieht meist nicht die molekularen Charakteristika der disseminierten Tumorzellen in Betracht [13]. Daher ist eine

Anreicherung, Isolation und weitere Charakterisierung dieser Zellen von großer Bedeutung für die weiteren Therapieschritte.

1.3 Mammakarzinom

1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

In Deutschland ist das Mammakarzinom mit 69.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung der Frau [2]. Nach aktuellen Inzidenzraten erkrankt eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Fast drei von zehn betroffenen Frauen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt [2]. Es handelt sich also bei weitem nicht nur um ein Karzinom des hohen Alters. Nach Einführung des Mammografie-Screenings zwischen 2005 und 2009 kam es aufgrund der verbesserten Früherkennung erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Neuerkrankungsrate und danach zu einem langsamen Rückgang [2]. Durch die Einführung des Screenings und die somit frühe Detektion des Tumors konnte die Sterberate gesenkt werden. Die relative 5-Jahresüberlebensrate bei Frauen betrug 2016/2017 87 % [2].

Am häufigsten ist das Mammakarzinom mit Umwelt-, hormonellen und Lebensstilfaktoren assoziiert [14]. Hormonelle Faktoren, wie eine frühe erste und eine späte letzte Regelblutung, Kinderlosigkeit oder erhöhtes Alter bei der ersten Geburt gelten als Risikofaktor. Auch eine Hormontherapie während der Menopause sowie Lebensstilfaktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel, Alkohol und Rauchen zählen als Risikofaktoren [14]. Eine familiäre Belastung für das Mammakarzinom weisen in Deutschland ungefähr 30 % der Frauen mit Mammakarzinom auf, wovon ungefähr 10 % auf eine genetische Ursache zurückzuführen sind [16].

1.3.2 Einteilung

Das Mammakarzinom vom nicht-spezifischen Typ (NST-Typ) ist der häufigste invasive Tumor der Brust [15]. Das Duktalkarzinom in situ hingegen ist nicht invasiv, gilt aber als Risikoläsion. Die Invasivität ist definiert anhand des Penetrierens der abnormal proliferierenden Zellen durch die Wand des Milchgangs in umliegende Gewebe [16]. Die histologische Differenzierung der Karzinome hilft anhand Kernpolymorphismen und Mitoserate die Prognose und Malignität abzuschätzen. Das meistgenutzte Grading-System basiert auf dem Bloom-Richardson-Grading, modifiziert von Elston und Ellis. Das Staging erfolgt nach dem TNM-System,

welches sowohl klinische als auch pathologische Informationen wie die Tumorgroße (T), den regionären Lymphknotenstatus (N) und Metastasierung (M) berücksichtigt [17].

Es gibt weiterhin verschiedene Subtypen des Mammakarzinoms, definiert anhand ihrer Expression von Östrogenrezeptoren (*estrogen receptor*, ER), Progesteronrezeptoren (*progesterone receptor*, PR) und *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) -Onkogen. Insgesamt treten die ER-positiven Tumore am häufigsten auf [18]. Vor allem ER- und PR-positive Tumore weisen eine Koinzidenz mit hormonellen Risikofaktoren auf [19]. Hormonrezeptor-positive (*hormone receptor*, HR) - Tumore lassen sich in die Subgruppen Luminal A und B unterteilen. Die HR-negativen Tumore unterteilen sich in HER2-positive Tumore, den basal-like Subtyp sowie den normal-like Subtyp [18]. Sowohl HER2 als auch der basal-like Subtyp gehen klinisch mit einer schlechteren Prognose einher und präsentieren sich bei Diagnosestellung meist schon in einem fortgeschrittenen Stadium. Das HER2-Onkogen wird in ungefähr 20 % der Brusttumoren überexprimiert. Tumore, die weder ER, PR oder HER2 exprimieren, werden triple-negativ (*triple negative breast cancer*, TNBC) genannt und machen ungefähr 15 % der Tumore aus. Die Inzidenz des TNBC-Subtyps ist höher in jungen Frauen und Patientinnen mit *BRCA1*-Mutation. Auch dieser Subtyp ist assoziiert mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose [18].

1.4 Zirkulierende Tumorzellen

1.4.1 Eigenschaften

Bereits in frühen Stadium des Tumorwachstums wandern Tumorzellen vom Primärtumor in die Blutgefäße und zirkulieren so im Blutgefäßsystem. Das wahre metastatische Potential ist noch unklar [20]. Die Fähigkeit CTCs verlässlich zu detektieren und analysieren bietet ein großes Potential. Die Ziele der Forschung an CTCs sind Prognosen treffen zu können über ein Wiederauftreten von Metastasen bzw. einem Fortschreiten der Metastasierung, sofortiges Therapieansprechen zu überwachen, molekulare Therapieziele zu identifizieren sowie Tumorresistenzmechanismen zu analysieren und ein tiefer gehendes Verständnis des Metastasierungsprozesses zu erlangen [21].

Die Anreicherung und Detektion stellen bis heute eine große Herausforderung dar. Es wird angenommen, dass im peripheren Blut metastasierter Patienten CTCs mit

einer Häufigkeit von einer CTC pro 10^5 - 10^7 peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) auftreten [22]. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Anreicherung und Detektion einer solchen seltenen Tumorzelle vor dem Hintergrund einer Vielzahl von anderen Zellen dar [22, 23]. Auch die limitierte Probenmenge und Artefakte aufgrund der Probenzubereitung stellen eine Herausforderung dar [24]. Anreicherungs- und Detektionsmethoden erfordern also eine hohe Sensitivität sowie Spezifität, um sie im klinischen Alltag praktikabel und verlässlich zu machen. Um die zirkulierenden Tumorzellen vor einem hohen Hintergrund an Blutzellen zu isolieren, müssen die Unterschiede zwischen epithelialen Tumorzellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs herausgearbeitet werden. Dies gestaltet sich aufgrund der tumoreigenen Heterogenität und genetischen Instabilität schwierig [22]. Anreicherungsmarker müssen weiterhin unabhängig des Tumorsubtyps auftreten und sich nicht auf benignen Zellen wiederfinden. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass es durch die EMT zu einer verminderten Expression epithelialer Marker wie dem *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) kommt [25]. Es wird vermutet, dass die Tumorzellen, die bereits den Prozess der EMT durchlaufen haben, mit einer schlechteren Prognose einhergehen [25-27]. Dies zeigt die Dringlichkeit auf, einen CTC-Marker zu identifizieren, welcher auch unabhängig phänotypischer Eigenschaften auf den Tumorzellen exprimiert wird.

1.4.2 Liquid Biopsy

Die *Liquid Biopsy* stellt als Blutabnahme eine minimalinvasive und einfach wiederholbare Möglichkeit dar, Informationen über den Primärtumor, Metastasen und auch das Therapieansprechen zu erhalten [28]. Klinisch kann die *Liquid Biopsy* verwendet werden für die frühe Detektion von Karzinomen bei Verwendung eines hohen Blutvolumens, Staging und Monitoring von Patienten mit lokalem Karzinom, zur Vorhersage eines Progresses und um das Therapieansprechen zu überwachen [28]. Blutproben der Mammakarzinompatientinnen können nicht nur zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) und RNA-Fragmente enthalten, welche von Primärtumor oder Metastasen abgegeben werden, sondern auch intakte CTCs [29]. Daher könnten in heterogenen Tumoren onkogene Mutationen und Amplifikationen sogar effektiver detektiert werden als in Gewebebiopsien, die nur ein eingeschränktes Tumorareal umfassen [29].

Die Schwierigkeit der *Liquid Biopsy* besteht in der Seltenheit der CTCs und der somit begrenzten Aussagekraft einer geringen Menge analysierten Blutes. Die diagnostische Leukapherese (DLA) bietet eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen [30]. Das Prinzip beruht darauf, dass CTCs und mononukleäre Zellen eine ähnlich Dichte aufweisen und somit bei der Leukapherese mit extrahiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass die DLA zu einem signifikanten Anstieg der detektierten CTCs in Mammakarzinompatientinnen führt. Ebenso konnte die Anzahl an CTC-negativ getesteten Patientinnen verringert werden [30].

1.4.3 Klinische Rolle

Zirkulierende Tumorzellen lassen sich sowohl im metastasierten als auch nicht-metastasierten Stadium nachweisen [31, 32]. Eine große Anzahl an Studien konnte bereits zeigen, dass CTCs einen unabhängigen Prognosefaktor für einen erneuten Rückfall der Erkrankung und das Überleben darstellen [33].

CTCs treten vor allem bei Patientinnen im metastasierten Stadium auf und sind im nicht-metastasierten Stadium eher selten. In der adjuvanten, nicht metastasierten Situation bedeutet der Nachweis von CTCs ein hohes Risiko einer systemischen Progression [31]. Es wird davon ausgegangen, dass diese, durch Systemtherapie selektierten, CTCs aggressivere Eigenschaften haben, die möglicherweise eine ausgedehntere, intensiviertere adjuvante Therapie nötig machen, um ein erneutes Auftreten des Tumors sowie Metastasen zu verhindern [20].

Das metastasierte Mammakarzinom gilt als unheilbar, sodass dessen therapeutische Ansätze auf ein verbessertes progressionsfreies und verlängertes Gesamtüberleben zielen. Cristofanilli *et al.* zeigten, dass sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben negativ mit einer erhöhten prätherapeutischen CTC-Zahl von ≥ 5 CTCs in 7,5 mL Blut korrelieren [32, 34]. Weiterhin zeigt die Persistenz von CTCs nach der Therapie ein geringeres Therapieansprechen [31].

1.4.4 Klinische Studien zur Beurteilung des Stellenwerts der *Liquid Biopsy*

In der SWOG S0500 Studie konnten CTCs als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben in Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, welche eine Erstlinientherapie erhielten, bestätigt werden. Für Patientinnen mit anhaltend hoher CTC-Anzahl (≥ 5 CTCs) über 21 Tage nach Erhalt der Erstlinientherapie korrelierte eine Therapieänderung zu einer alternativen zytotoxischen Therapie

nicht mit einem verlängerten Gesamtüberleben. Es konnte geschlussfolgert werden, dass diese Patientinnen anstelle einer Zweit- oder Drittlinienchemotherapie möglicherweise eher von einer zielgerichteteren Therapie profitieren würden [35]. Weiterhin konnte die STIC CTC Studie zeigen, dass eine Therapieentscheidung bezüglich der Erstlinientherapie (Chemotherapie oder endokrine Therapie), bei HR-positivem, HER2-negativem metastasiertem Mammakarzinom, basierend auf der Anzahl an CTCs, eher zu einem verlängerten Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben führen kann als die ärztliche Entscheidung basierend auf klinischen Parametern [36].

Heutzutage stützt sich die Therapieentscheidung nach wie vor weitgehend auf an Gewebebiopsien bestimmten molekularen Markern [37]. Durch den Metastasierungsprozess und die klonale Selektion der Tumorzellen kann es kontinuierlich zu molekularen Veränderungen kommen. Dies kann zu einem Verlust der Therapiewirksamkeit führen. Des Weiteren bestehen Tumore meist aus sehr heterogenen Zellpopulationen, denen eine einmalige, punktuell durchgeführte Biopsie nicht immer gerecht werden kann [37-39]. Riethdorf *et al.* zeigten, dass in ungefähr 20 % der Mammakarzinompatientinnen bei HER2-negativem Primärtumor CTCs mit einer starken HER2-Expression gefunden werden konnten [40]. Dies lässt vermuten, dass solche Patientinnen auch von einer gegen HER2 gerichteten Therapie profitieren könnten.

Bei der CirCe T-DM1 Studie handelt es sich um eine prospektive Phase 2 Studie, die die Effektivität von Trastuzumab-Emtansin, welches sich gegen HER2-amplifizierte Tumorzellen in HER2-negativem metastasiertem Mammakarzinom richtet, bei Patientinnen mit HER2-positiven CTCs untersucht. Es war lediglich ein begrenztes Therapieansprechen in einer Patientin zu verzeichnen. Limitationen dieser Studie stellen sicherlich die geringe Anzahl an Patientinnen mit HER2-amplifizierten CTCs bei HER2-negativem metastasiertem Mammakarzinom dar [41].

In der multizentrischen Studie DETECT-III wurde die Überlegung aufgegriffen die CTC-Eigenschaften in das Therapiekonzept miteinzubeziehen. Es wurde untersucht, ob Patientinnen mit einem HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinom – bestimmt anhand einer Gewebebiopsie - und HER2-positiven CTCs zusätzlich zur Standardtherapie von einer Anti-HER2-gerichteten Therapie

mit dem Tyrosinkinasehemmer Lapatinib profitieren können. Die Effizienz der Behandlung mit Lapatinib wurde an der CTC-Anzahl, dem progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Lapatinib einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientinnen mit initial HER2-negativem Tumor, aber HER2-positiven CTCs, darstellt [42]. CTCs stellen somit nicht nur wertvolle prädiktive und prognostische Marker dar, sondern bieten einen neuen Ansatz für individuelle Therapieregime. So können aus der *Liquid Biopsy* erworbene CTCs anhand ihrer Anzahl, ihrer Differenz zum Primärtumor und ihrer Expression von Biomarkern eine zusätzliche Therapiegrundlage darstellen [43].

1.4.5 Anreicherungs- und Detektionsmethoden

Die Methoden, CTCs aus dem Blut anzureichern, sind so vielfältig wie die CTCs selbst. Teilt man die Methoden nach ihren zwei Hauptunterscheidungskriterien ein, so ergeben sich zum einen die Anreicherungsmethoden, die auf die physikalischen Eigenschaften der Zellen abzielen, und zum anderen die Anreicherungsmethoden, die sich auf die biologischen Eigenschaften konzentrieren [21].

Unter physikalischen Anreicherungsmethoden versteht man eine Selektion nach Größe, Dichte, elektrischer Ladungen und Deformierbarkeit [44]. Membranfiltersysteme filtern die Zellen nach Größe. Hierbei steht die Idee im Vordergrund, dass CTCs größer als periphere Blutzellen sind, die den zellulären Hauptbestandteil des Blutes ausmachen [44]. In einer Vergleichsstudie konnten mittels der von Vona und Paterlini-Brechot *et al.* entwickelten Methode „*Isolation by size of epithelial tumor cells*“ (ISET) gute Ergebnisse bei der CTC-Anreicherung erzielt werden [45, 46]. Durch die Geschwindigkeit und einfache Anwendung der Mikrofiltration kann ein hohes Blutvolumen prozessiert werden. Ein großer limitierender Faktor des Systems ist der hohe Hintergrund, vor dem Tumorzellen schwer zu differenzieren sind [44]. Weitere Systeme, die auf physikalischen Eigenschaften beruhen, sind die Dichtezentrifugation mittels Ficoll-Paque, ein synthetisches Polysaccharid, welches mononukleäre Zellen von Erythrozyten trennt. Zentrifugation ist weit verbreitet für die CTC-Anreicherung, wobei auch hier die Schwierigkeit in der Kontamination der Probe mit peripheren Blutzellen besteht [44]. Mikrofluidische Systeme erlauben eine Anreicherung basierend auf Größe und Deformierbarkeit [47]. Diese Anreicherungsmethode zeigt zumeist einen

geringeren Hintergrund an peripheren Blutzellen. Die Schwierigkeit liegt hier in der Prozessierung größerer Mengen an Blut [47]. Ein großer Vorteil der sogenannten *Labelfree*-Anreicherungs-methode besteht darin, dass nicht durch Antikörper gegen auf CTC vermuteten Antigenen eine Vorselektion stattfindet und somit CTC-Subpopulationen gar nicht erst angereichert werden.

Die am häufigsten genutzte Anreicherungs-methode ist die immunomagnetische Anreicherung [21]. Hierbei kann zwischen positiver Selektion, mit Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene, und negativer Selektion, mit Antikörpern gegen Leukozytenantigene wie *Cluster of differentiation 45* (CD45), unterschieden werden. Bei Letzterem besteht die Anreicherung der Tumorzellen aus einer Depletion der CD45-positiven Leukozyten. Die Antikörper können an magnetische *Beads* gebunden werden und ermöglichen so anhand der Antigen-Antikörper-Bindung und eines Magneten eine Anreicherung. Das am häufigsten zur Tumorzellanreicherung verwendete Oberflächenantigen ist EpCAM [21].

Viele Systeme kombinieren diese immunomagnetische Anreicherung. Der AdnaTest (Qiagen, Hilden, Deutschland) bietet die weitere Möglichkeit mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) Gentranskripte der EpCAM-positiven Zellen darzustellen [48]. Auch der IsoFlux (Fluxion Biosciences, Alameda, USA) kombiniert mikrofluidische und immunomagnetische Anreicherungs-methoden. Ein Vorteil besteht darin, dass die Zellen, anders als bei anderen mikrofluidischen Systemen, nicht von der Kartusche abgelöst werden müssen und so ihre Viabilität erhalten werden kann [49]. Außerdem bietet dieses System mehr Flexibilität, da magnetische Streptavidin-konjugierte *Beads* das Spektrum an zu bindenden Epitopen erweitert [49].

Eine Übersicht der genannten Anreicherungs-methoden ist in Abbildung 1 dargestellt.

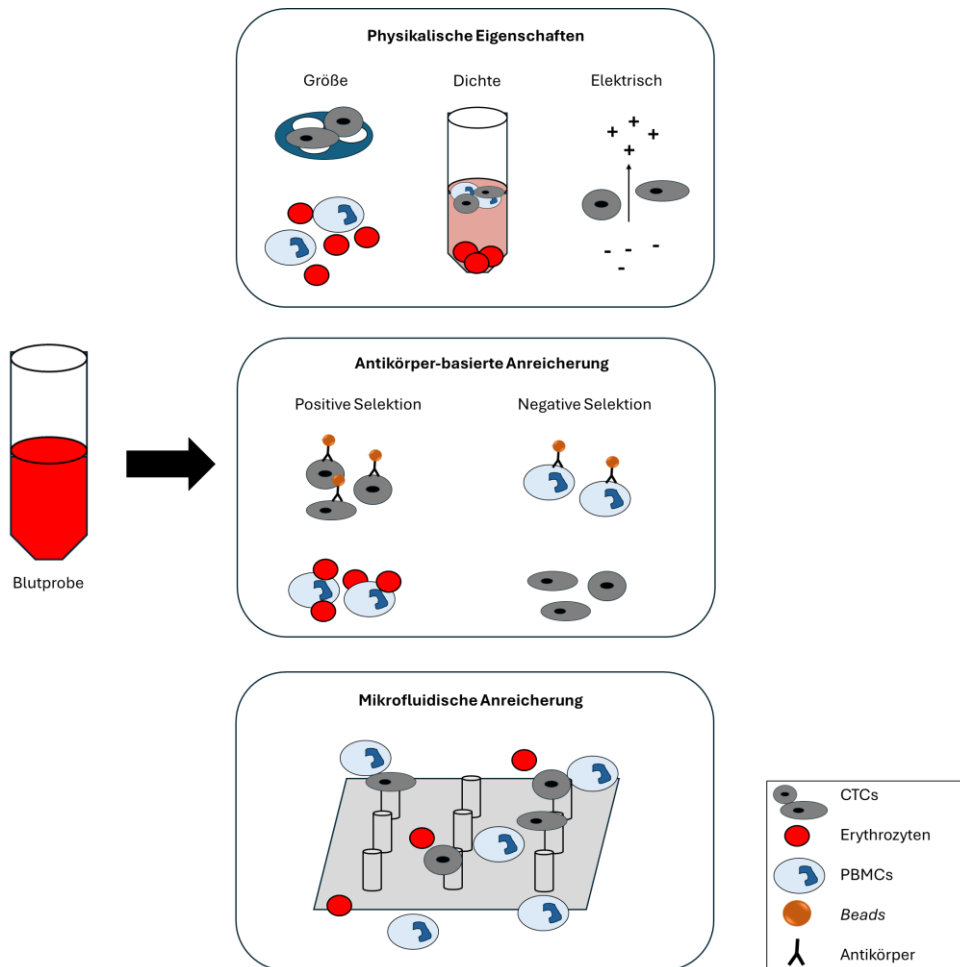


Abb. 1: Verschiedene Ansätze der CTC-Anreicherung

Dargestellt sind eine Auswahl verschiedener Ansätze CTCs anzureichern. Die erste Gruppe basiert auf einer Anreicherung nach physikalischen Eigenschaften wie Größe, Dichte und elektrischer Ladung. Die zweite Gruppe zeigt eine immunomagnetische Anreicherungsmethode. Hier ist zu unterscheiden zwischen positiver Selektion mit Antikörpern, welche sich gegen spezifische Antigene auf den CTC richten, und negativer Selektion mit Antikörpern, welche sich gegen Antigene richten, die nur auf PBMCs zu finden sind. Die dritte Gruppe repräsentiert die mikrofluidischen Anreicherungsmethoden, die häufig Größen-basierte und Antikörper-basierte Anreicherungsmethoden vereinen. CTCs = *circulating tumor cells*, PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*. Die Abbildung ist modifiziert nach Correnti *et al.* [50].

Ebenfalls immunomagnetisch lassen sich Zellen mittels KingFisher Duo Prime Purification System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) anreichern. Hier bietet sich erneut der Vorteil mit verschiedenen Antikörpern oder Proteinen, welche an *Beads* gekoppelt werden, das Spektrum der anzureichernden Zellen zu erweitern [51].

In vielen Studien wurden diese Anreicherungsmethoden mit dem Goldstandard der CTC-Anreicherung, dem CellSearch (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italien) verglichen [48, 52]. Cristofanilli *et al.* konnten zeigen, dass mithilfe des CellSearch Systems angereicherte CTCs signifikante prognostische Informationen für

Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom darstellen [32, 34]. Der CellSearch ist ein von der *United States Food and Drug Administration* zugelassenes System für den klinischen Routinegebrauch bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom [53].

Der CellSearch bietet ein automatisiertes Anreicherungs- und immunozytochemisches Detektionssystem für CTCs. Das System besteht aus den CellSave Probenröhrchen, dem CellSearch *Circulating Tumor Cell Kit*, einem automatisierten Instrument, um die Reagenzien der Zellprobe zuzuführen, diese zu waschen und einem semiautomatisierten Fluoreszenzmikroskop zum Scannen und Auswerten der angereicherte Zellen – dem CellTracks Analyzer II (alles Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italien) [53].

Der CellSearch bietet so die Möglichkeit eine 7,5 mL Blutprobe auf 300 µL mit angereicherten Tumorzellen zu reduzieren [54]. Es werden Ferrofluide mit anti-EpCAM Antikörpern zur immunomagnetischen Anreicherung genutzt. Nach dem Anreicherungsschritt werden die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für ihren Zellkern, fluoreszierende anti-CD45 Antikörper zur Differenzierung von Leukozyten und für die Zytokeratine (*Cytokeratin*, CK) 8, 18 und 19, welche spezifisch für Epithelzellen sind, gefärbt. Die Analyse der so aufbereiteten Zellen wird vom CellTracks Analyzer II durchgeführt, welcher die CTCs nach morphologischen Kriterien (rund oder oval und mit einem sichtbar angefärbten Zellkern innerhalb des Zytoplasmas) sowie CK positiv, DAPI positiv und CD45 negativ identifiziert [23, 53]. CTCs lassen sich also als CK positiv, CD45 negativ und DAPI positive Zellen definieren [54].

1.5 rVAR2

Die gängigen Anreicherungsverfahren benutzen epitheliale Marker wie EpCAM [21]. Da die Tumorzellen während ihrer Migration in die Blutgefäße der EMT unterliegen, ergibt sich das Problem eine große Subpopulation an CTCs nicht zu detektieren, nämlich diese, die nach EMT keine epithelialen Antigene mehr tragen. Diese Subpopulation wird häufig als die aggressivste beschrieben. Es wird also ein Marker gebraucht, welcher sowohl vor als auch nach der EMT auf den Zellen exprimiert wird und weiterhin nicht auf peripheren Blutzellen vorhanden ist [21, 55].

Bereits 1996 stellten M. Fried *et al.* fest, dass mit *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, infizierte Erythrozyten ausschließlich an Chondroitinsulfat A (CSA) binden, welches auf den Zellen der Plazenta zu finden ist. Dies lässt vermuten, dass ein bestimmter Chondroitinsulfat-Subtyp nur in der Plazenta exprimiert wird [56]. Chondroitinsulfate sind Polysaccharide, die sich als Modifikation auf Proteoglykanen befinden. Sie unterscheiden sich nach Stellung der Sulfatgruppe und der Abfolge der Disaccharideinheiten. Obwohl die Funktion des Plazenta-spezifischen Chondroitinsulfat nicht vollständig bekannt ist, wird angenommen, dass es mit der Fähigkeit der Trophoblasten assoziiert ist uterines Gewebe zu infiltrieren und schnelles Zellwachstum zu fördern [57, 58]. Im Jahr 2004 entdeckten Salanti *et al.*, dass ein Ankerprotein mit dem Namen *Variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A (VAR2CSA)* für die Bindung der infizierten Erythrozyten an den Synzytiotrophoblasten der Plazenta verantwortlich ist [59]. Da Proliferation und Invasion gleichermaßen Fähigkeiten von Tumorzellen sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tumorzellen einen ähnlichen Typ Chondroitinsulfat exprimieren wie Plazentazellen. Zur Bestätigung dieser These wurde ein rekombinantes VAR2CSA entworfen, das *recombinant Variant Surface antigen 2 (rVAR2)* [60]. Es konnte gezeigt werden, dass rVAR2 nur an plazentaähnliches Chondroitinsulfat bindet und nicht an gesunde Zellen verschiedener Gewebe. Des Weiteren konnte die Hypothese bestätigt werden, dass rVAR2 an Tumorzelllinienzellen epithelialer und mesenchymaler Herkunft bindet. Die Chondroitinsulfat-Glycoaminoglykan Ketten, welche auf den Proteoglykanen der extrazellulär Matrix vieler Tumorentitäten exprimiert werden, werden onkofetales Chondroitinsulfat genannt (ofCS) [60]. Clausen *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass onkofetale Chondroitinsulfatglykosaminoglykane eine entscheidende Rolle in der Tumorzellmotilität, durch Beeinflussung des Integrin-Signalwegs, spielen. ofCS kann auf über 30 verschiedenen Proteoglykanen nachgewiesen werden und ist nicht abhängig von der Expression eines einzelnen Proteins [60]. Auf dieser Grundlage konnten Salanti *et al.* bereits zeigen, dass die Bindung von rVAR2 an spezifische Chondroitinsulfate es ermöglicht tumortoxische Reagenzien spezifisch zu ofCS exprimierenden Tumorzellen zu bringen, welche diese dann internalisieren [57]. Die genannten Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die rVAR2-ofCS Bindung nicht nur als Therapieziel, sondern auch eine Möglichkeit der Tumorzellanreicherung aus Patientenblut darstellt. Agerbæk *et al.* zeigten die

Anreicherung von CTCs verschiedener Tumorentitäten wie Leber, Lunge, Pankreas und Prostata [61]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass ofCS sowohl auf epithelialen als auch mesenchymalen Tumorzellen vorhanden ist und nach der EMT erhalten bleibt. Die Anzahl der CTCs korrelierte mit dem Tumorstadium. Somit konnte gezeigt werden, dass rVAR2 ein weiteres Spektrum an CTCs binden kann als eine anti-EpCAM Antikörper-basierte Anreicherung. Das Protein rVAR2 stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, der Heterogenität der CTCs gerecht zu werden und ofCS ist eine hochspezifische Zielstruktur für die CTC-Anreicherung. Im Vergleich zu einer anti-EpCAM Antikörper-basierten Anreicherung konnten mittels rVAR2-ofCS Bindung mehr CTCs angereichert werden, darunter auch EpCAM-negative CTCs [61].

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist das Etablieren eines *Workflows* für eine EpCAM-unabhängige Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen. In Kooperation mit dem Zentrum für medizinische Parasitologie, der Abteilung für Immunologie und Mikrobiologie der Universität in Kopenhagen sollte für das Labor der Frauenheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ein reproduzierbarer *Workflow* mittels der rVAR2-ofCS Bindung etabliert werden. Es sollte die Grundlage geschaffen werden, um in weiteren Schritten ein breiteres Spektrum an Patienten-CTCs anreichern und isolieren zu können.

Im Rahmen dessen wurden für diese Doktorarbeit folgende Ziele definiert:

1. Bestimmung der Bindeaffinität von rVAR2 an Brustkrebszellen unabhängig von deren Subtyp
2. Darstellung der Bindeaffinität von rVAR2 an CTCs von Mammakarzinompatientinnen
3. Etablierung einer Anreicherungsmethode von Brustkrebszellen aus Blutproben mit der höchsten Wiederfindungsrate
4. Anreicherung von Brustkrebszellen unterschiedlichen Subtyps mittels etablierter Anreicherungsmethode

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Material

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

	Hersteller	Ort
IsoFlux™	Fluxion Biosciences	Almeda, USA
disc Magnet	Fluxion Biosciences	Almeda, USA
KingFisher®	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
CyAn™ ADP Analyzer	Beckmann Coulter	Brea, USA
Axioplan 2 imaging	Meta Systems	Heidelberg, Deutschland
CellCelector®	ALS	Jena, Deutschland
DM IRB	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda- Königshofen, Deutschland
Centrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Rotofix 32A	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
CellSearch®	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien
CellTracks Analyzer II®	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien
Thermocycler, peqSTAR	PEQLAB GmbH	Biotechnologie Erlangen, Deutschland
ChemiDoc™ Systems Imaging	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Thriller	PEQLAB GmbH	Biotechnologie Erlangen, Deutschland

Stuart Rotator SB3	Stuart	Staffordshire, Vereinigtes Königreich
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Shaker	Köttermann	Uetze, Deutschland
Protein LoBind Tubes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda- Königshofen, Deutschland
3-well slides	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Mikrotitrierplatte	Thermo Fisher Scientific	Waltham USA
KingFisher Mikrotitrierplatte	Thermo Fisher Scientific	Waltham USA
Teflon Slide	ALS	Jena, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Greiner	Solingen, Deutschland
CELLection™ Biotin Binder Dynabeads®	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dynabeads™ Biotin Binder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dynabeads™ M-450 Epoxy	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.2 Puffer, Reagenzien und Kits

Tabelle 2: Verwendete Puffer, Reagenzien und Kits

	Hersteller/ Zusammensetzung	Ort
BSA A7030	Merck	Darmstadt, Deutschland
Saponin	Merck	Darmstadt, Deutschland

Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich	Saint Louis, USA
EDTA	Merck	Darmstadt, Deutschland
EDTA-Röhrchen	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
CellSave Preservative Tubes	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien
Ampli1™ WGA Kit	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien
Ampli1™ QC Kit	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, Italien
PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Erythrozyten- Lyse-Puffer 1 mL enthält: Ammoniumchlorid 8,29 mg Kaliumhydrogencarbonat 1,0 mg Na-EDTA 0,0375 mg sonstige Inhaltsstoffe: Wasser für Injektionszwecke	Zentralapotheke	Düsseldorf, Deutschland
0.1M sodium phosphate Buffer (E1)	Sigma Alderich	Saint Louis, USA
E2	PBS mit 0.1% BSA und 2mM EDTA (pH 7.4)	
E3	E1 mit 0,6% BSA	
BB	0,5% BSA + 2mM EDTA in PBS (pH 7.4)	
PBS2	2% FCS in PBS	
Buffer 1	0,1% BSA in PBS	
Pierce™ Protein free blocking buffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PF10	10% Protein free blocking buffer in PBS	

2.1.3 Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Materialien für die Zellkultur und Zelllinien

	Hersteller	Ort
CELLSTAR Zellkulturflasche, 250mL, 75cm²	Greiner International GmbH	Bio-One Kremsmünster, Österreich
Falcon[™] konische Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RPMI Medium 1640 (1x) + 1% Penicillin- Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS-based	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
StemPro[™] Accutase[™] Cell Dissociation Reagent	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Trypsin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
MCF7	ATCC (Cat.No. HTB-22)	Manassas, USA
MDA-MB-231	ATCC (Cat.No. HTB-26)	Manassas, USA
A549	ATCC (Cat.No. CCL-185)	Manassas, USA
BT-474	ATCC (Cat.No. HTB-20)	Manassas, USA
SK-BR-3	ATCC (Cat.No. HTB-30)	Manassas, USA

2.1.4 Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 4: Verwendete Materialien zur Immunfluoreszenzfärbung

	Hersteller	Ort
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
CellTracker[™] Green CMFDA Dye	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dako Antibody Dilution	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA

Dako Wash Buffer 10x	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
Dako Protein Block, Serum-Free	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
Super PAP Pen Liquid Blocker	Daido Sangyo Co., Ltd.	Tokyo, Japan
NucBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes™ (Verdünnung 1:10)	Thermo Scientific	Fisher Waltham, USA
Anti-penta His Alexa Fluor 488 Antikörper (Verdünnung 1:500, Verdünnung 1:333,4)	Qiagen	Hilden, Deutschland
DAPI (Verdünnung 1:13,3)	Roche Diagnostics GmbH	Indiana, USA
Anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor 647 Antikörper (Verdünnung 1:16,7)	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Anti-PanCytokeratin (1,3,4,5,6,8,10,13,14,15,16,18,19) Antikörper, Mausklone C11/AE1/AE3 (Verdünnung 1:133,4)	AcZon S.r.l	Bologna, Italien

2.1.5 rVAR2

Die hier verwendeten Chargen des rekombinanten Proteins rVAR2 wurden vom Zentrum für Parasitologie, Immunologie und Mikrobiologie der Universität Kopenhagen zur Verfügung gestellt. rVAR2 wird aus *Escherichia coli* gewonnen, die eine Proteinfaltung mittels Disulfidbrücken möglich machen [62]. Die Epitop-Bindedomäne des VAR2CSA, DBL1-ID2a (rVAR2), mit unter anderem einem C-terminalen penta-His Tag als Antikörper-Bindestelle, wurde in ein Plasmid inseriert, welches in die *Escherichia coli* eschBakterien transformiert wurde. Das Protein wurde im Folgenden mittels Chromatographie aufgereinigt und nach Größe sortiert. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels Elektrophorese und Western Blot [61]. Das rekombinante Protein besitzt ein 12-amino-acids Peptid (SpyTag), welches eine kovalente Bindung zu dem sogenannten biotinyliertem SpyCatcher Protein (SpyC) eingehen kann. Durch dieses Verbindungsprotein kann rVAR2 an Biotin-bindende, magnetische *Beads* binden. Es wurden unterschiedliche Chargen des Proteins

rVAR2 durch die Kooperationspartner hergestellt. Aufgrund der Haltbarkeit und des Materialverbrauches wurden innerhalb dieser Doktorarbeit verschiedene Chargen des Proteins rVAR2 verwendet, wobei darauf geachtet wurde, dass innerhalb der Wiederholungen eines Experiments zur besseren Reproduzierbarkeit dieselbe Charge verwendet wurde.

Tabelle 5: Verwendete rVAR2 und SpyCatcher Proteine

Protein	ID	Größe (kDa)	Konzentration (mg/mL)	Hersteller	Ort
rVAR2	MP3242	121	3,8	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP2870	121	1,1	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP2923	121	0,67	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP3017	121	1,7	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP3425	71	2,43	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP3352	121	1,62	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP3643	121	1,9	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
rVAR2	MP3051	121	3	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
Spy Catcher	MP3168	13	0,5	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
Spy Catcher	MP2977	13	1,9	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark
Spy Catcher	MP3298	13	0,52	Var2 Pharmaceuticals	Kopenhagen, Dänemark

Legende: ID = Identifikationsnummer. kDA = Kilodalton. mg = Milligramm. mL = Milliliter

2.1.6 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

	Hersteller	Ort
ZEN 2 core	Zeiss	Jena, Deutschland
SummitTM Software System	Beckman Coulter	Brea, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.	San Diego, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenproben

Die verwendeten Patientenzellen stammen aus der AUGUSTA-Studie der Frauenklinik der Universitätsklinik Düsseldorf. Die Studie ist durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (Studiennummer 3430). Die Anonymität der Patientinnen ist gewahrt worden und der Datenschutz eingehalten. Die Patientinnen wurden über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt. In die Studie eingeschlossen wurden volljährige Patientinnen der Frauenklinik der Universitätsklinik mit metastasiertem Mammakarzinom. Die Blutentnahmen wurden von geschultem Personal durchgeführt und die Proben bei Entnahme in EDTA und CellSave Röhrchen überführt. In dieser Arbeit wurden Proben von fünf Mammakarzinompatientinnen verwendet. Die Patientinnen waren zwischen 35 und 77 Jahre alt (Mittelwert: 51 Jahre und Median: 52 Jahre).

2.2.2 Zelllinien

Die Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, SK-BR-3, MCF7 und BT-474 sowie die Lungenkrebszelllinie A549 wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) erworben. MDA-MB-231 Zelllinienzellen wurden aus einem triple-negativen Adenokarzinom einer 51-jährigen kaukasischen Frau gewonnen [63]. SK-BR-3 Zelllinienzellen stammen von dem Adenokarzinom einer 43-jährigen kaukasischen Frau und exprimieren vermehrt HER2 [63]. MCF7 Zelllinienzellen wurden aus dem Adenokarzinom einer 69-jährigen Frau isoliert und entsprechen dem Subtyp Luminal A [63]. BT-474 Zellen wurden aus einem duktalem Karzinom einer 60-jährigen kaukasischen Frau gewonnen und entsprechen dem Subtyp Luminal B [63]. Die Zelllinienzellen A549 wurden isoliert aus der Lunge eines

58 Jahre alten kaukasischem Mann [63]. Diese Zelllinie dient als Referenzzelllinie, da diese bereits durch die Kooperationspartner in Kopenhagen verwendet wurde und sich als gut rVAR2-bindend herausgestellt hat [64].

2.2.3 Kulturbedingungen

MDA-MB-231, SK-BR-3, MCF7 und BT-474 wurden in dem Zellkulturmedium RPMI 1640 L-glutamin mit 1% Penicillin-Streptomycin und zusätzlich 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) kultiviert. Die Zelllinie A549 wurde in RPMI 1640 L-glutamin mit 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert mit 15 % FCS. Alle Zelllinien wurden bei 37°C in befeuchteter Luft mit 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Die Zellen werden in Einfrier-Medium, bestehend aus 50 % Zellkulturmedium, 40 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid, konserviert. Das Zellpellet wird im Einfrier-Medium resuspendiert und in ein 2 mL Kryo-Röhrchen überführt. Zum langsamen Einfrieren werden die Zellen zunächst für 24 h in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß bei -80°C gelagert. Danach wird das Kryoröhrchen in einem Stickstofftank bei -152°C gelagert.

Um eingefrorene Zelllinien zu rekultivieren wurden die Kryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wird die Zellsuspension in 15 mL-Falcon Röhrchen überführt und unter Schwenken tropfenweise 2 mL Medium hinzugegeben. Die Medium-Zellsuspension wird mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 6 mL verdünnt. Das Falcon Röhrchen mit der Medium-Zellsuspension wird in der Zentrifuge 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Daraufhin kann der Überstand abgenommen, das Pellet in 12 mL Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden.

2.2.5 Kultivieren, Ablösen und Auszählen von Zellen

Für das Ablösen von Zellen wurde zuerst das Kulturmedium, der in Kultur genommenen adhärennten Zelllinienzellen, abgenommen, mit 5 mL phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, das PBS abgenommen und daraufhin mit 2 mL *Cell Dissociation Buffer* vom Boden der Zellkulturflasche 15 min bei Raumtemperatur (RT) abgelöst. Zum Ablösen der Zellen mit anderen Zelldissoziationsreagenzien werden unter anderem 2 mL Accutase (Inkubation für 5 min bei 37°C) und 2 mL Trypsin (Inkubation für 5 min bei

37°C) verwendet. Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640 mit L-glutamin mit 1 % Penicillin-Streptomycin sowie 10 % oder 15 % FCS je nach Zelllinie, wurde in die Zellkulturflasche überführt, die Zellen resuspendiert und so viele mL Zellsuspension wie benötigt in 50 mL-Falcon Röhrchen pipettiert. Das Falcon Röhrchen wurde bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert und der Medium- und *Cell Dissociation Buffer*-Überstand abgenommen und in PBS zur weiteren Verwendung resuspendiert. Die in der Zellkulturflasche verbleibende Zellsuspension wurde erneut mit Kulturmedium auf 12 mL aufgefüllt. Zur Auszählung mittels Neubauer Zählkammer werden 8 µL der Zellsuspension verwendet. Die Zählkammer besteht aus zwei Zählnetzen für zwei mögliche Proben. Jedes Zählnetz besteht aus vier Quadraten, die jeweils in 16 Quadrate unterteilt sind. Alle Zellen in den 64 kleinen Quadraten wurden ausgezählt. Um herauszufinden wie viel µL Zellsuspension einer bestimmten Anzahl an Zellen entspricht, wurde folgende Rechnung aufgestellt wobei x definiert ist als das nötige Volumen in mL.

$$\frac{\text{ausgezählte Zellen} * 10^4}{4} = y \quad \frac{\text{gewünschte Zellzahl} * 10^{-4} * 10^4}{y * 10^4} = x$$

2.2.6 Fluoreszenzmarkierung

Um die Bindung des Proteins rVAR2 an die Tumorzelllinienzellen mikroskopisch darzustellen sowie mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren, werden die Zelllinienzellen, welche rVAR2 gebunden haben, mittels fluoreszierendem Antikörper gefärbt. Das Protokoll zur Fluoreszenzfärbung wurde in Anlehnung an Agerbæk *et al.* und Sand *et al.* erstellt [61, 64].

Die benötigten Zelllinienzellen wurden bis zu einer Dichte von circa 80 % im jeweiligen Medium kultiviert und mittels *Cell Dissociation Buffer* nach oben beschriebenem Prinzip (2.2.5) abgelöst. Ungefähr 200.000 Zellen wurden jeweils mit unterschiedlicher Konzentration rVAR2 (12,5 nM bis 400 nM) für die Durchflusszytometrie sowie mit 400 nM rVAR2 für die Mikroskopie in PBS mit 2 % FCS (PBS2) für 30 min bei 4°C und 300 rpm auf dem Thriller inkubiert. Nachfolgend zweier Waschschriffe mittels PBS2 wurden die Zellen erneut bei 4°C für 30 min auf dem Thriller bei 300 rpm mit 100 µL eines verdünnten anti-penta His Alexa Fluor 488 Antikörper (1:500 verdünnt in PBS2) inkubiert. Erneut folgen zwei Waschschriffe mit PBS2, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zuletzt werden die gefärbten Zellen in 100 µL PBS2 resuspendiert.

Zur Mikroskopie wurden die in Suspension gefärbten Zellen auf Objektträger transferiert. Mittels Zytocentrifuge wurde der Überstand abzentrifugiert und die Zellen auf den Objektträgern gehalten. Zuletzt wurden neun Tropfen *Mounting Medium* und ein Tropfen *NucBlue* mittels Pipette gemischt und 50 μL zu jedem Objektträger hinzugefügt. Durch das *NucBlue* konnte so der Zellkern in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar werden.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie konnte die Bindeaffinität des Proteins rVAR2 unter verschiedenen Bedingungen getestet werden. rVAR2, das sich an die Zelllinienzellen und Patienten-CTCs bindet, besitzt einen penta-His Tag an den ein anti-penta His Antikörper binden kann (2.2.6). Somit kann die Bindung des rVAR2 an die Tumorzellen quantifiziert werden. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 2 und 3 stellen ein exemplarisches Gating dar.

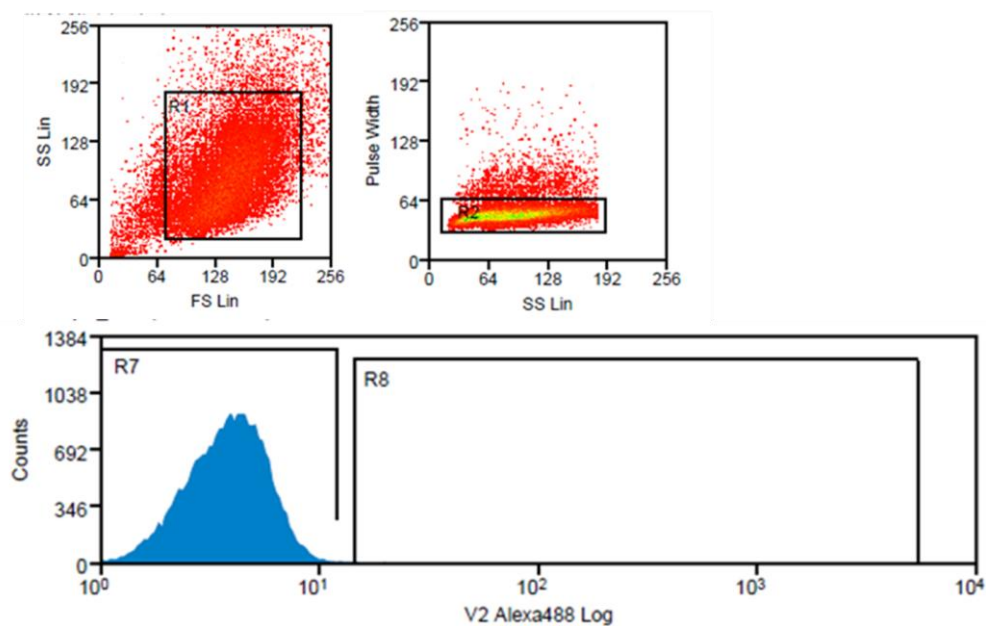


Abb. 2: Gating der Experimente der Durchflusszytometrie (ungefärbt)

Exemplarisches Gating für ungefärbte Zellen. R1 umfasst die zu analysierenden Zellen. Die x-Achse zeigt das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter Linear scale*, FS Lin) und die y-Achse das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter Linear scale*, SS Lin). R2 umfasst die Einzelzellen. Die x-Achse zeigt hier das Seitwärtsstreulicht und y-Achse die Pulsweite (*Pulse width*). R7 und R8 umfassen die analysierten Zellen und zeigen deren Farbintensität. Die x-Achse zeigt den Marker auf einer logarithmischen Skalierung, welcher mit dem fluoreszierenden Antikörper Alexa Fluor 488 angefärbt wurde (V2 Alexa488 Log) und die y-Achse zeigt die Zellzahl (*Counts*).

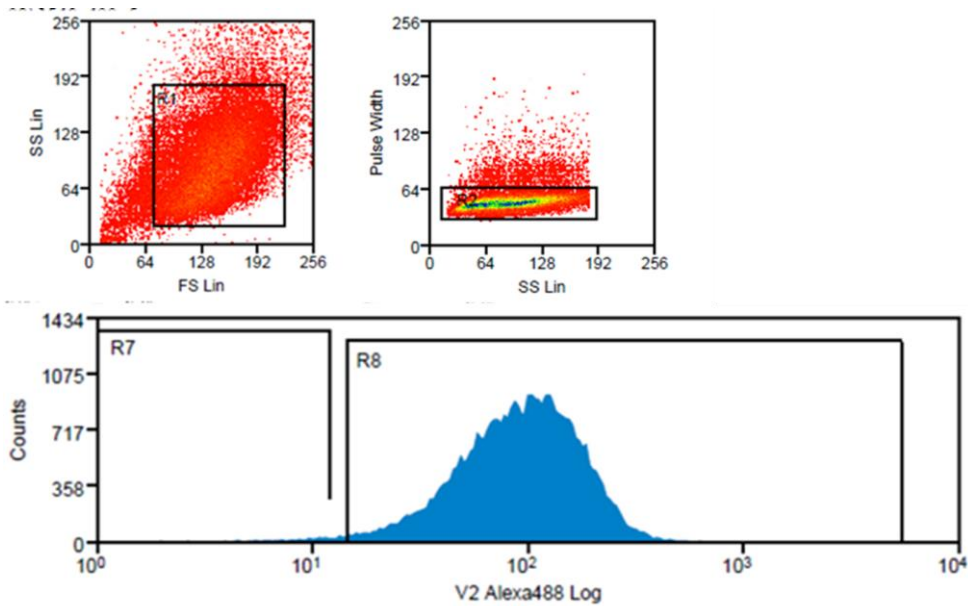


Abb. 3: Gating der Experimente der Durchflusszytometrie (gefärbt)

Exemplarisches Gating für gefärbte Zellen. R1 umfasst die zu analysierenden Zellen. Die x-Achse zeigt das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter Linear scale*, FS Lin) und die y-Achse das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter Linear scale*, SS Lin). R2 umfasst die Einzelzellen. Die x-Achse zeigt hier das Seitwärtsstreulicht und y-Achse die Pulsweite (*Pulse width*). R7 und R8 umfassen die analysierten Zellen und zeigen deren Farbintensität. Die x-Achse zeigt den Marker auf einer logarithmischen Skalierung, welcher mit dem fluoreszierenden Antikörper Alexa Fluor 488 angefärbt wurde (V2 Alexa488 Log) und die y-Achse zeigt die Zellzahl (*Counts*).

2.2.8 Einfluss von CellSave

Da die CellSave Röhren die Blutgerinnung verhindern sowie durch das enthaltene Fixans die Zellmorphologie und Zelloberfläche erhalten, werden sie bevorzugt zur Blutabnahme und später Versendung von CTCs genutzt [65]. Um den Einfluss des CellSave auf die rVAR2-Bindung zu bestimmen, wurden A549 Zelllinienzellen jeweils für 1 h sowie 24 h in den CellSave Röhren belassen und die Affinität des rVAR2 an die Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Die in Kultur genommenen adhärennten A549 Zelllinienzellen wurden, wie beschrieben, mittels *Cell Dissociation Buffer* abgelöst und die 10 mL Medium-Zellsuspension in 15 mL-Falcon Röhren pipettiert. 8 µL der Medium-Zellsuspension wurden zur Auszählung mittels Neubauer Zählkammer verwendet. Ungefähr 400×10^4 Zellen pro mL wurden in zwei neuen Zellkulturflaschen ausgesät, die Zellkulturflasche auf insgesamt 12 mL Medium-Zellsuspension mit Kulturmedium aufgefüllt und für 24 h kultiviert.

Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen aus beiden Zellkulturflaschen nach genanntem Prinzip geerntet. Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden nach der

Ernte in ein 15 mL-Falcon Röhrchen pipettiert, das Röhrchen bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 9 mL PBS resuspendiert. Die PBS-Zellsuspension wurde dann zum weiteren Verbleib für 24 h in ein CellSave Röhrchen überführt. Die Zellen der anderen Kulturflasche wurden erneut gezählt und ungefähr 400×10^4 Zellen pro mL wurden in zwei neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Nach 24 h wurden die Zellen der verbleibenden beiden Zellkulturflaschen nach genanntem Prinzip geerntet. Die Zellen einer Kulturflasche wurden nach Zentrifugation und Resuspension für eine Stunde in ein CellSave Röhrchen überführt. Die Zellen der anderen Kulturflasche wurden ebenfalls zentrifugiert, resuspendiert und direkt weiterverwendet.

Es wurden je 200.000 A549 Zellen der unterschiedlichen Bedingungen fluoreszenzmarkiert und das Bindeverhalten von rVAR2 an die unterschiedlich gelagerten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.2.6, 2.2.7).

2.2.9 Einfluss verschiedener Ablösepuffer

Es wurden drei verschiedene Zelldissoziationspuffer getestet und die Affinität des rVAR2 an die verschieden abgelösten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Drei Zellkulturflaschen mit kultivierten A549 Zelllinienzellen wurden verwendet und nach dem oben beschriebenen Prinzip mittels der drei verwendeten Ablösepuffer gelöst. Verwendet wurden *Cell Dissociation Buffer*, Accutase und Trypsin. Zum Ablösen der Zellen mittels Accutase und 0,05% Trypsin müssen die Zellkulturflaschen für 5 min bei 37°C inkubiert werden.

Es wurden je 200.000 A549 Zellen wie oben beschrieben fluoreszenzmarkiert und das Bindeverhalten von rVAR2 an die unterschiedlich abgelösten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.2.6,2.2.7).

2.2.10 Bindung der *Beads* an Tumorzellen

Zunächst soll gezeigt werden, dass die *Beads*, welche zur Anreicherung verwendet werden, keine unspezifisch Bindung ohne rVAR2 mit den Tumorzellen eingehen.

Kultivierte A549 Zellen werden geerntet und in ein 15 mL-Falcon Röhrchen überführt. 8 µL der Medium-Zellsuspension wurden zur Auszählung mittels

Neubauer Zählkammer verwendet und ungefähr 5.000 A549 Zellen in 100 μ L Medium-Zellsuspension in sechs *Wells* einer 96-*Well* Mikrotitrierplatte pipettiert. Danach wird die Mikrotitrierplatte für 24 h bei 37°C Grad in befeuchteter Luft mit 5 % CO₂ inkubiert, sodass die Zellen anwachsen können.

Es werden zwei *Protein LoBind Tubes* mit je 25 μ L Dynabeads M-450 Epoxy angesetzt. Mittels eines gehaltenen Magneten werden die *Beads* am Rand des Gefäßes gesammelt und die Flüssigkeit abgenommen. Die *Beads* werden zwei Mal in 1 mL E1 Puffer resuspendiert und gewaschen. Daraufhin wird 30 μ L einer rVAR2 in E1 Verdünnung im Verhältnis 3 μ g rVAR2 in 30 μ L E1 angesetzt. Anschließend an den letzten Waschschrift der *Beads* wird der E1 Puffer abgenommen und bei einem der beiden Reaktionsgefäße 25 μ L der rVAR2-Suspension zu den *Beads* pipettiert. Zu dem anderen Gefäß werden lediglich 25 μ L E1 Puffer pipettiert. Nach 15 min werden 5 μ L E3 Puffer hinzupipettiert. Die in den zwei Reaktionsgefäßen angesetzten *Beads* werden anschließend bei RT über 1 h inkubiert. Damit die *Beads* sich nicht am Boden des Mikroreaktionsgefäßes absetzen, werden sie durch leichtes Tippen alle 5 min aufgewirbelt. Nach der einstündigen Inkubationszeit schließen sich drei Waschschriffe an, in denen die *Beads* mittels Magneten erneut am Rand des Mikroreaktionsgefäßes gesammelt werden und der Überstand abpipettiert und die *Beads* mit 25 μ L E2 Puffer resuspendiert werden. Nach jeweils 5 min Inkubationszeit werden die *Beads* erneut gewaschen.

Das Medium wird aus den sechs *Wells* abgenommen und mit frischem 100 μ L 10 % FCS-haltigen Kulturmedium ersetzen. Die 96-*Well* Mikrotitrierplatte wird für 20 min bei 37°C in befeuchteter Luft mit 5 % CO₂ inkubiert. Danach wird der Überstand in allen sechs *Wells* abgenommen. 1 μ L der *Beads*, die mit E1 inkubiert wurden, werden nun in 100 μ L Kulturmedium verdünnt und in *Well* A1, A2 und A3 gegeben. 1 μ L der *Beads*, die mit rVAR2 inkubiert wurden, werden nun in 100 μ L Medium verdünnt und in *Well* B1, B2 und B3 gegeben. Die 96-*Well* Mikrotitrierplatte wird für 30 min bei 37°C in befeuchteter Luft mit 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend werden die *Wells* gewaschen, indem der Überstand abgenommen und jedes *Well* mit 100 μ L Kulturmedium aufgefüllt wird. Die 96-*Well* Mikrotitrierplatte wird für 3 min auf eine *Shaker* gestellt. Der beschriebene Waschschrift wird wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift werden 1 mL Medium mit einem Tropfen *NucBlue* angesetzt,

gemischt und 100 μL zu jedem der 6 *Wells* hinzugegeben. Die Auswertung erfolgt mittels CellCelector.

2.2.11 Vorbereitung der *Beads* zur Anreicherung

Für die Anreicherung von Tumorzelllinienzellen wurden *Beads* mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet.

Die Dynabeads M-450 Epoxy sind 4,5 μm große magnetische Mikrokugeln, die mit Epoxidgruppen beschichtet sind. An die Oberfläche der *Beads* können Antikörper oder Proteine zur Anreicherung nach Inkubation kovalent gebunden werden [66]. Die CELLection Biotin Binder Dynabeads sind 4,5 μm große, hydrophile magnetische Mikrokugeln, die mit rekombinantem Streptavidin beschichtet sind. Biotinylierte Antikörper oder Proteine können so an die Oberfläche der *Beads* binden [67]. Die Dynabeads Biotin Binder sind 2,8 μm große, hydrophobe magnetische Kügelchen, die biotinylierte Liganden binden und ebenfalls mit Streptavidin beschichtet sind [68].

Die Methodik zur Aufbereitung und Beschichtung der *Beads* mit dem Protein rVAR2 wurde modifiziert nach den Protokollen von Agerbæk *et al.* [61]. Zur Anreicherung von Tumorzellen mittels rVAR2 muss dieses zuerst an die *Beads* gebunden werden (direkte Methode) oder die Zellen werden zuerst mit dem Protein inkubiert und die *Beads* nachträglich hinzugegeben (indirekte Methode).

Zunächst wird die Beschichtung der Dynabeads M-450 Epoxy mit rVAR2 erläutert. Tumorzelllinienzellen wurden mit diesen *Beads* nur mittels direkter Methode angereichert.

25 μL Dynabeads M-450 Epoxy werden in einen *Protein LoBind Tube* pipettiert. Mittels eines Magneten werden die *Beads* an der Gefäßwand gesammelt und die Flüssigkeit abgenommen in der die *Beads* suspendiert waren. Um die *Beads* zu waschen, wird 1 mL E1 Puffer hinzupipettiert und die *Beads* mit dem Magneten durch die Flüssigkeit gezogen. Der Waschschrift wird wiederholt. Das Protein rVAR2 wird in einem neuen *Protein LoBind Tube* im Verhältnis 3 μg rVAR2 in 30 μL E1 in E1 resuspendiert und 25 μL zu dem *Protein LoBind Tube* mit den *Beads* gegeben. rVAR2 und *Beads* werden durch vorsichtiges Tippen resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Danach wird 5 μL E3 Puffer hinzugegeben und alles eine Stunde bei RT inkubiert. Das Mikroreaktionsgefäß muss alle 5 min angetippt werden

zur besseren Mischung der *Beads* in rVAR2. Zuletzt werden 4,5 μL *Beads* zur Probe hinzugegeben.

Desweiteren wird die Präparation der CELlection Biotin Binder Dynabeads sowie der Dynabeads Biotin Binder für die direkte und indirekte Methode erläutert.

Zuerst wird ein Mix aus *SpyTagged* rVAR2 mit biotinyliertem SpyC im Verhältnis 1,2:1 angesetzt und eine Stunde bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit werden 25 μL der CELlection Biotin Binder Dynabeads bzw. 40 μL Dynabeads Biotin Binder in einen *Protein LoBind Tube* pipettiert. Mittels eines Magneten werden die *Beads* an der Gefäßwand gesammelt und die Flüssigkeit abgenommen in der die *Beads* suspendiert waren. Um die *Beads* zu waschen wird 1 mL *Protein free blocking buffer* (PF) hinzupipettiert und die *Beads* mit dem Magneten durch die Flüssigkeit gezogen. Der Waschschrift wird wiederholt und die *Beads* in 25 μL bzw. 40 μL PF resuspendiert.

Für die direkte Anreicherungs-methode wird der *Bead*-rVAR2 Mix für 30 min bei RT inkubiert, sodass 0,47 μg biotinyliertes Protein pro μL *Bead*-Suspension bindet. Danach werden die *Beads* mittels Magneten am Rand des Mikroreaktionsgefäßes gesammelt und der Überstand abpipettiert. Um die *Beads* zu waschen und das nicht gebundene rVAR2 zu entfernen, wird 1 mL PF hinzupipettiert und die *Beads* mit dem Magneten durch die Flüssigkeit gezogen. Der Waschschrift wird zwei Mal wiederholt und die *Beads* in 25 μL bzw. 40 μL PF resuspendiert. Von der *Bead*-Suspension werden 4,5 μL CELlection Biotin Binder Dynabeads bzw. 30 μL (6,3 μL) Dynabeads Biotin Binder zu der Probe hinzugefügt. Die Probe mit den *Beads* wird für 30 min bei 4°C auf einem 360° Rotator inkubiert.

Für die indirekte Methode muss eine Konzentration von 200 nM rVAR2 in 600 μL Zellsuspension erreicht werden. Das *SpyTagged* rVAR2 wird mit dem biotinylierten SpyC Protein in einem Verhältnis 1,2:1 angesetzt. Dies wird 30 min bei 4°C auf einem 360° Rotator inkubiert. Danach wird die Zell-Protein Suspension gewaschen, um eine unspezifische Bindung der *Beads* an überschüssigem rVAR2 zu verhindern. Das Mikroreaktionsgefäß wird 8 min bei 300 g bei 4°C zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und die Probe in 600 μL proteinfreiem Blockierpuffer 10 % in PBS (PF10) resuspendiert. Der Waschschrift wird zwei Mal wiederholt. Daraufhin werden der Probe die gewaschenen *Beads*, wie oben beschrieben, hinzugefügt. 4,5 μL CELlection Biotin Binder Dynabeads bzw. 30 μL

(6,3 μL /60 μL) Dynabeads Biotin Binder werden der Probe hinzugefügt. Die Probe mit den *Beads* wird für 30 min bei 4°C auf einem 360° Rotator inkubiert.

Zur direkten und indirekten Methode wurden mit den Dynabeads Biotin Binder zwei weitere Anreicherungsverfahren getestet. Die doppelt indirekte und die semi-indirekte Methode.

Bei der doppelt indirekten Methode wurde ebenso eine Konzentration von 200 nM rVAR2 in 600 μL Zellsuspension erreicht. Daraufhin erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 4°C auf einem 360° Rotator. Danach schließt sich ein Waschschriff an. Die Zellprobe wird 8 min bei 350 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen und die Probe in 600 μL PF10 resuspendiert. Der Waschschriff wird zwei Mal wiederholt. Erst zu diesem Zeitpunkt wird das SpyC Protein zur Zellprobe mit dem bereits gebundenen rVAR2 hinzugegeben, ebenfalls im Verhältnis 1,2:1 von rVAR2 zu SpyC. Es folgt eine 60-minütige Inkubation bei 4°C im 360° Rotator. Anschließend erfolgen zwei Waschschriffe wie oben beschrieben. Zu der Probe werden 30 μL Dynabeads Biotin Binder hinzugegeben.

Für die semi-indirekte Methode wird zu einer 600 μL Zellsuspension rVAR2 hinzugegeben, sodass ebenfalls eine Konzentration von 200 nM rVAR2 erreicht wird. Daraufhin folgt eine 30-minütige Inkubation bei 4°C im 360° Rotator. Währenddessen werden Dynabeads Biotin Binder zunächst wie bereits oben beschrieben gewaschen und mit dem SpyC für 30 min bei RT inkubiert. Das Verhältnis 1,2:1 zwischen rVAR2 und SpyC Protein bleibt erhalten. Daraufhin werden die *Beads* wie oben beschreiben erneut gewaschen. Von der *Bead-SpyC* Suspension werden 30 μL zu den mit rVAR2 gebundenen Zellen gegeben. Daraufhin erfolgt ebenfalls wie bereits geschrieben eine erneute 30-minütige Inkubation.

2.2.12 Aufbereitung der Blutprobe durch Erythrozytenlyse

Im Verhältnis 1:10 (Blutprobe zu Lysepuffer) wird zunächst der Erythrozytenlysepuffer in ein 50 mL-Falcon Röhrchen überführt. In dieser Doktorarbeit wurden für alle *Spike-in* Experimente 5 mL Spenderblut aus EDTA-Röhrchen verwendet. Das Blut wird mit einer Stripette in das Zentrifugenröhrchen pipettiert, diese wird daraufhin mit ein wenig zuvor zur Seite genommenem Lysepuffer gewaschen, welcher ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen pipettiert wird. Blut und Lysepuffer werden für circa 10 min inkubiert, bis die Lyse der Erythrozyten

erreicht ist und die Flüssigkeit sichtbar transparenter wird. Das Zentrifugenröhrchen wird bei 400 g für 8 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 6 mL PBS resuspendiert. Das Zentrifugenröhrchen wird erneut bei 400 g für 8 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 500 µL PBS2 (Dynabeads M-450 Epoxy) bzw. PF10 (Dynabeads Biotin Binder, CELLection Biotin Binder Dynabeads) resuspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Pipettenspitze und das Zentrifugenröhrchen werden mit 100 µL PBS2 bzw. PF10 gewaschen und zu dem Mikroreaktionsgefäß hinzupipettiert.

2.2.13 CellTracker Green Färbung

Um das Ergebnis einer Anreicherungsmethode nicht durch Zellverlust im anschließenden Färbeschritt zu beeinflussen, können lebende Zellen im Vorhinein angefärbt werden. Die zu färbenden Tumorzelllinienzellen werden, wie oben beschrieben, geerntet. Zu 1 mL Zellsuspension wird 1 µL *CellTracker Green CMFDA Dye* hinzugegeben. Die Zellen werden bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach werden die Zellen 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wird anschließend in 1 mL PBS resuspendiert. Die Zellen werden erneut 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wird in 1 mL PBS resuspendiert und für die weitere Verwendung lichtgeschützt auf Eis gestellt.

2.2.14 Anreicherung mittels IsoFlux

Die mikrofluidischen Kartuschen bestehen aus drei Reservoirs, als *Well* bezeichnet, die alle miteinander durch einen sich am Boden der Kartusche befindenden Kanal verbunden sind. Die zu prozessierende Probe wird in den Einlass geladen. Die Zellen fließen daraufhin an der Isolationszone vorbei, wo die an *Beads* gebundenen Zellen durch einen externen Magneten angereichert werden. Die verbleibenden Zellen werden in einem zweiten Reservoir gesammelt. Nach der Probenprozessierung wird ein Waschpuffer durch den Kanal geleitet. Die Isolationszone besteht aus einem Hohlraum, dessen Dach aus einer Scheibe besteht, auf der die Zellen angereichert werden [49].

Für die Anreicherung wurde das *Standard Isolation Protocol Rev2* ausgewählt. Das erste *Well*, in welches die Probe pipettiert wird, wird zuvor mit 1 mL FCS für 30 min inkubiert und das FCS danach wieder abpipettiert, um das *Well* zu beschichten

damit die *Beads* nicht an der Wand des *Wells* hängen bleiben. In das zweite Well wird 3 mL E2 (Dynabeads M-450 Epoxy) bzw. PF10 (Dynabeads Biotin Binder, CELLection Biotin Binder Dynabeads) als Waschpuffer geladen. Die so angereicherten *Bead*-gebundenen Zellen werden mit zwei Mal 50 µL PBS2 (Dynabeads M-450 Epoxy) bzw. PF10 (Dynabeads Biotin Binder, CELLection Biotin Binder Dynabeads) resuspendiert und auf einen Objektträger zur weiteren Analyse überführt.

2.2.15 Anreicherung mittels KingFisher

Die *Bead*-gebundenen Zellen werden in 600 µL PF10 suspendiert (bzw. PBS2 für die Dynabeads M-450 Epoxy) und in die *Microtiter DeepWell 96 Plate* des KingFishers geladen. Mit 100 µL PF10 Puffer (bzw. PBS2 für die Dynabeads M-450 Epoxy) wird der *Protein LoBind Tube* gespült und zu der zugehörigen Probe pipettiert. Es werden 600 µL des Waschpuffers PF10 (bzw. PBS2 für die Dynabeads M-450 Epoxy) ebenfalls in die *Well*-Platte geladen. Die Anreicherung erfolgte nach einem zuvor erstellten Protokoll. Die Probe wird in einem erste Schritt über 80 s langsam gemischt und über 30 s an die Magnetstäbe des KingFishers gebunden. Der zweite Schritt besteht aus einem Waschschrift. Die *Beads* werden freigegeben und die Probe wird über 90 s in einem nächsten *Well* langsam gewaschen. Über 30 s werden die *Beads* erneut an die Magnetstäbe gebunden. Daraufhin werden die *Beads* in einem weiteren *Well* in 100 µL PF10 (bzw. PBS2 für die Dynabeads M-450 Epoxy) über 180 s langsam freigegeben und für 10 s mit dem Puffer gemischt. Zuletzt können die 100 µL der angereicherten Zellprobe auf *3-well slides* transferiert werden.

2.2.16 Anreicherung von Tumorzellen (*Spike-in* Experimente)

Das Ziel ist es einen stabilen *Workflow* zu etablieren. Daher wurden zunächst Zelllinienzellen unter geplanten Bedingungen mittels rVAR2 angereichert, um die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit dieser Anreicherungsart zu testen.

Für das Experiment zum Vergleich der unterschiedlichen Anreicherungsart mittels IsoFlux und KingFisher wurden A549 Zelllinienzellen verwendet, welche nach oben beschriebenem Prinzip mittels *Cell Dissociation Buffer* abgelöst wurden (2.2.5). Daraufhin wurden die Tumorzelllinienzellen mittels *CellTracker Green* nach beschriebenen Protokoll gefärbt (2.2.13). Es wurden jeweils 500 Tumorzelllinienzellen zu den mittels Erythrozytenlyse gewonnen Zellpellet an

PBMCs hinzugefügt. Danach wurden die Zellen mittels der verschiedenen Anreicherungsverfahren (direkt, indirekt, doppelt indirekt, semi-indirekt) und unterschiedlichen *Beads* mit dem IsoFlux oder KingFisher angereichert. Für die *Spike-in* Experimente wurde der Mittelwert aus drei Auszählungen der vorgefärbten Tumorzellen als 100 % Referenz bestimmt.

Für die weiteren Experimente zur Etablierung eines *Workflows* mit der höchsten Wiederfindungsrate wurden in dem oben beschriebenen Ablauf der *Bead*-Präparation Schritte modifiziert (2.2.11). Es wurde für die folgenden Experimente der Versuchsaufbau mittels der indirekten Anreicherungsverfahren mit 30 µL Dynabeads Biotin Binder und dem KingFisher gewählt.

Für das Experiment zum Vergleich der unterschiedlichen rVAR2 Proteine wurde das rVAR2 Protein ID1-ID2a (71kDa) verwendet anstelle des DBL1-ID2a (121kDa) rVAR2 Protein. Das Verhältnis 1,2:1 vom *Spytagged* rVAR2 mit dem biotinyliertem SpyC blieb erhalten.

Weiterhin wurden unterschiedliche SpyC-rVAR2 Verhältnisse verglichen. Das *Spytagged* rVAR2 mit dem biotinylierten SpyC wurde, bevor es wie oben beschrieben der Zellsuspension hinzugefügt wurde, in einem Verhältnis von 1,4:1, 1:1 und 1: 1,2 angesetzt und 30 min bei 4°C im 360° Rotator inkubiert. Dabei blieb die 200 nM Konzentration des rVAR2 in 600 µL Zellsuspension erhalten.

Für die Anreicherung der unterschiedlichen Zelllinienzellen wurden die Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB-231, SK-BR-3, MCF7 und BT-474 mittels *Cell Dissociation Buffer* vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Es wurden jeweils 500 Zellen mittels *CellTracker Green* angefärbt und zu den mittels Erythrozytenlyse gewonnen Zellpellet an PBMCs hinzugefügt.

2.2.17 Färbung Patientenzellen in Suspension mittels rVAR2

Für eine spätere Anreicherung von CTCs von Mammakarzinompatientinnen ist es wichtig sicherzustellen, dass rVAR2 an diese bindet. Mittels *CellTracks AutoPrep system* des CellSearch wird zunächst ein Profil an EpCAM positiven CTCs erstellt.

Zuerst wird Saponin in den Konzentrationen 1 %, 0,15 % und 0,05 %, angesetzt, um die Zellen für die Zytokeratinfärbung zu permeabilisieren. Die Zellen aus dem Profil werden bei 8°C, 500 rcf, 8 min lang zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 µL rVAR2 mit der Konzentration 200 nM

resuspendiert. Die Zellsuspension wird daraufhin für 30 min bei 4°C und 300 rpm im Thriller inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben mit PBS2 auf 1 mL aufgefüllt, bei 8°C, 500 rcf, 8 min lang zentrifugiert und erneut in 1 mL PBS2 resuspendiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Nachdem zuletzt der Überstand abgenommen wird, werden die Zellen in 50 µL 0,15 %igem Saponin für 15 min inkubiert. Währenddessen wird der Antikörpermix angesetzt, bestehend aus dem Pancytokeratin Antikörper (1:133,4), anti-penta His Alexa Fluor 488 (1: 333,4), Anti-CD45-AF647 (1:16,7) und DAPI (1:13,3),. Zu jeder Probe wird 100 µL Antikörpermix hinzugegeben und bei 4°C bei 300 rpm im Thriller für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben mit Saponin 0,05 % in PBS2 auf 1mL aufgefüllt, bei 8°C, 500 rcf, 8 min lang zentrifugiert und erneut in 1mL PBS2 resuspendiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Nachdem zuletzt der Überstand abgenommen wird, wird das Zellpellet in 200 µL PBS2 resuspendiert. Die Proben werden auf teflonbeschichtete Objektträger geladen und die Zellen mittels CellCelector isoliert.

2.2.18 Isolation von Einzelzellen mittels CellCelector

Der CellCelector wurde verwendet zur Isolation von Einzelzellen sowie zur manuellen Auswertung der Isolationsexperimente. Er besteht aus einem invertiertem Mikroskop (CRX41, Olympus) mit einem CCD Kamerasystem (XM10-IR, Olympus), einem Arm, einer Glaskapillare zur Aspiration der Zelle und einer automatisierten Plattform für die Ablage von Objektträgern und Mikroreagenzgefäßen [69].

Die Auszählung der angereicherten Tumorzellen in den *Spike-in* Experimenten erfolgte manuell. Durch die *CellTracker Green* Färbung der Tumorzellen konnten diese unter dem Mikroskop im Fluoreszenzkanal FITC (Fluoresceinisothiocyanat) als solche wiedererkannt werden.

Für die Zellisolation konnten die Zellen, welche in den Fluoreszenzkanälen Cy5 (Cyanin 5) für CD45 negativ, FITC für das fluoreszenzmarkierte rVAR2 positiv, DAPI für den Zellkern positiv, TRITC (Tetramethylrhodamine) für CK positiv waren, als Tumorzelle definiert werden. Die CTCs konnten während der manuellen Auswertung für den weiteren Isolationsvorgang markiert werden. Zunächst wurde 9 µL PBS von der Glaskapillare aufgenommen. Daraufhin erfolgte die Aspiration der Tumorzelle in einem Volumen von 20-100 nL. Die isolierte Tumorzelle wurde mit 9 µL PBS zur Spülung in einem PCR-Röhrchen überführt. Die Probe wurde für 5 min

bei 370 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 µL abgenommen und für weitere molekulare Analysen bei -80°C eingefroren.

2.2.19 Whole Genome Amplification, Qualitätskontrolle und Array-CGH

Um DNA zur Sequenzanalyse von CTCs zu gewinnen und somit zu bestätigen, dass es sich bei der mittels rVAR2 angefärbten Zelle um eine CTC handelt, wurde eine vollständige Genom-Sequenzierung (*whole genome amplification*, WGA) mit anschließender Qualitätskontrolle durchgeführt.

Die WGA wurde mittels Ampli1 WGA Kit nach Herstellerprotokoll (REF WG001R, Version 06) durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und fragmentiert. Daraufhin werden spezifische Adapter an die DNA Fragmente ligiert und die Amplifizierung wird mittels PCR Primer durchgeführt [70]. Die folgenden Schritte weichen vom Herstellerprotokoll ab. Die Zeit der Zelllyse bei 42°C im Thermocycler peqSTAR wurde auf 10 h verlängert. Während der DNA-Verdauung wurden die Proben bei 37°C im Thermocycler peqSTAR für 3 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde DNA der Zelllinie MDA-MB-231, als Negativkontrolle Wasser, verwendet.

Die Qualität der durchgeführte WGA, wurde anhand des Ampli1 QC Kit (REF WGQC4200RWB) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µL des korrespondierenden Ampli1 WGA Produkt verwendet. Als Positivkontrolle wurde DNA der Zelllinie MDA-MB-231, als Negativkontrolle Wasser, verwendet.

Die weitere *Downstream* Analyse mittels Array-basierter comparative genomischer Hybridisierung (*array-based comparative genomic hybridisation*, Array-CGH) wurde freundlicherweise durch die Kooperationspartner des Labors für chirurgisch-onkologische Forschung unter Leitung Univ.-Prof. Dr.med. Nikolas H. Stoecklein der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.2.20 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie Erstellung der Abbildungen erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

3 Ergebnisse

3.1 rVAR2 Bindung an Brustkrebszelllinienzellen

Vor der Etablierung eines geeigneten *Workflows* zur Anreicherung der CTCs wurden zunächst Experimente durchgeführt zur Darstellung einer spezifischen Bindung des rVAR2 an Brustkrebszelllinienzellen sowie an CTCs von metastasierten Mammakarzinompatientinnen. Das Protein rVAR2, das an die Zelllinienzellen bindet, besitzt einen penta His Tag, an den ein anti-penta His Antikörper binden kann. rVAR2 wurde zur Zellprobe hinzugegeben und danach wurden die Zellen durch die Protein-Antikörper Bindung des anti-penta His Alexa Fluor 488 Antikörpers fluoreszenzmarkiert. Zu der Kontrolle wurden anstatt rVAR2 lediglich PBS2 und der fluoreszierende Antikörper hinzugegeben.

Die untenstehende Abbildung 4 zeigt eine Bindung des rVAR2 Proteins an die ausgewählten Brustkrebszelllinienzellen MCF7 und MDA-MB-231. Die Kontrolle zeigt keine Anfärbung der Tumorzellen ohne rVAR2, sodass eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Tumorzellen ausgeschlossen werden kann.

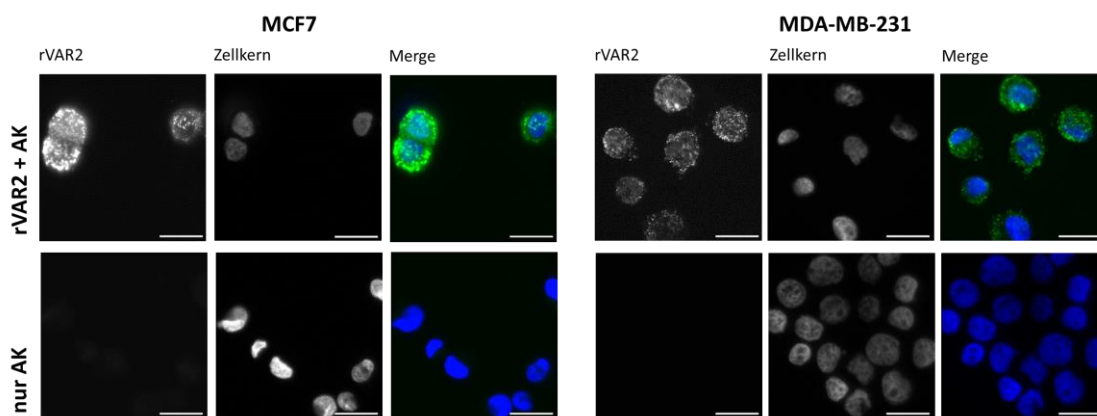


Abb. 4: rVAR2 Bindung an Tumorzellen

Die obere Bildzeile zeigt die Färbung der Zelllinienzellen MCF7 und MDA-MB-231 mit dem Fluoreszenzantikörper anti-penta His Alexa Fluor 488 nach Bindung an rVAR2 sowie die Zellkernfärbung mittels DAPI. Die untere Zeile zeigt eine reine Färbung mit dem Antikörper anti-penta His Alexa Fluor 488 ohne rVAR2 sowie die Zellkernfärbung mittels DAPI. Weißer Größenbalken \cong 20 μ m. Vergrößerung 40 \times . Die Aufnahmen wurden mit dem Axioplan 2 imaging Mikroskop gemacht. Merge = Zusammenführung der Färbung für rVAR2 und den Zellkern. AK = Antikörper. rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*.

Aufgrund der Rarität der CTCs ist es wichtig, eine sehr sensitive Anreicherungsmethode zu etablieren. Eine möglichst geringe unspezifische Bindung an periphere Blutzellen erleichtert außerdem die Anreicherung und spätere Detektion. Mit einem Durchflusszytometer konnte die mittlere Fluoreszenzintensität

(*Mean Fluorescent Intensity*, MFI) unter verschiedenen rVAR2 Konzentrationen untersucht und so die Bindeaffinität quantifiziert werden (Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass rVAR2 mit hoher Signifikanz an die unterschiedlichen Subtypen der Brustkrebszelllinien bindet im Vergleich zu den peripheren mononukleären Zellen (BT-474 $p = 0,002$; MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 $p < 0,001$). Für die Zelllinien MDA-MB-231 sowie SK-BR-3 konnte vergleichsweise eine höhere MFI und somit bessere Bindung erreicht werden als für die Zelllinien MCF7 und BT-474. Weiterhin zeigt sich ab einer rVAR2 Konzentration von 200 nM ein Sättigungsverhalten. Die ausgewählten Zelllinien umschließen die häufigsten Subtypen: Hormonrezeptor positiv mit den Subtypen Luminal A (MCF7) und Luminal B (BT-474), HER2-amplifiziert (SK-BR-3) und triple-negativ (MDA-MB-231).

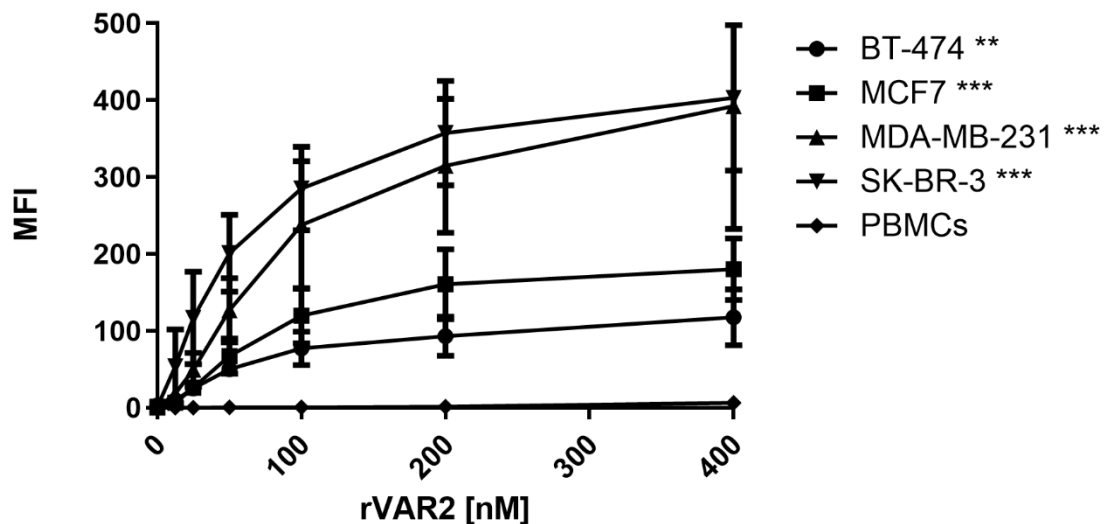


Abb. 5: rVAR2 Bindung an Tumorzellen im Vergleich (n = 3)

Die x-Achse zeigt die verschiedenen rVAR2 Konzentrationen in nM. Die y-Achse zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität. Die Legende zeigt die unterschiedlichen Brustkrebszelllinien. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz-Niveaus beziehen sich jeweils auf die PBMCs. ** entspricht einem p-Wert $< 0,01$. *** entspricht einem p-Wert $< 0,001$. Die p-Werte wurden bestimmt mittels Two Way ANOVA und Bonferroni's *multiple comparisons test*.

nM = Nanomolar. MFI = *Mean Fluorescent Intensity*. PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*. rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*.

3.2 rVAR2 Bindung an CTCs von Mammakarzinompatientinnen

Nachdem die Bindung von rVAR2 an Brustkrebszelllinien gezeigt wurde, konnte ebenfalls eine Bindung von rVAR2 an Patienten-CTCs dargestellt werden (Abb. 6). Die CTCs einer metastasierten Brustkrebspatientin wurden zunächst mit dem CellSearch Profile Kit EpCAM-abhängig angereichert und dann in Suspension

gefärbt. Tumorzellen wurden als CK und DAPI positiv und CD45 negativ definiert. Es zeigte sich ebenfalls eine Anfärbung der Patienten-CTCs mittels rVAR2 und dem anti-penta His Alexa Fluor 488 Antikörper. Die Färbung für den Leukozytenmarker CD45 ist für die beiden CTCs negativ. Leukozyten ließen sich nicht für CK und mittels rVAR2 anfärben, aber für CD45.

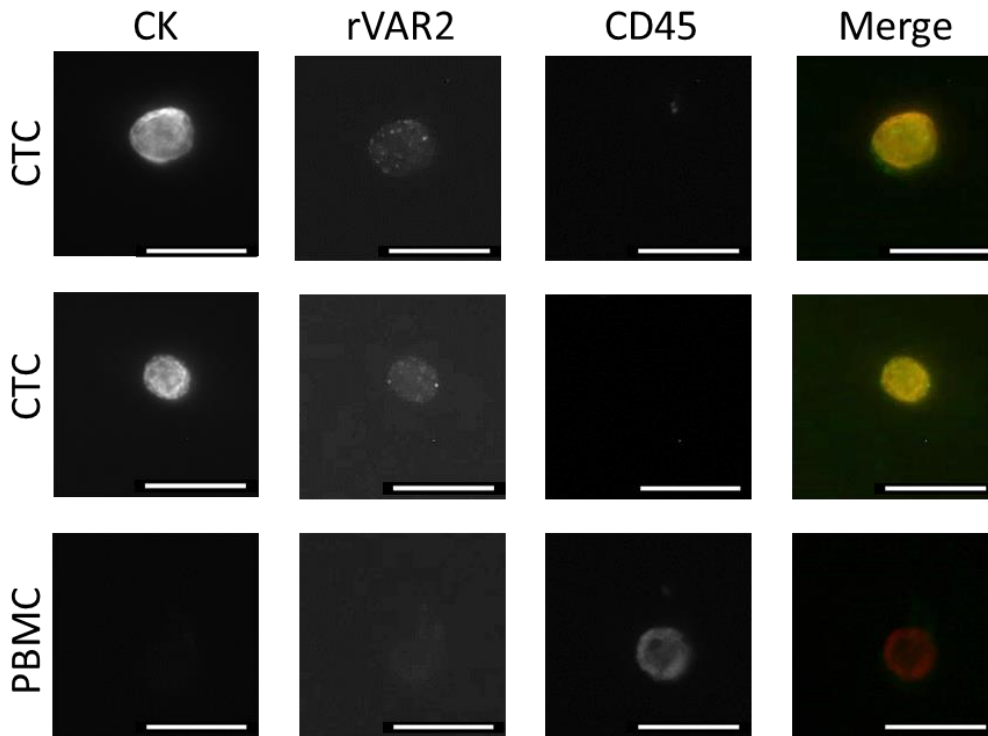


Abb. 6: Bindung von rVAR2 an CTCs

Die oberen beiden Bildzeilen zeigen eine Anfärbung jeweils einer CTC. Die untere Bildzeile zeigt die Anfärbung einer peripheren mononukleären Blutzelle. Größenbalken $\cong 20 \mu\text{m}$. Vergrößerung $40\times$. Die Aufnahmen wurden mit dem CellCelector gemacht. Merge = Zusammenführung der Färbung für CK, rVAR2 und CD45. PBMC = *Peripheral blood mononuclear cell*. CTC = *circulating tumor cell*. CK = Zytokeratin. CD45 = *Cluster of differentiation 45*. rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*.

Die so angefärbten CTCs wurden mittels CellCelector isoliert und anhand array-CGH analysiert. In der Analyse zeigt sich das typischen Aberrationsmuster für die Tumorzellen der Patientin (Abb. 7).



Abb. 7.: Array-CGH einer mit rVAR2 angefärbten CTC

Array-CGH Profil aller Autosomen und Gonosomen und deren Aberrationsmuster. Grün zeigt ein Signal oberhalb der *Baseline* und somit einen DNA-Gewinn. Rot zeigt ein Signal unterhalb der *Baseline* und somit einen DNA-Verlust. Array-CGH = *array-based Comparative Genomic Hybridization*.

Eine spezifische Bindung des rVAR2 an CTCs ist von großer Bedeutung in den Experimenten zur Anreicherung, um einen geringen Zellhintergrund zu erhalten sowie die Anzahl der falsch positiven Zellen so gering wie möglich zu halten. Um die Bindungsspezifität weiter zu untersuchen, wurden Patientenproben mittels rVAR2 sowie für CK und CD45 angefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Zellen wurden in Suspension gefärbt. Es wurde die MFI des anti-penta His Alexa Fluor 488 Antikörper nach Bindung an rVAR2 und somit an den Zellen gemessen. Die Brustkrebszelllinienzellen MCF7 dienten als Referenz. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Axioplan 2 imaging Fluoreszenzmikroskop. Als Tumorzelllinienzellen und CTCs wurden solche erkannt, die CK, DAPI, rVAR2 positiv und CD45 negativ waren. PBMCs wurden als solche differenziert, die sich als CD45 und DAPI positiv, CK und rVAR2 negativ zeigten. Die Grafik (Abb. 8) zeigt, dass rVAR2 besonders an Tumorzellen bindet, welches in einer höheren Fluoreszenzintensität resultiert. Die mittlere relative MFI der CTCs ist um das 10,7-fache höher als die mittlere relative MFI der Leukozyten. Insgesamt zeigt sich die mittlere Fluoreszenzintensität der CTCs sowie der MCF7 Zellen signifikant höher als die der Leukozyten ($p < 0,001$).

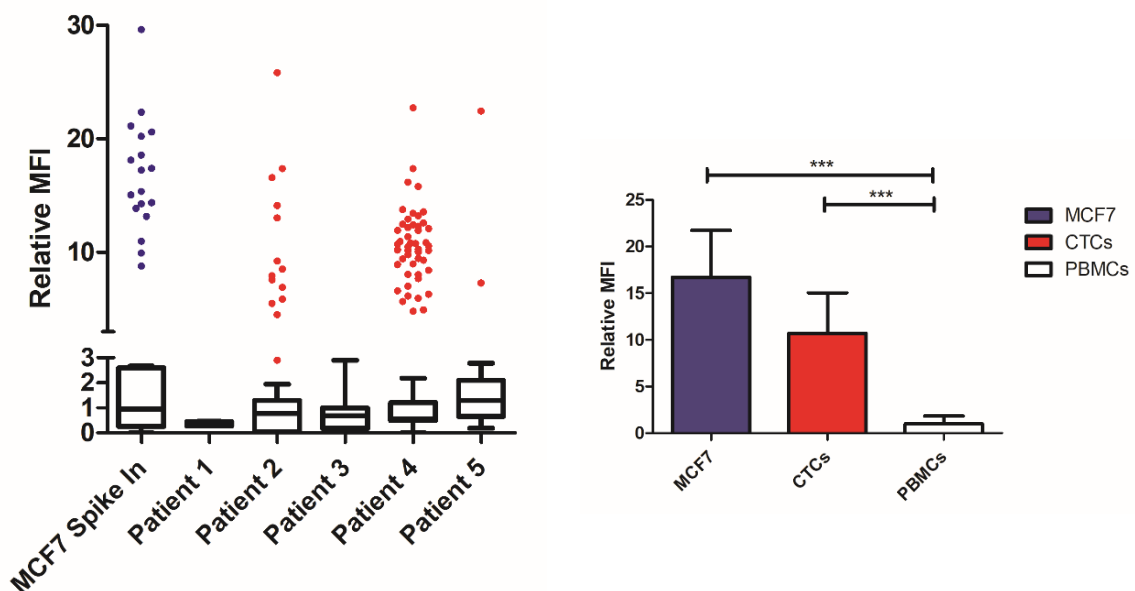


Abb. 8: Bindung von rVAR2 an CTCs im Vergleich zu PBMCs

Linke Grafik: Auf der x-Achse sind die MCF7 Tumorzelllinie sowie die Patientenproben aufgetragen. Die y-Achse entspricht der relativen mittleren Fluoreszenzintensität. Die blauen Punkte bilden die MCF7 Zellen ab, die roten Punkte die Patienten-CTCs. Die Box-Whisker-Plots bilden die PBMCs ab und umschließen die 5.-95. Perzentile. Die Klammern zeigen Minimum bis Maximum. Rechte Grafik:

Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Zellen. Die y-Achse entspricht der relativen mittleren Fluoreszenzintensität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. *** entspricht einem p-Wert < 0,001. Die p-Werte wurden bestimmt mittels One Way ANOVA und Tukey post-hoc Test. CTCs = *circulating tumor cells*, PBMCs = *Peripheral blood mononuclear cells*, MFI = *Mean Fluorescent Intensity*. Die Aufnahmen zur Auswertung wurden mit dem Axioplan 2 imaging gemacht mit einer Vergrößerung von Vergrößerung 40×.

3.3 Experimente zur Anreicherung

Zu Beginn der Etablierung eines *Workflows* zur Anreicherung wurden Experimente zur Testung der verschiedenen Einflüsse auf die ofCS-rVAR2 Bindung durchgeführt. Für die Experimente wurde die Lungenkarzinomzelllinie A549 verwendet.

3.3.1 Einfluss des Ablösepuffers auf die rVAR2 Bindeaffinität

Da die Etablierung des *Workflows* anhand von Zelllinienzellen erfolgte, wurde zunächst der Einfluss verschiedener Ablösepuffer auf die rVAR2 Affinität mittels Durchflusszytometrie geprüft. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, ist die Affinität des rVAR2 zu den A549 Tumorzellen nach Ablösung mit Trypsin signifikant vermindert im Vergleich zu den Ablösepuffern *Cell dissociation buffer* ($p = 0,048$) und Accutase ($p = 0,046$).

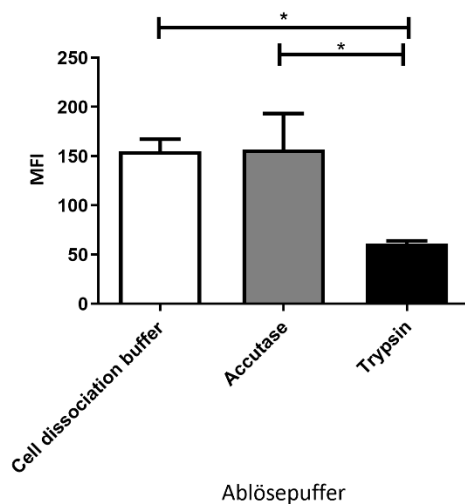


Abb. 9: Einfluss des Ablösepuffers auf die rVAR2 Bindung (n = 2)

Die x-Achse zeigt die verschiedenen Ablösepuffer. Die y-Achse zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität bei einer rVAR2 Konzentration von 100 nM. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf Trypsin. * entspricht einem p-Wert < 0,05. Die p-Werte wurden bestimmt mittels One Way ANOVA und Tukey post-hoc Test. MFI = *Mean Fluorescent Intensity*.

3.3.2 Einfluss von CellSave auf die rVAR2 Bindeaffinität

Für die Analyse von zirkulierenden Tumorzellen werden häufig CellSave Blutentnahmeröhrchen genutzt, da diese die CTCs stabilisieren und das Versenden von Blutproben mit einer späteren Prozessierung ermöglichen. Dies ist beispielsweise in Multicenterstudien von großem Nutzen. A549 Zelllinienzellen wurden für 24 h sowie für 1 h in CellSave Röhrchen gelagert, mit rVAR2 inkubiert und mit dem Antikörper anti-penta His Alexa Fluor 488 fluoreszenzmarkiert. Als Vergleich wurden A549 Tumorzellen sofort geerntet und für das Experiment verwendet. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, hat der Verbleib der Tumorzellen in CellSave für 24 h einen negativen Einfluss auf die Bindeaffinität des rVAR2 Proteins. Es besteht kein Unterschied zwischen einer direkten Analyse der A549 Tumorzellen und dem Verbleib der A549 Tumorzellen für 1 h im CellSave Röhrchen. Die MFI der A549 Zellen ohne CellSave sowie nach 1 h im CellSave ist im Vergleich zu der MFI der A549 Zellen 24 h im CellSave signifikant höher ($p < 0,001$).

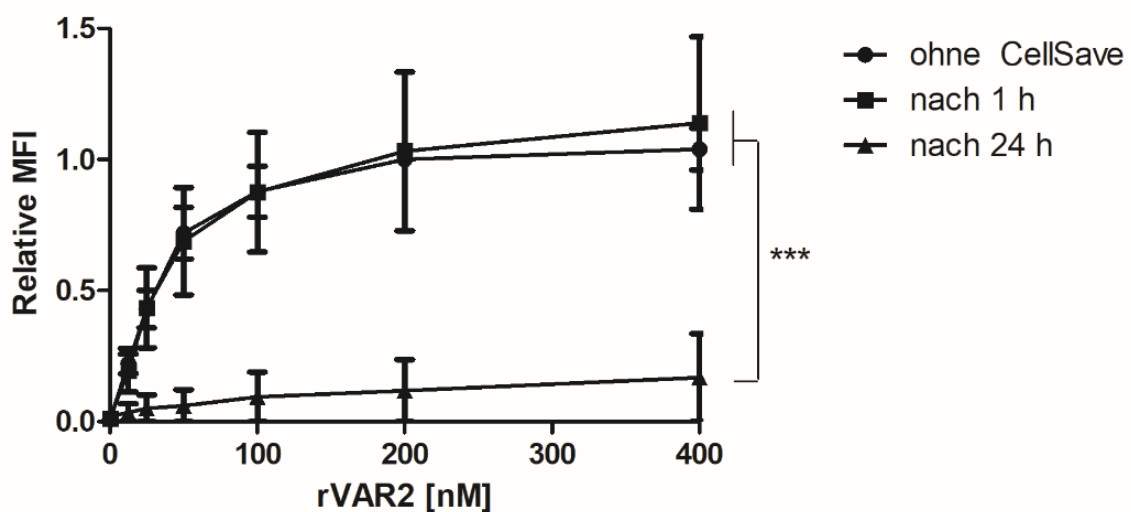


Abb. 10: Einfluss von CellSave auf die rVAR2 Bindung (n = 3)

Die x-Achse zeigt die verschiedenen rVAR2 Konzentrationen in nM. Die y-Achse zeigt die relative mittlere Fluoreszenzintensität. Die Ergebnisse der MFI der A549 Zellen unter verschiedenen Bedingungen wurden in Relation zu der MFI bei einer rVAR2 Konzentration von 200nM der A549 Zellen ohne CellSave Einfluss gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz-Niveaus beziehen sich auf die A549 Zellen 24h im CellSave. *** entspricht einem p-Wert $< 0,001$. Die p-Werte wurden bestimmt mittels Two Way ANOVA und Bonferroni's *multiple comparisons test*. MFI = Mean Fluorescent Intensity. nM = Nanomolar. rVAR2 = recombinant Variant Surface antigen 2. h = Stunde.

3.3.3 Bindung der Beads an Tumorzellen

Zu Beginn der Etablierung des Workflows für die Anreicherung wurde getestet, ob die magnetischen Beads unspezifisch an die Tumorzellen binden (Abb. 11).

Zunächst wurden A549 Zelllinienzellen mit rVAR2 gebundenen Dynabeads M-450 Epoxy inkubiert. Zur Kontrolle wurde ebenfalls A549 Zelllinienzellen mit den *Beads* ohne rVAR2 inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich die *Beads* bei einer Bindung von rVAR2 an den Zellen in Form kleiner Rosetten um die Zellen legen. Ohne rVAR2 binden die *Beads* nicht unspezifisch und richten sich nicht an den Zellen aus.

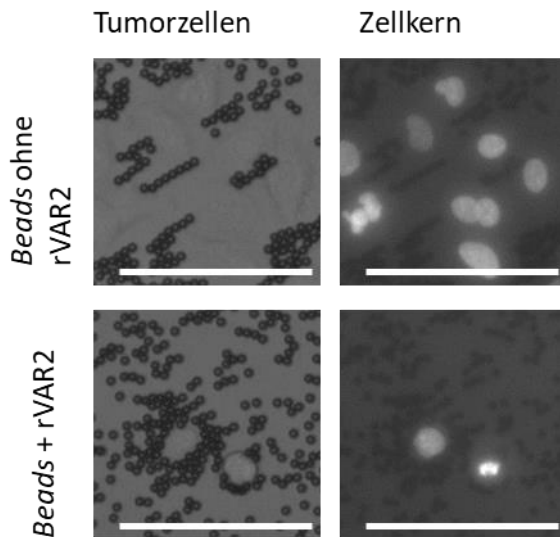


Abb. 11: Bindung der *Beads* an Tumorzellen

Die obere Bildzeile zeigt die Inkubation der *Beads* mit A549 Zelllinienzellen ohne rVAR2 im *Bright field* und die mittels DAPI gefärbten Zellkerne. Die untere Bildzeile zeigt die Bindung der rVAR2 gebundenen *Beads* an den Tumorzellen im *Bright field* und die mittels DAPI gefärbten Zellkerne. Weißer Größenbalken $\approx 50 \mu\text{m}$. Vergrößerung 40 \times . Die Aufnahmen wurden mit dem CellCelector gemacht. rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*.

3.3.4 Vergleich verschiedener rVAR2 Proteine

Das Protein VAR2CSA wird zur Anreicherung von CTCs in rekombinanter Form genutzt. Das rekombinante Protein ist in seiner Form auf die minimale ofCS-Bindungsregion beschränkt (Abb. 12).

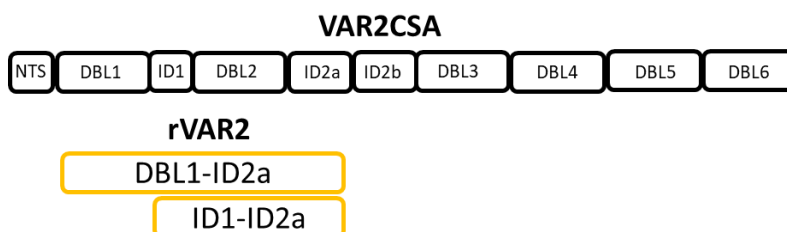


Abb. 12: Gegenüberstellung VAR2CSA und rVAR2

Schematische Darstellung des Proteins VAR2CSA in seiner ursprünglichen Länge. Darstellung zweier rVAR2 Proteine, welche auf die ofCS-Bindungsregion reduziert sind. Modifiziert nach Sand

et al. [64]. rVAR2 = recombinant Variant Surface antigen 2. VAR2CSA = variant surface antigen 2 chondroitin sulfate A.

Es wurden die beiden rVAR2 Proteine anhand ihrer Kapazität zur Anreicherung getestet (Abb. 13). Die Anreicherung wurde mittels KingFisher und der indirekten Methode mit 30 μ L Dynabeads Biotin Binder durchgeführt. Als Tumorzelllinie wurden 500 Zellen A549 Zelllinienzellen verwendet, welche mittels *CellTracker Green* vorgefärbt wurden. Die Tumorzellen wurden nach Erythrozytenlyse zu den Zellproben gesunder Spender hinzugegeben.

Mit dem rVAR2 DBL1-ID2a (121kDa) konnte eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 52,5 % \pm 9,14 % erreicht werden. Das kleinere rVAR2 Protein ID1-ID2a (71kDa) erreichte eine Wiederfindungsrate von 39,62 % \pm 6,73 %. Die Wiederfindungsrate mittels des rVAR2 DBL1-ID2a ist signifikant höher im Vergleich zum rVAR2 ID1-ID2a ($p = 0,028$).

Für die weiteren Experimente der Anreicherung wurde daher das rVAR2 DBL1-ID2a ausgewählt.

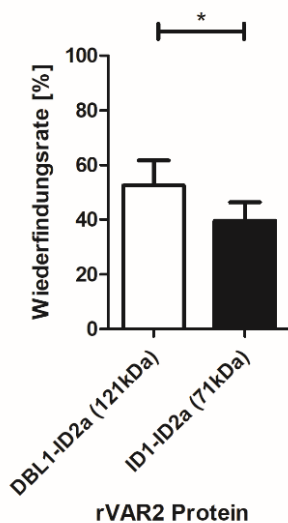


Abb. 13: Vergleich unterschiedlicher rVAR2 Proteine (n = 5-6)

Die x-Achse zeigt die verschiedenen rekombinanten rVAR2 Proteine: rVAR2 121kDA (n=6), rVAR2 71kDA (n=5). Die y-Achse zeigt die Wiederfindungsrate in %. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * entspricht einem p-Wert < 0,05. Der p-Wert wurde mittels t-Test bestimmt. %= Prozent, kDA = Kilodalton, rVAR2 = recombinant Variant Surface antigen 2.

Um die magnetischen *Beads* - CELLection Biotin Binder Dynabeads und Biotin Binder Dynabeads - mit rVAR2 zu beschichten, wird für die Anreicherung ein Protein-Linker verwendet, das sogenannte SpyC Protein.

Es wurden die Wiederfindungsraten bei verschiedenen SpyC-Verhältnissen bei gleichbleibender rVAR2 Konzentration von 200 nM rVAR2 in der Zellprobe getestet (Abb. 14). Hierfür wurden mit *CellTracker Green* vorgefärbte A549 Tumorzelllinienzellen verwendet. Die Anreicherung wurde mittels indirekter Methode und 30 µL Dynabeads Biotin Binder am KingFisher durchgeführt. Es lassen sich mit den Verhältnissen 1,4:1 ($66,87 \pm 7,52\%$) und 1,2:1 ($66,13\% \pm 5,02\%$) höhere Wiederfindungsraten erzielen als mit einer höheren SpyC Konzentration im Verhältnis 1:1 ($57,69 \pm 11,66\%$) und 1:1,2 ($51,45\% \pm 2,98$). Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere Konzentration an SpyC im Verhältnis zum rVAR2 zu einer signifikant geringeren Wiederfindungsrate führt ($p = 0,037$).

Für die weiteren Experimente der Anreicherung wurde das rVAR2 zu SpyC Verhältnis 1,2:1 gewählt.

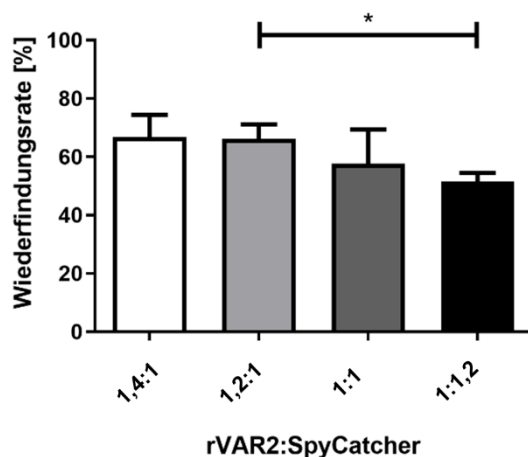


Abb. 14: Vergleich unterschiedlicher rVAR2 zu SpyC Verhältnisse (n = 2 - 5)

Die x-Achse zeigt die verschiedenen rVAR2 zu SpyC Verhältnisse: 1,4:1 (n=2), 1,2:1 (n=5), 1:1 (n=5), 1:1,2 (n=5). Die y-Achse zeigt die Wiederfindungsrate in %. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * entspricht einem p-Wert < 0,05. Die p-Werte wurden bestimmt mittels One Way ANOVA und Tukey post-hoc Test. % = Prozent, rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*.

3.3.5 Vergleich KingFisher, IsoFlux und Anreicherungsverfahren

Die Anreicherungsverfahren lassen sich in direkt, indirekt, doppelt indirekt und semi-indirekt unterscheiden (Abb. 15). Die Experimente wurden mit *CellTracker Green* vorgefärbten A549 Tumorzelllinienzellen durchgeführt, welche nach der Erythrozytenlyse von gesundem Spenderblut zu der Zellprobe hinzugefügt wurden.

Die Eigenschaften der unterschiedlichen *Beads* werden im Material und Methoden Teil beschrieben (2.2.11).

Die direkte Methode beschreibt die Anreicherung von Tumorzellen mittels biotinyliertem rVAR2 Protein, welches an die magnetischen *Beads* bindet. Das rekombinante Protein besitzt ein SpyTag Peptid, welches eine kovalente Bindung zu dem sogenannten biotinyliertem SpyC Protein eingehen kann. Durch dieses Verbindungsprotein kann rVAR2 an die *Beads* binden. Bei der direkten Technik werden zunächst rVAR2 und das SpyC Protein inkubiert. In einem nächsten Schritt werden das Protein rVAR2 und das an ihm gebundene SpyC Protein mit den *Beads* inkubiert. Die so mit rVAR2 ummantelten *Beads* können dann zu der aufbereiteten Probe hinzugegeben werden. Eine Ausnahme bilden die Dynabeads M-450 Epoxy, welche rVAR2 ohne Linker direkt binden können. Bei der indirekten Technik wurden zunächst die aufbereiteten Zellen mit rVAR2 und dem an ihm gebundenen SpyC Protein inkubiert und im nächsten Schritt die *Beads* hinzugefügt. Die doppelt indirekte Methode beschreibt die Bindung des rVAR2 zuerst an die Zellen. In einem zweiten Schritt wird das SpyC Protein hinzugegeben. Erst nach erneuter Inkubation werden zum Schluss die *Beads* hinzugegeben. Die semi-indirekte Methode beschreibt ebenso eine initiale Bindung des rVAR2 an die Zellen. Währenddessen werden die *Beads* mit dem SpyC Protein inkubiert. Danach erst werden die mit SpyC beladenen *Beads* zu den rVAR2 gebundenen Zellen hinzugegeben.

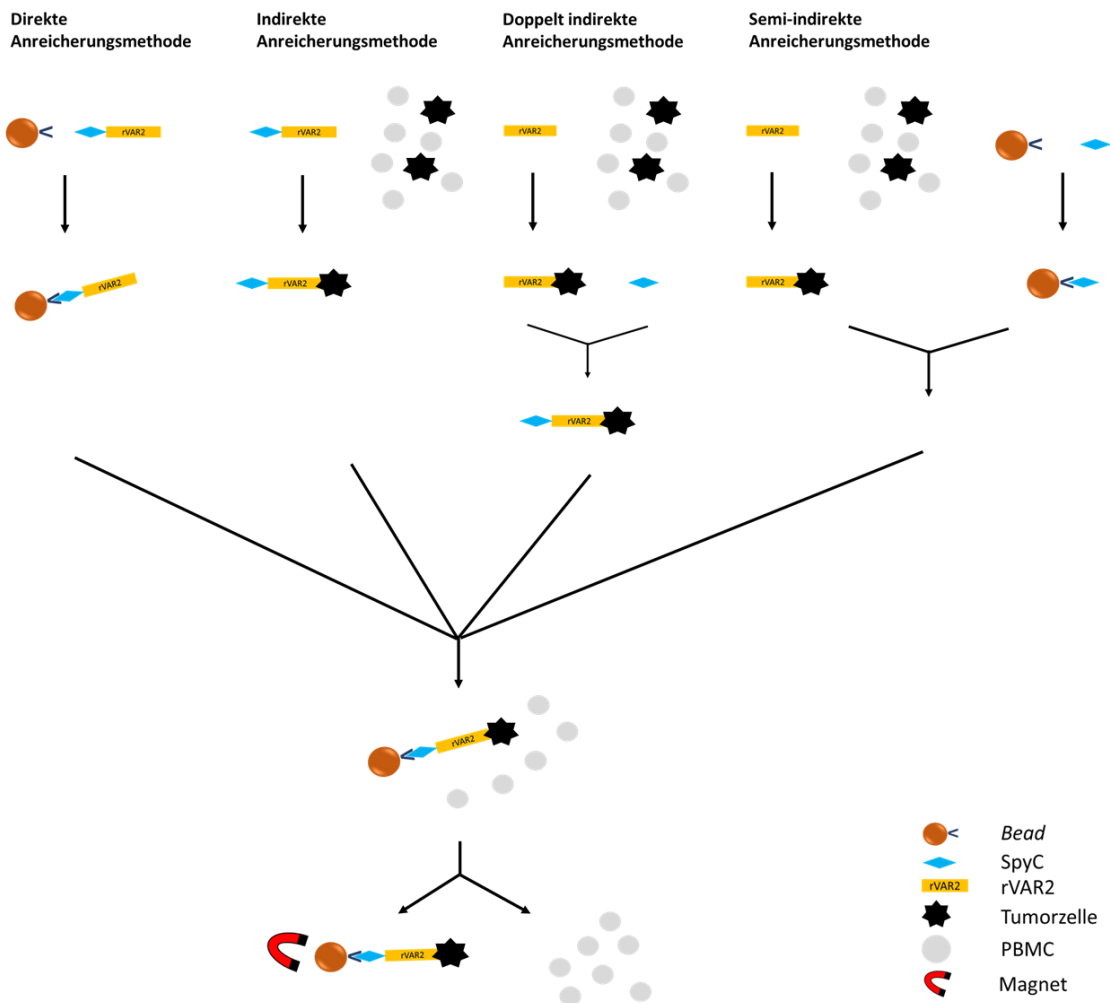


Abb. 15: Anreicherungsverfahren

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Aufbereitung der *Beads* und der Zellprobe nach den einzelnen Anreicherungsverfahren. Zuletzt folgt die magnetische Anreicherung. SpyC = SpyCatcher Protein. rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*. PBMC = *Peripheral blood mononuclear cell*.

Für die Etablierung eines geeigneten *Workflows* wurden die vorgestellten Anreicherungsverfahren, die Anreicherung mittels IsoFlux und KingFisher sowie die Anreicherung mit *Beads* verschiedener Hersteller und unterschiedlicher Mengen gegenübergestellt (Abb. 16). Die p-Werte der Abbildung 16 zeigt Tabelle 7.

Der IsoFlux erreichte seine höchste Wiederfindungsrate von 40,9 % \pm 3,39 % mittels direkter Methode und 30 μ L Dynabeads Biotin Binder. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der indirekten und direkten Anreicherungsverfahren am IsoFlux mit den CELLection Biotin Binder Dynabeads sowie den Dynabeads Biotin Binder in den Konzentrationen 6,3 μ L und 30 μ L.

Die insgesamt höchste Wiederfindungsrate von 67,33 % \pm 11,64 % konnte mittels indirekter Methode am KingFisher mit 30 μ L Dynabeads Biotin Binder erreicht

werden. Der Anstieg der Wiederfindungsrate, bei Gebrauch von 30 μL Dynabeads Biotin Binder mittels indirekter Anreicherungsmethode beim KingFisher von 67,33 % \pm 11,64 %, im Vergleich zum IsoFlux von 27,05 % \pm 20,86 %, ist signifikant ($p = 0,007$). Vergleicht man die direkte Methode mit der indirekten Methode am KingFisher, zeigt sich eine Zunahme der Wiederfindungsrate bei der indirekten Methode. Die Wiederfindungsrate mit den Dynabeads Biotin Binder, bei einer Konzentration von 6,3 μL (direkt 10 % \pm 7,44 %, indirekt 40,5 % \pm 18,69 %), steigt bei der indirekten Anreicherungsmethode signifikant ($p = 0,022$). Die Wiederfindungsrate mit 30 μL Dynabeads Biotin Binder bei der direkten Anreicherungsmethode beträgt 40,13 % \pm 22,12 % und steigt bei der indirekten Anreicherungsmethode auf 67,33% \pm 11,64%. Es zeigt sich eine signifikant geringere Tumorzellanreicherung bei Gebrauch von 60 μL Dynabeads Biotin Binder (30,95 % \pm 12,8 %, $p = 0,024$), Anwendung der doppelt indirekten Methode (1,25 % \pm 1,49 %, $p < 0,001$) und bei der semi-indirekt Methode (4,73 % \pm 2,77 %, $p < 0,001$) mit 30 μL Dynabeads Biotin Binder im Vergleich zur indirekten Methode mit 30 μL Dynabeads Biotin Binder. Die Dynabeads Biotin Binder zeigen weiterhin keine unspezifische Bindung, da es bei einem Anreicherungsversuch ohne rVAR2 und SpyC Protein zu kaum einer Tumorzellanreicherung (Wiederfindungsrate 0,07 % \pm 0,1 %) kommt. Für die Etablierung des *Workflows* wurde die indirekte Anreicherungsmethode mit 30 μL Dynabeads Biotin Binder am KingFisher gewählt.

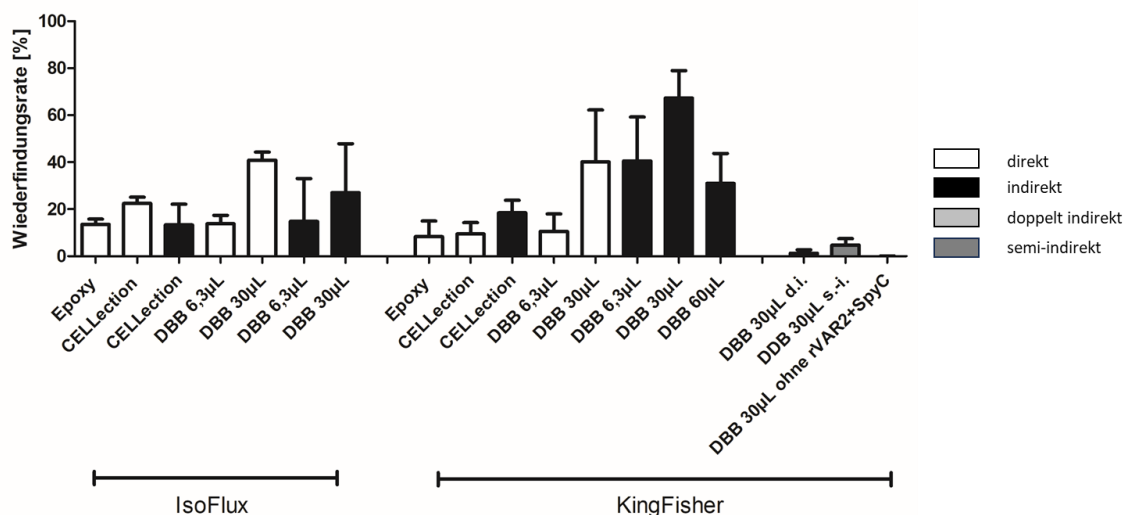


Abb. 16: Vergleich zwischen IsoFlux, KingFisher, direkt, indirekte, doppelt-indirekte und semi-indirekte Anreicherung sowie Beads (n = 2 - 6)

Auf der x-Achse sind die verschiedenen Anreicherungsverfahren aufgetragen. Diese sind nach Beads, Menge der Beads sowie Gerät geordnet. IsoFlux: Epoxy (n=4), CELLlection direkt (n=3), CELLlection indirekt (n=3), DBB 6,3 μL direkt (n=2), DBB 30 μL direkt (n=2), DBB 6,3 μL indirekt (n=2),

DBB 30 μ L indirekt (n=2), KingFisher: Epoxy (n=4), CELLection direkt (n=6), CELLection indirekt (n=6), DBB 6,3 μ L direkt (n=4), DBB 30 μ L direkt (n=4), DBB 6,3 μ L indirekt (n=4), DBB 30 μ L indirekt (n=4), DBB 60 μ L indirekt (n=2), DBB ohne rVAR+SpyC (n=2). Die verschiedenen Anreicherungsmethoden sind nach Farbe in weiß = direkte Methode, schwarz = indirekte Methode, hellgrau = doppelt indirekte Methode, dunkelgrau = semi-indirekte Methode geordnet. Die y-Achse zeigt die Wiederfindungsrate in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die p-Werte dieser Abbildung zeigt Tabelle 7. DBB = Dynabeads Biotin Binder. SpyC = SpyCatcher Protein. rVAR2 = *recombinant Variant Surface antigen 2*. % = Prozent.

3.3.6 Anreicherung Brustkrebszelllinienzellen

Die höchste Wiederfindungsrate der A549 Tumorzellen konnte mittels indirekter Methode und 30 μ L Dynabeads Biotin Binder am KingFisher erreichen werden. Um diesen *Workflow* auch für spätere Brustkrebszellanreicherungen zu validieren, wurden die Anreicherungsraten der verschiedenen Subtypen der Brustkrebszelllinien bestimmt (Abb. 17). Die mit *CellTracker Green* vorgefärbten Tumorzelllinienzellen wurden nach der Erythrozytenlyse gesunden Spenderbluts zu der Zellprobe hinzugegeben. Die Anreicherung der Brustkrebszelllinienzellen MDA-MB-231 (73,5 % \pm 7,67 %), BT-474 (69 % \pm 6,27 %) sowie MCF7 (44,09 % \pm 6,94 %) waren mit ihrer mittleren Anreicherungsrate im Vergleich zu den A549 Tumorzelllinienzellen mit einer Anreicherungsrate von 67,86 % \pm 15,07 % nicht signifikant höher. Die Anreicherungsrate der A549 Zelllinienzellen war im Vergleich zur mittleren Anreicherungsrate der SK-BR-3 Zellen von 42,2 % \pm 3,62 % signifikant höher ($p = 0,03$). Die Wiederfindungsraten der MDA-MB-231 Zelllinienzellen ist mit 73,5 % \pm 7,67 % signifikant höher im Vergleich zu den Wiederfindungsraten der Zelllinien SK-BR-3 (42,2 % \pm 3,62 %, $p = 0,013$) und MCF7 ($p = 0,039$). Die Wiederfindungsrate der Zelllinie BT-474 ist im Vergleich zu den SK-BR-3 Zelllinienzellen ebenfalls signifikant höher ($p = 0,024$).

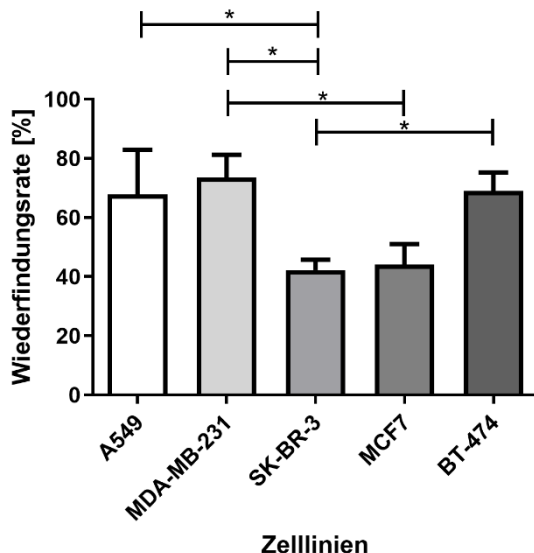


Abb. 17: Vergleich der Anreicherung verschiedener Tumorzelllinien (n = 2 - 4)

Die x-Achse zeigt die verschiedenen Tumorzelllinien: A549 (n=4), MDA-MB-231 (n=3), SK-BR-3 (n=3), MCF7 (n=2), BT-474 (n=4). Die y-Achse zeigt die Wiederfindungsrate in Prozent. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * entspricht einem p -Wert $< 0,05$. Die p -Werte wurden bestimmt mittels One Way ANOVA und Tukey post-hoc Test. % = Prozent.

3.3.7 Workflow zur Anreicherung von CTCs

Für den finalen Workflow wurde sich, aufgrund der genannten Ergebnisse, für die indirekte Anreicherungsmethode entschieden (Abb. 18). Die Proteine rVAR2 und SpyC werden zusammen inkubiert. Parallel werden die Erythrozyten der Patientenprobe lysiert und gewaschen. Der rVAR2-SpyC Komplex wird mit der aufgereinigten Patientenprobe inkubiert. Die Dynabeads Biotin Binder werden ebenfalls gewaschen, bevor sie der rVAR2-Zellsuspension hinzugegeben werden. Zuletzt werden die Zellproben zur Anreicherung in die Mikrotitrierplatte des KingFishers geladen und mittels magnetischer Stäbe angereichert.

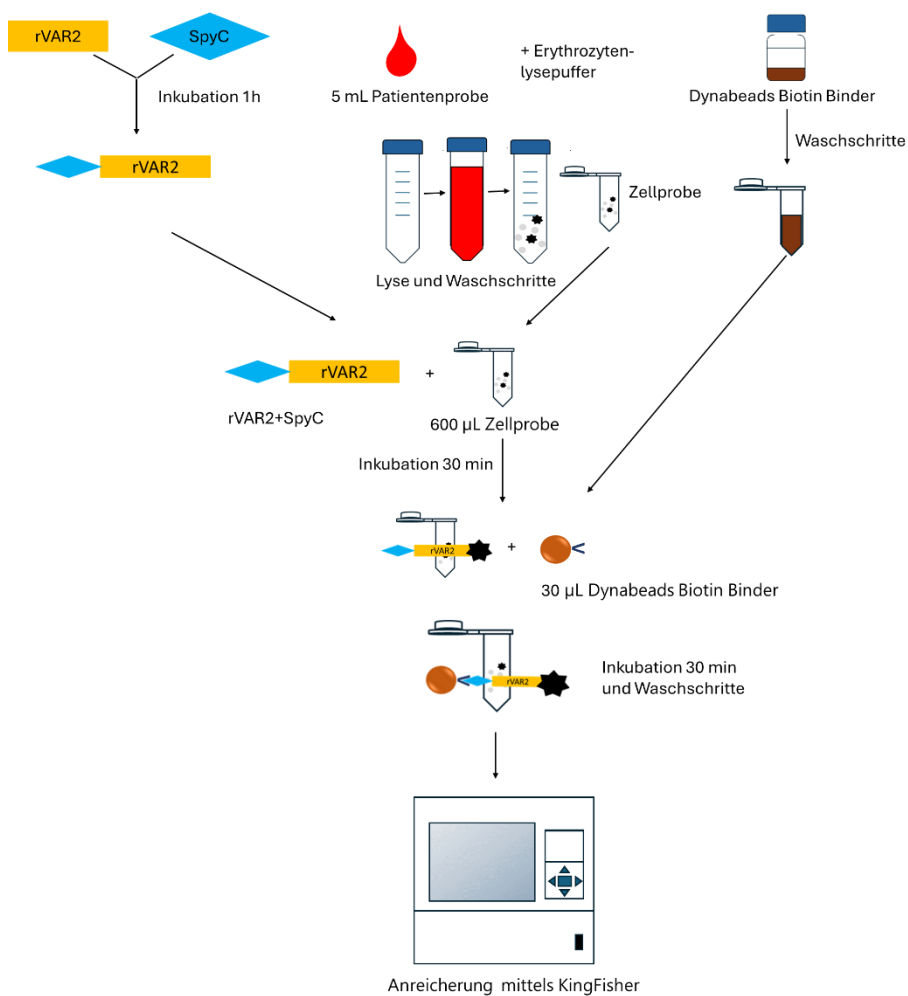


Abb. 18: Graphische Darstellung des Workflows zur Anreicherung von CTCs

Der finale Workflow ist im Anhang dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkung

CTCs werden als metastatische Vorläuferzellen betrachtet und es lässt sich in ihrer Anzahl auf eine Tumorprogression sowie in ihren Eigenschaften auf eine Tumorerheterogenität schließen. CTCs etablieren sich immer mehr als wertvolles Mittel zur Optimierung personalisierter Therapieregime von metastasierten Mammakarzinompatientinnen. Aufgrund ihrer Seltenheit werden hochsensitive und spezifische Methoden für die CTC-Anreicherung und Detektion vor einem hohen Hintergrund an peripheren mononukleären Blutzellen benötigt. In den letzten Jahren wurden viele Marker-abhängige und -unabhängige Verfahren zur CTC-Anreicherung entwickelt. Nach wie vor dominiert die Marker-abhängige Anreicherung mittels anti-EpCAM Antikörper mit dem CellSearch. Aufgrund der Herunterregulierung epithelialer Marker bleibt zu vermuten, dass EpCAM-abhängige Anreicherungsverfahren Subpopulationen von CTCs, mit einem eher mesenchymalen Phänotyp, nicht isolieren. Weiterhin ist der Einfluss der EpCAM-negativen CTCs auf die metastatische Tumorausbreitung nicht abschließend geklärt. Daher ist es zur Verbesserung des Therapiemanagement sowie des Therapiemonitorings von besonderem Interesse möglichst alle CTC-Subgruppen zu isolieren. Um diese EpCAM-Abhängigkeit zu überwinden, werden alternative Zielstrukturen für eine effizientere CTC-Anreicherung gesucht [71].

In den vorausgegangenen Publikationen von Salanti *et al.* und Agerbæk *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass ofCS eine ideale Zielstruktur für die Anreicherung von CTCs darstellen kann. Es ist auf nahezu allen malignen Tumorzellen vorhanden und wird nicht durch die EMT herunterreguliert. Für die CTC-Anreicherung stellten sie einen *Workflow* zur Verfügung, der eine Anreicherung anhand der ofCS-rVAR2 sowie der Bindung des rVAR2 an magnetische *Beads* möglich macht. Zur Anreicherung wurde der IsoFlux verwendet [61].

Auf Grundlage dessen war es das Ziel für das Labor der Frauenklinik am Universitätsklinikum Düsseldorf, einen optimierten, robusten *Workflow* für die Anreicherung von CTCs aus dem Blut von metastasierten Mammakarzinompatientinnen zu entwickeln.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 rVAR2 Bindeaffinität und Anreicherung der Zelllinienzellen

Zunächst wurde die Spezifität der rVAR2-Bindung an unterschiedliche Brustkrebszelllinienzellen sowie PBMCs überprüft. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität der PBMCs und der Brustkrebszelllinienzellen festgestellt werden. Auch die Fluoreszenzintensität der Brustkrebszelllinien divergiert untereinander. So lassen sich für die Brustkrebszelllinien SK-BR-3 und MDA-MB-231 eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität feststellen als für die Zelllinien MCF7 und BT-474. Interessanterweise korrelieren diese Ergebnisse nur bedingt mit den Ergebnissen der Wiederfindungsraten der unterschiedlichen Zelllinienzellen. So lassen sich hier für die Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 sowie BT-474 die höchsten Wiederfindungsraten erreichen. Ähnliche Resultate konnten ebenfalls von Sand *et al.* beobachtet werden [64]. Als mögliche Erklärung der unterschiedlichen Wiederfindungsraten der Zelllinien wurden Unterschiede in der ofCS-Expression, Vorhandensein oder Zugänglichkeit angenommen. Da ofCS auf einer großen Varianz an *Chondroitin sulfate proteoglycans* (CSPG) vorhanden ist, welche auf den verschiedenen Zelllinienzellen unterschiedlich exprimiert werden, kann der Grund für die Abweichungen der Anreicherungseffizienz komplex sein. Auch zeigten bei Sand *et al.* die Ergebnisse der Anreicherung keine Korrelation zu den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung in der Durchflusszytometrie [64]. Eine geringe Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie der Zelllinie BT-474 könnte mit einer geringeren Expression des ofCS erklärt werden. Im Kontrast dazu steht die mit $69 \% \pm 6,27 \%$ hohe Wiederfindungsrate. Andersherum kann die hohe mittlere Fluoreszenz der Zelllinie SK-BR-3, im Vergleich zu der eher niedrigeren Wiederfindungsrate von $42,2 \% \pm 3,62 \%$, daher rühren, dass manche CSPGs bestimmter Zelllinien mehr mit Blutbestandteilen interagieren oder durch die Probenprozessierung beeinträchtigt sind als andere Zelllinien. Die Zelllinie MDA-MB-231 ist eine EpCAM gering exprimierende Zelllinie (Abb. 19), die hier in den Experimenten eine hohe Fluoreszenzintensität sowie mit $73,5 \% \pm 7,67 \%$ eine hohe Wiederfindungsrate zeigt. Dies könnte einen großen Vorteil der Anreicherung von CTCs mittels rVAR2 zeigen, da diese nicht auf EpCAM-Positivität angewiesen sind. Somit kann vermutet werden, dass auch die gering EpCAM exprimierenden oder EpCAM negativen CTCs sich gut mittels rVAR2-ofCS Bindung anreichern lassen.

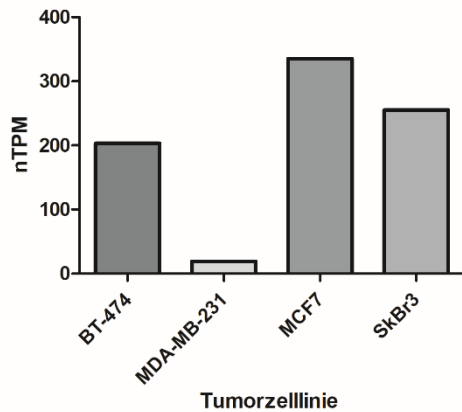


Abb. 19: EpCAM Expression in Brustkrebszelllinien

Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Tumorzelllinien. Die y-Achse zeigt die normalisierte Transkriptexpression, nTPM= *normalized transcripts per million*. Die Grafik ist angelehnt an den Daten aus „*The Human Protein Atlas*“ [72].

Die Experimente zur Anreicherung wurden nach Erythrozytenlyse durchgeführt, um die Qualität der Anreicherung selbst so wenig wie möglich zu beeinflussen und vergleichbare Ergebnisse zu generieren. Weiterführend muss auch ein Hinzugeben der Zelllinienzellen vor der Erythrozytenlyse durchgeführt werden, um den Einfluss der Lyse auf die Wiederfindungsraten zu bestimmen. Um noch verlässlichere Aussagen über die unterschiedlichen Wiederfindungsraten der verschiedenen Zelllinien treffen zu können, müssen weiterhin noch mehr Daten gesammelt werden.

Interessant wäre es zu sehen, ob ebenfalls ein Unterschied in den Wiederfindungsraten von Patientinnen-CTCs der verschiedenen Subtypen des Primärtumors besteht, da ein wichtiges Kriterium für die Umsetzung des *Workflows* in der Klinik ein universelles Vorhandensein der ofCS-Zielstruktur und die sensitive und spezifische Bindung des rVAR2 an ofCS ist.

Abschließend ist die Frage nicht geklärt, wie hoch die Bindeaffinität sein muss, um eine stabile rVAR2-ofCS Bindung zu erreichen, damit eine möglichst effiziente magnetische Anreicherung stattfinden kann, ohne die Zellen zu verlieren.

Sand *et al.* verglichen ebenfalls die Wiederfindungsraten verschiedener Tumorzelllinienzellen [64]. Hier zeigte sich, mittels indirekter Anreicherungsmethode, eine sehr hohe Wiederfindungsrate unter anderem für A549 Tumorzelllinienzellen von 98 % [64], welche in dieser Arbeit lediglich mit einer Wiederfindungsrate von 67,33 % \pm 11,64 % angereichert werden konnten. Ein direkter Vergleich der Wiederfindungsraten zu den in dieser Arbeit generierten

Daten ist nicht möglich, da einige Schritte im *Workflow* differieren. Zunächst wurde in den Versuchen von Sand *et al.* lediglich 3 mL Spenderblut verwendet, was zu einer geringeren Menge an PBMCs führt und wiederum sowohl bei der Anreicherung als auch bei der Auswertung durch einen geringeren Hintergrund von Vorteil ist. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass in einem klinischen *Setting* eine Menge an 3 mL Blut zu gering wäre, um die seltenen CTCs verlässlich anzureichern [73]. Das *Spike-in* der Tumorzellen geschah bei Sand *et al.* vor der Erythrozytenlyse [64]. Da in dieser Arbeit die Wiederfindungsraten bei einem *Spike-in* nach der Erythrozytenlyse generiert wurden, gilt es hier weitere Daten mit einem *Spike-in* nach der Lyse zu generieren. Sand *et al.* verwendeten Sera-Mag SpeedBeads (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), welche sich unter anderem im Durchmesser von nur 1 µm zu den hier verwendeten Dynabeads Biotin Binder unterscheiden [64]. Des Weiteren erfolgte bei Sand *et al.* die Anreicherung mittels eines nicht weiter spezifiziertem Magneten [64]. In dieser Arbeit wurde der KingFisher zur Anreicherung verwendet. Wie hoch der Verlust an Tumorzellen durch die Anreicherung mittels KingFisher und den zum Protokoll gehörenden Waschschritten ist, ist schwierig zu bestimmen. Insgesamt ist jedoch mit Hilfe des KingFishers ein höherer Durchsatz an Proben möglich und eine höhere Reliabilität bei verschiedenen durchführenden Untersuchern gegeben. Die Auswertung erfolgte bei Sand *et al.* mit Hilfe des Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader und der Gen5 Software (beides BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) zur Differenzierung der angereicherten Tumorzellen [64]. In dieser Arbeit wurden die Experimente zur Anreicherung manuell mit dem CellCelector ausgewertet.

4.2.2 Rahmenbedingungen

Zu Beginn der Etablierung eines *Workflows* ist es von Bedeutung die Anzahl potenzieller Fehlerquellen im Experimentaufbau so gering wie möglich zu halten. Mögliche Fehlerquellen und Einflussfaktoren auf die ofCS-rVAR2 Bindung sind zum Beispiel Einflüsse auf die Intaktheit des ofCS.

Bereits zu Beginn der Experimente mit Zelllinienzellen sind die Wachstumsdichte der Zellen sowie deren Ablösepuffer von Bedeutung. Das Experiment der Bindeaffinität nach unterschiedlichen Ablösepuffern zeigt eine verminderte Affinität nach Ablösung der Zellen mittels Trypsin. Trypsin wirkt zerstörend auf die Struktur des ofCS durch eine enzymatische Entfernung der Proteoglykane, mit denen die

ofCS-Ketten verbunden sind [74]. Die stark proteinspaltende Wirkung beeinflusst daher die Zielstruktur von rVAR2 und es würde folglich zu einer verminderten Anreicherung kommen. Der *Cell Dissociation Buffer* hingegen ist enzymfrei und löst die Zellen sanft ab, sodass die Zelloberfläche intakt bleibt [75]. Auch eine Ablösung mittels Accutase scheint die Bindeaffinität des rVAR2 nicht zu beeinflussen. Accutase enthält zwar ebenfalls proteolytische Enzyme, diese sind jedoch nicht tierischen Ursprungs und führen zu einer höheren Überlebensfähigkeit [76].

Die Medien der unterschiedlichen Blutabnahmeröhrchen bieten einen großen Einflussfaktor auf die Intaktheit der Zellen. Für die schnelle Prozessierung von Blutproben werden bei der Einzelzellanalyse häufig EDTA-Röhrchen verwendet. In diesen sind die Zellen wie auch ihre Oberflächenstruktur nicht lange haltbar. Seit der Einführung des CellSearch stehen die CellSave Röhrchen zur Stabilisierung von CTCs für bis zu 96 h bei RT zur Verfügung [65]. Das Experiment zum Einfluss des CellSave Mediums auf die rVAR2 Bindeaffinität zeigt einen negativen Einfluss auf die Bindeaffinität und somit vermutlich auch auf die Wiederfindungsrate bei längerem Verbleib der Zellen im CellSave Röhrchen. Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit liegt dies an einer Zerstörung der Glycosaminoglykanketten durch CellSave, die als Zielstruktur der rVAR2 Bindung gelten. Als Fixans ist Paraformaldehyd (PFA) weit verbreitet. Die genaue Zusammensetzung des CellSave Mediums ist nur dem Hersteller bekannt und daher dessen Einfluss auf die zu isolierenden Zellen schwer abschätzbar. Es konnte gezeigt werden, dass PFA zu einem Verlust von Epitopen führt und sterisch den Zugang von Antikörpern an ihre Antigene behindert [77]. Dies könnte zu einem Problem bei größeren Multicenterstudien führen, die auf einen Versand der Proben angewiesen sind. Eine Alternative würde das Einfrieren von Patientenproben darstellen. Franken *et al.* konnten bereits zeigen, dass durch Kryopräservierung die CTC-Qualität und Viabilität nicht beeinflusst wird. Die EpCAM-abhängige Anreicherung von aufgetauten Blutprodukten zeigten nur einen geringen Tumorzellverlust [78]. Ob Einfrieren eine Möglichkeit auch für eine rVAR2-ofCS-abhängige Anreicherung darstellt, bleibt weiter zu untersuchen.

4.2.3 Vergleich verschiedener rVAR2 Proteine

Das initiale Protein VAR2CSA wird von Erythrozyten exprimiert, welche mit *Plasmodium falciparum* infiziert sind. Es dient eigentlich als Adhäsionsprotein im

Gefäßsystem, um eine Eliminierung durch den Wirt zu umgehen. VAR2CSA bindet einen bestimmten Typ Chondroitinsulfat auf den Synzytiotrophoblasten der Plazenta und führt somit zu einer Sequestration der Erythrozyten in das Gewebe der Plazenta [59, 79]. Initial wurde es nötig, die Binderegion des VAR2CSA genauer zu definieren, um eine Impfung zu etablieren, bei der Antikörper sich gegen die VAR2CSA Binderegion richten und somit eine plazentare Übertragung von *Plasmodium falciparum* auf das Kind verhindern. VAR2CSA ist ein großes Protein (350 kDa) bestehend aus sechs *Duffy binding-like* (DBL) *domains*, eine Cysteinreiche *interdomain region* zwischen DBL2X und DBL3X und eine Zahl an *interdomains* [80]. Die minimale Chondroitin-Binderegion des VAR2CSA beinhaltet DBL2X mit den flankierenden *interdomains* (ID) *regions* ID1 und ID2a [57, 80].

Die bestehenden Daten der Arbeitsgruppe Agerbæk *et al.* beruhen bisher auf dem rekombinanten Protein DBL1-ID2a (121 kDa) [61]. Sand *et al.* verglichen das bestehende rVAR2 Protein mit einem neuen rekombinanten rVAR2 ID1-ID2a, welches kleiner ist (71 kDa) und andere Subfragmente umfasst. Beide Formen des rVAR2 sind definiert als ofCS spezifisch und affin und haben einen SpyTag [64, 80]. Es konnte bei Sand *et al.* keine Überlegenheit eines der Proteine festgestellt werden [64]. In dieser Arbeit zeigte sich mittels indirekter Anreicherungsmethode sowie 30 µL Dynabeads Biotin Binder eine signifikant höhere Wiederfindungsrate der A549 Tumorzellen mit dem rVAR2 DBL1-ID2a im Vergleich zum rVAR2 ID1-ID2a.

4.2.4 Vergleich verschiedener rVAR2 zu SpyCatcher Verhältnisse

Die direkte Konjugation des rVAR2 Proteins an die magnetischen *Beads*, ohne die Bindungskapazität des rVAR2 an ofCS zu mindern, gestaltet sich schwierig. Um dieses Problem zu umgehen, werden die magnetischen *Beads* mit rVAR2 beschichtet, indem ein Protein-Linker verwendet wird, der sogenannte SpyC. Das Protein rVAR2 hat ein SpyTag Peptid, welches eine isopeptidische Verbindung mit dem 13kDa großen SpyC Protein eingeht. Dieses SpyC Protein wiederum ist biotinyliert. Dieser biotinylierte SpyC-rVAR2 Komplex wird an mit Streptavidin überzogenen *Beads* immobilisiert [61].

Agerbæk *et al.* verwendeten für die Anreicherung der CTCs ein rVAR2 zu SpyC Verhältnis von 1,2:1. Dieses Verhältnis wurde unter direkter Anreicherungsmethode getestet [61]. Da das bekannte rVAR2 zu SpyC Verhältnis bisher nur für die direkte Anreicherung sowie mit anderen *Beads* getestet wurde, wurden unterschiedliche

rVAR2 zu SpyC Verhältnisse und deren Einfluss auf die Wiederfindungsrate unter Verwendung von Dynabeads Biotin Binder und der indirekten Methode getestet. Die Variation der Verhältnisse ist bei gleichbleibender rVAR2 Konzentration von einer ansteigenden SpyC-Konzentration abhängig. Es zeigt sich deutlich, dass eine geringere Konzentration an SpyC als rVAR2 zu einer höheren Wiederfindungsrate führt.

Dies erscheint paradox, da mit weniger SpyC auch eine geringere Menge an rVAR2-SpyC Komplexe gebildet werden können, die für die Zellanreicherung zur Verfügung stehen. rVAR2 wird zunächst mit SpyC inkubiert und daraufhin zur Zellprobe gegeben. Nach erneuter Inkubation wird nicht gebundenes rVAR2 mittels dreier Waschschriffe abzentrifugiert. Durch diese Waschschriffe würde auch freies SpyC entfernt werden. Freies SpyC kann durch seine fehlende ofCS-Bindungsstelle nicht an Tumorzellen binden. Es stellt sich so die Frage, wieso eine höhere SpyC-Konzentration im Verhältnis zu rVAR2 zu einer signifikant schlechteren Wiederfindungsrate führt. Sand *et al.* konnten bei sehr hohen rVAR2-SpyC Konzentrationen bei Verwendung der Sera-Mag SpeedBeads eine *Bead*-Aggregation feststellen [64]. Dies würde eine mögliche Erklärung für eine geringere Wiederfindungsrate bei höherer SpyC-Konzentration darstellen. SpyC ist mehrfach biotinyliert. Überschüssiges SpyC, welches nicht an den SpyTag des rVAR2 gebunden hat und nach den Waschschriffen in der Zellprobe verbleibt, kann an verschiedenen Streptavidin-Bindestellen mehrerer *Beads* binden und so zu einer Aggregation führen.

4.2.5 Etablierung von *Beads* und Anreicherungstechnik

Agerbæk *et al.* zeigten eine mögliche CTC-Anreicherung verschiedener Tumorentitäten wie Pankreas-, Leber-, Prostata- und Lungenkarzinom mittels rVAR2-ofCS Bindung anhand des IsoFlux [61]. Der IsoFlux ist ein semiautomatisiertes immunomagnetisches System, welches mittels Hersteller-Kit eine EpCAM-abhängige, *Bead*-basierte CTC-Anreicherung ermöglicht. Durch das Verwenden von Dynabeads M-450 Epoxy oder mit Streptavidin beschichteten *Beads* kann ein hohes Maß an Flexibilität bezüglich der Zielstruktur erreicht werden. Der KingFisher wurde von Wu *et al.* erstmals zur Anreicherung seltener Zellen verwendet [51]. Durch die flexible Einstellung des Protokolls und die Möglichkeit der

Verwendung unterschiedlicher *Beads*, ist auch dieses System für eine CTC-Anreicherung mittels rVAR2-ofCS Bindung zu verwenden.

Die Wiederfindungsrate mittels Dynabeads M-450 Epoxy und dem IsoFlux-System von vorgefärbten A549 Zelllinienzellen, die nach Erythrozytenlyse hinzugefügt wurden, ist mit einer Wiederfindungsrate von $13,53 \% \pm 2,23 \%$ vergleichsweise gering. Im IsoFlux lassen sich vier Proben in einem Durchlauf zeitgleich analysieren. Es zeigte sich, dass trotz gleicher Bedingungen und zeitgleichem Prozessieren der Proben die Wiederfindungsraten teilweise stark voneinander abweichen. Eine mögliche Erklärung bietet die ungerichtete Bindung des rVAR2 Proteins an die Epoxidgruppen der *Beads*. Durch die ungerichtete Bindung kann eine Blockierung der ofCS-Bindedomäne des Proteins entstehen, die die Wiederfindungsrate der Tumorzellen minimiert. Auch der KingFisher zeigte eine geringe Wiederfindungsrate mittels Dynabeads M-450 Epoxy von $8,25 \% \pm 6,71 \%$.

Im Gegensatz zu den Dynabeads M-450 Epoxy erlauben die CELLection Biotin Binder Dynabeads sowie Dynabeads Biotin Binder eine gerichtete Bindung des Proteins. Das rVAR2 Protein besitzt einen SpyTag, an welches das biotinylierte SpyC Protein binden kann. SpyC dient also als Linker zwischen rVAR2 und *Bead* und würde somit auch ein späteres Ablösen der angereicherten Zelle von den *Beads* erleichtern. Der Unterschied zwischen den CELLection Biotin Binder Dynabeads und den Dynabeads Biotin Binder liegt vor allem in der Größe. Während die CELLection Biotin Binder Dynabeads wie die anderen *Beads* einen Durchmesser von $4,5 \mu\text{m}$ haben, beträgt der Durchmesser der Dynabeads Biotin Binder nur $2,8 \mu\text{m}$. Unter Verwendung der direkten Methode lassen sich zwischen den Wiederfindungsraten der beiden *Beads* bei den Konzentrationen $4,5 \mu\text{L}$ CELLection Biotin Binder Dynabeads und $6,3 \mu\text{L}$ Dynabeads Biotin Binder kaum Unterschiede entdecken. Eine höhere Wiederfindungsrate mittels Dynabeads Biotin Binder lassen sich erst bei der Konzentration von $30 \mu\text{L}$ sehen. Da vor allem ein größerer Durchmesser der *Beads* eine höhere magnetische Kraft und somit eine bessere Anreicherung bedeutet, stellt sich die Frage weshalb die CELLection Biotin Binder Dynabeads den kleineren Dynabeads Biotin Binder keine Überlegenheit zeigen. Kleinere *Beads* werden daher auch eher zur Anreicherung von Nukleinsäuren oder Proteinen verwendet, wo hingegen mit den größeren $4,5 \mu\text{m}$ bemessenden *Beads* eher Zellen angereichert werden. Eine mögliche Erklärung

wäre, dass die rVAR2 Bindung schwächer ist als eine Antikörperbindung. Aufgrund dessen werden für eine effektive Anreicherung mehr Bindungen benötigt. Eine hohe Anzahl an Dynabeads Biotin Binder können durch die geringe Größe mehr binden und stellen somit eine größere Oberfläche mit mehr Bindungsmöglichkeiten zur Verfügung. Weiterhin zeigen die CELLection Biotin Binder Dynabeads eine höhere Autofluoreszenz, welche die Detektion der CTCs unter dem Fluoreszenzmikroskop erschwert und ein weiteres Kriterium gegen das Verwenden der CELLection Biotin Binder Dynabeads darstellt.

Die Dynabeads Biotin Binder wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Wu *et al.* berechneten die Konzentration basierend auf der Größe der *Beads* im Fluxion *IsoFlux CTC Enrichment Kit*, welche einen Durchmesser von 4,2 μm besitzen. Es wurde die Oberfläche der IsoFlux *Beads* berechnet und anhand dessen die Menge der Thermo Fisher Dynabeads, in Abhängigkeit ihrer Größe und Konzentration nach Herstellerangaben, bestimmt. Die Menge von 6,3 μL Dynabeads Biotin Binder sowie die ungefähr fünffache und zehnfache Menge wurden getestet [51]. Auf Grundlage dessen wurde sich für die drei unterschiedlichen *Bead*-Konzentrationen für die Dynabeads Biotin Binder entschieden. Die höchste Wiederfindungsrate konnte mit den Dynabeads Biotin Binder bei 30 μL pro Patientenprobe erreicht werden. Sowohl die geringere Menge von 6,3 μL als auch eine doppelt so hohe Konzentration von 60 μL führt zu einer geringeren Wiederfindungsrate. Bei 60 μL *Beads* pro Probe zeigen sich verstärkt Verklumpungen der *Beads* sowie eine erschwerte Detektion der Zellen im Fluoreszenzmikroskop.

Für die Etablierung eines rVAR2 gestützten *Workflows* wurde sich für die Anreicherung mittels KingFisher entschieden. Bei der Anreicherung mittels IsoFlux ließen sich, trotz zeitgleicher Prozessierung von Proben unter denselben Bedingungen, teilweise sehr heterogene Wiederfindungsraten erzielen. Auch zeigten sich die angereicherten Zellproben mittels der kleineren Dynabeads Biotin Binder meist verklumpt und schlechter auszuwerten. Die Zellprobe fließt im IsoFlux durch einen mikrofluidischen Kanal an einem magnetischen Feld vorbei. Hier besteht nur eine, im Vergleich zum KingFisher, kurze Möglichkeit der mit *Beads* beladenen Zellen an den Magneten zu binden. Hier wird eine Limitation des IsoFlux mit den Dynabeads Biotin Binder gesehen, da durch den geringeren Durchmesser

eine stärkere magnetische Kraft auf die *Beads* wirken muss. Beim KingFisher Protokoll lassen sich die Kontaktzeit zwischen Magnet und Probe individuell einstellen und zeigen daher, auch bei den kleineren *Beads*, eine hohe reproduzierbare Wiederfindungsrate.

4.2.6 Anreicherungsverfahren

Die indirekte Methode ist dadurch definiert, dass der Ligand ohne *Bead* zuerst an die Zielstruktur bindet. Diese Methode ist auch eine häufig angewandte Methode für die Depletion von Zellen. Die indirekte Methode zeigt sich von Vorteil, wenn die Bindeaffinität der Antikörper oder wie in diesem Fall des Proteins geringer ist und die Zellen eine geringe Anzahl an Antigenen exprimieren [81]. Die Anreicherung im KingFisher konnte mittels Dynabeads Biotin Binder und der indirekten Methode die höchste Wiederfindungsrate erreichen. Auch Sand *et al.* konnten einen Anstieg der Wiederfindungsrate mittels indirekter Methode im Vergleich zur direkten Anreicherung aufzeigen. Es wird vermutet, dass freies rVAR2 Protein einen besseren Zugang zu seiner Zielstruktur ofCS zeigt, als rVAR2 welches bereits an den magnetischen *Beads* immobilisiert wurde [64].

Bei sowohl der doppelt indirekten wie auch der semi-indirekten Methode werden rVAR2 und SpyC erst zusammen inkubiert, wenn das rVAR2 bereits an den Tumorzellen gebunden hat. Es kann vermutet werden, dass der Zugang des SpyC durch die Immobilisation des rVAR2 vermindert ist.

4.3 Limitation der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer, EpCAM-unabhängiger *Workflow* für die Anreicherung von CTCs etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung von Tumorzellen, insbesondere Brustkrebszelllinienzellen, mittels rVAR2-ofCS Bindung möglich ist. In folgenden Studien muss jedoch die Anwendbarkeit dieses *Workflows* zur Anreicherung und weiteren Isolation von Patienten-CTCs geprüft werden. Weiterhin stellen sich technische Fragen zur Weiterentwicklung des *Workflows*. Das Ablösen der magnetischen *Beads* nach Anreicherung der Patientenzellen stellt eine Herausforderung dar. Weiterhin wurden die Experimente der vorliegenden Arbeit mittels vorgefärbten Tumorzellen durchgeführt. Es ergibt sich somit die Notwendigkeit ein Färbeprotokoll zu entwickeln, welches alle angereicherten Patienten-CTCs als solche erkennt.

4.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Diese Arbeit konnte zeigen, dass das Protein rVAR2 mit hoher Affinität im Vergleich zu PBMCs an die Brustkrebszelllinienzellen bindet. Es zeigt sich nicht nur eine spezifische Bindung an die Zelllinienzellen, sondern auch eine spezifische Bindung an Patienten-CTCs. Aufgrund der noch wenig bekannten Zielstruktur ofCS wurden zu Beginn äußere Einflüsse auf eine negative Auswirkung auf die rVAR2 Bindeaffinität getestet. Bei der Versendung von Patientenproben in CellSave Röhrchen, wie es für Multicenterstudien wie zum Beispiel den DETECT Studien durchgeführt wird, ist mit einer schlechteren Wiederfindungsrate zu rechnen, je länger die Proben im CellSave Medium verweilen. Die Erythrozytenlyse stellt die Separationslösung der Wahl dar. Nach Test des IsoFlux sowie KingFishers mit unterschiedlichen Anreicherungsverfahren sowie *Beads* und deren Konzentrationen, wurde die höchste Wiederfindungsrate mittels KingFisher und 30 µL Dynabeads Biotin Binder erreicht. Weiterhin wurde der Einfluss von in der Größe variierenden rVAR2 Proteinen getestet und aufgrund der höheren Wiederfindungsrate sich für das 121 kDa Protein DBL1-ID2a entschieden. Da die Dynabeads Biotin Binder sich als die effektivsten *Beads* für die Anreicherung herausstellten, musste ein biotinyliertes SpyC Protein verwendet werden. Das Verhältnis von rVAR2-Protein und SpyC mit der höchsten Wiederfindungsrate betrug 1,2:1. Mittels des etablierten *Workflows* ließen sich Zelllinien aller Brustkrebssubgruppen anreichern. Die EpCAM gering exprimierende Zelllinie MDA-MB-231 zeigt interessanterweise die höchste Wiederfindungsrate mittels rVAR2. Ein großer Vorteil wäre somit, mittels rVAR2 CTCs ohne epitheliale Marker und hiermit eine größere Subpopulation an CTCs von möglicherweise aggressiverer und invasiverer Natur zu isolieren [71]. Weiterhin könnte die rVAR2-ofCS Bindung nicht nur zur Detektion und zu Isolationszwecken dienen. Bang *et al.* konnten die Bindung des rVAR2 an potenziell therapierelevante CSPGs in Gliompatienten zeigen [82]. Somit könnte rVAR2 ebenfalls zur Identifikation möglicher Biomarker für eine weitere *Targeted Therapy* dienen. Eine weitere Analyse der Bindungsziele des rVAR2 Proteins auf Brustkrebszellen ist hierfür unumgänglich. Basierend auf dem molekularen Profil der CTCs und der Informationen des Primärtumors, ist es das Ziel eine möglichst effektive, personalisierte Therapie zu entwickeln. Franken *et al.* konnten bereits in einer Longitudinalstudie anhand einer Indexpatientin zeigen, dass eine Therapiewahl, basierend auf dem Mutationsstatus kombiniert mit einer

weiteren multiparametrischen Charakterisierung von CTCs, zu einer signifikanten Reduktion an CTCs und einer Stagnation der Tumorprogression der Mammakarzinompatientin führt [83]. Sicherlich sind weitere Studien mit größerem Patientenkollektiv sowie Studien hinsichtlich klinischer Praktikabilität notwendig.

5 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization and The Global Cancer Observatory. *All Cancers*. 2018 2019, March [cited 2020 21.06.]; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
2. Robert Koch Institut. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2019 [cited 2020 21.06.]; 12:[Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile.
3. Weinberg, R.A., *The biology of Cancer*. Second ed. 2014: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov*, 2022. **12**(1): p. 31-46.
7. Martelotto, L.G., et al., *Breast cancer intra-tumor heterogeneity*. *Breast Cancer Res*, 2014. **16**(3): p. 210.
8. Cottu, P.H., et al., *Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer*. *Ann Oncol*, 2008. **19**(3): p. 596-597.
9. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(10): p. 883-892.
10. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. *Cell*, 2017. **168**(4): p. 670-691.
11. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
12. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
13. Klein, C.A., *Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization*. *Nat Rev Cancer*, 2020. **20**(11): p. 681-694.
14. Rojas, K. and A. Stuckey, *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors*. *Clin Obstet Gynecol*, 2016. **59**(4): p. 651-672.

15. Lebeau, A., et al., [*Invasive breast cancer: the current WHO classification*]. *Pathologie*, 2014. **35**(1): p. 7-17.
16. Makki, J., *Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance*. *Clin Med Insights Pathol*, 2015. **8**: p. 23-31.
17. Vuong, D., et al., *Molecular classification of breast cancer*. *Virchows Arch*, 2014. **465**(1): p. 1-14.
18. Tao, Z., et al., *Breast Cancer: Epidemiology and Etiology*. *Cell Biochem Biophys*, 2015. **72**(2): p. 333-8.
19. Anderson, K.N., R.B. Schwab, and M.E. Martinez, *Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **144**(1): p. 1-10.
20. Wang, H., et al., *Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion*. *Oncotarget*, 2017. **8**(1): p. 1884-1912.
21. Alix-Panabières, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer*. *Clin Chem*, 2013. **59**(1): p. 110-8.
22. Allan, A.L. and M. Keeney, *Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic*. *J Oncol*, 2010. **2010**: p. 426218.
23. Paterlini-Brechot, P. and N.L. Benali, *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions*. *Cancer Lett*, 2007. **253**(2): p. 180-204.
24. Tibbe, A.G., M.C. Miller, and L.W. Terstappen, *Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells*. *Cytometry A*, 2007. **71**(3): p. 154-62.
25. Gorges, T.M., et al., *Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 178.
26. Ueo, H., et al., *Circulating tumour cell-derived platin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer*. *Br J Cancer*, 2015. **112**(9): p. 1519-26.
27. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. *Science*, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
28. Alix-Panabières, C., D. Marchetti, and J.E. Lang, *Liquid biopsy: from concept to clinical application*. *Sci Rep*, 2023. **13**(1): p. 21685.
29. Banys-Paluchowski, M., N. Krawczyk, and T. Fehm, *Liquid Biopsy in Breast Cancer*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2020. **80**(11): p. 1093-1104.

30. Fehm, T.N., et al., *Diagnostic leukapheresis for CTC analysis in breast cancer patients: CTC frequency, clinical experiences and recommendations for standardized reporting*. Cytometry A, 2018. **93**(12): p. 1213-1219.
31. Janni, W.J., et al., *Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(10): p. 2583-93.
32. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(8): p. 781-91.
33. Bidard, F.C., et al., *Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data*. Lancet Oncol, 2014. **15**(4): p. 406-14.
34. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(7): p. 1420-30.
35. Smerage, J.B., et al., *Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500*. J Clin Oncol, 2014. **32**(31): p. 3483-9.
36. Bidard, F.C., et al., *Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2021. **7**(1): p. 34-41.
37. Mader, S. and K. Pantel, *Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives*. Oncol Res Treat, 2017. **40**(7-8): p. 404-408.
38. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
39. Gangnus, R., et al., *Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3457-64.
40. Riethdorf, S., et al., *Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(9): p. 2634-45.
41. Jacot, W., et al., *Actionability of HER2-amplified circulating tumor cells in HER2-negative metastatic breast cancer: the CirCe T-DM1 trial*. Breast Cancer Res, 2019. **21**(1): p. 121.
42. Fehm, T., et al., *Efficacy of Lapatinib in Patients with HER2-Negative Metastatic Breast Cancer and HER2-Positive Circulating Tumor Cells-The DETECT III Clinical Trial*. Clin Chem, 2024. **70**(1): p. 307-318.
43. Cabel, L., et al., *Circulating tumor cells: clinical validity and utility*. Int J Clin Oncol, 2017. **22**(3): p. 421-430.

44. Harouaka, R.A., M. Nisic, and S.Y. Zheng, *Circulating tumor cell enrichment based on physical properties*. J Lab Autom, 2013. **18**(6): p. 455-68.
45. Farace, F., et al., *A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas*. Br J Cancer, 2011. **105**(6): p. 847-53.
46. Vona, G., et al., *Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 57-63.
47. Hur, S.C., et al., *Deformability-based cell classification and enrichment using inertial microfluidics*. Lab Chip, 2011. **11**(5): p. 912-20.
48. Andreopoulou, E., et al., *Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system*. Int J Cancer, 2012. **130**(7): p. 1590-7.
49. Harb, W., et al., *Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay*. Transl Oncol, 2013. **6**(5): p. 528-38.
50. Correnti, M. and C. Raggi, *Stem-like plasticity and heterogeneity of circulating tumor cells: current status and prospect challenges in liver cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(4): p. 7094-7115.
51. Wu, J., et al., *Magnetic-Based Enrichment of Rare Cells from High Concentrated Blood Samples*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
52. Hofman, V., et al., *Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method*. Int J Cancer, 2011. **129**(7): p. 1651-60.
53. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 920-8.
54. Allard, W.J., et al., *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6897-904.
55. Bednarz-Knoll, N., C. Alix-Panabières, and K. Pantel, *Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(3-4): p. 673-87.
56. Fried, M. and P.E. Duffy, *Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta*. Science, 1996. **272**(5267): p. 1502-4.

57. Salanti, A., et al., *Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein*. *Cancer Cell*, 2015. **28**(4): p. 500-514.
58. Baston-Büst, D.M., et al., *Syndecan-1 knock-down in decidualized human endometrial stromal cells leads to significant changes in cytokine and angiogenic factor expression patterns*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010. **8**: p. 133.
59. Salanti, A., et al., *Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria*. *J Exp Med*, 2004. **200**(9): p. 1197-203.
60. Clausen, T.M., et al., *Oncofetal Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans Are Key Players in Integrin Signaling and Tumor Cell Motility*. *Mol Cancer Res*, 2016. **14**(12): p. 1288-1299.
61. Agerbaek, M.O., et al., *The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 3279.
62. *New England BioLabs Inc., SHuffle T7 Competent E. coli Produktinformation*. [cited 2023 21.08.]; Available from: <https://international.neb.com/products/c3026-shuffle-t7-competent-e-coli#>.
63. *American Type Culture Collection*. [cited 2023 21.08.]; Available from: <https://www.atcc.org/cell-products/human-cells#t=productTab&numberOfResults=24>.
64. Sand, N.T., 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).
65. *CellSave Preservative Tubes Produktinformation*. [cited 2023 21.08.]; Available from: <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsave-preservative-tubes>.
66. *ThermoFisher Scientific Dynabeads M-450 Epoxy Produktinformation*. [cited 2023 22.08.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14011?SID=srch-srp-14011>.
67. *ThermoFischer Scientific CELLection Biotin Binder Kit Produktinformation*. [cited 2023 22.08.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11533D?SID=srch-srp-11533D>.
68. *ThermoFisher Scientific Dynabeads Biotin-Binder Produktinformation*. [cited 2023 22.08.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11047?SID=srch-srp-11047>.
69. Neumann, M.H.D., et al., *Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch®system and the CellCelector™*. *Biotechnology Progress*, 2017. **33**(1): p. 125-132.

70. *Menarini Silicon Biosystems Ampli1 Whole Genome Amplification Produktinformation*. [cited 2023 23.08.]; Available from: <https://www.siliconbiosystems.com/en-us/Whole-Genome-amplification-WGA-QC-ReAmp>.
71. Schneck, H., et al., *EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144535.
72. *The Human Protein Atlas*. [cited 2023 23.08.]; Protein Atlas version 23.0:[Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000119888-EPCAM/cell+line>].
73. Stoecklein, N.H., et al., *Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution*. Expert Rev Mol Diagn, 2016. **16**(2): p. 147-64.
74. *Trypsin Thermo Fisher Scientific Produktinformation*. [cited 2023 25.08.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/25300062?SID=srch-srp-25300062>.
75. *Zelldissoziationspuffer, enzymfrei, PBS Thermo Fisher Scientific Produktinformation*. [cited 2023 25.08.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/13151014?SID=srch-srp-13151014>.
76. *StemPro Accutase Zelldissoziationsreagenz Thermo Fisher Scientific Produktinformation* [cited 2023 25.08.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1110501>.
77. Melan, M.A., *Overview of cell fixation and permeabilization*. Methods Mol Biol, 1994. **34**: p. 55-66.
78. Franken, A., et al., *Label-Free Enrichment and Molecular Characterization of Viable Circulating Tumor Cells from Diagnostic Leukapheresis Products*. Clin Chem, 2019. **65**(4): p. 549-558.
79. Salanti, A., et al., *Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria*. Molecular microbiology, 2003. **49**(1): p. 179-191.
80. Clausen, T.M., et al., *Structural and functional insight into how the Plasmodium falciparum VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria*. J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23332-45.
81. *Thermo Fisher Scientific, Biotin Binder - Depletion or Positive Isolation of Cells from Differenz Species*. [cited 2023 29.08.]; 110.47.indd Rev 002 5-May-2007:[Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/cell-separation-methods/any-species/dynabeads-biotin-binder.html>].

82. Bang-Christensen, S.R., et al., *Capture and Detection of Circulating Glioma Cells Using the Recombinant VAR2CSA Malaria Protein*. *Cells*, 2019. **8**(9).
83. Franken, A., et al., *Multiparametric Circulating Tumor Cell Analysis to Select Targeted Therapies for Breast Cancer Patients*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(23).

6 Anhang

Workflow zur Anreicherung von CTCs

1. Vorbereitung rVAR2
 - 1.1. Mische rVAR2 und SpyC in einem Verhältnis von 1,2:1 durch vorsichtiges auf und ab pipettieren, Konzentration des rVAR2 sollte 200 nM in 600µL Zellprobe entsprechen
 - 1.2. Inkubation für 1h bei RT
 - 1.3. Pipettiere biotinyliertes rVAR2 zu der 600 µL Zellprobe in den *Protein LoBind Tube* (nach Schritt 2.8), berücksichtige Konzentration des rVAR2 nach Charge, um 200 nM in 600 µL Zellprobe zu erhalten
2. Vorbereitung der Blutprobe
 - 2.1. Pipettiere 5 mL der Blutprobe + 45 mL des Erythrozytenlysepuffers in ein Falcon Röhrchen, mische durch Invertieren des Falcon Röhrchens, Inkubation für ca. 10 min bei RT bis die Probe transparent ist nach Lyse
 - 2.2. Zentrifugiere bei 400 g, 8 min, 20°C
 - 2.3. Überstand abnehmen, löse das Zellpellet durch Ziehen über ein *Rack*
 - 2.4. 6ml PBS auf das gelöste Zellpellet pipettieren
 - 2.5. Wiederhole Schritt 2.2. und 2.3.
 - 2.6. Zellpellet in 500 µL PF10 resuspendieren und in einen *Protein LoBind Tube* überführen
 - 2.7. Pipettenspitze beiseitelegen
 - 2.8. 100 µL PF10 in Falcon geben, Spitze wieder aufnehmen und Falcon und Spitze mit 100 µL waschen und zum *Protein LoBind Tube* geben
3. rVAR2-Zell-Bindung
 - 3.1. Inkubation der Zell-Protein-Suspension für 30 min bei langsamer Rotation bei 4°C
 - 3.2. Zentrifugiere die Probe bei 350 g für 8min bei 4°C
 - 3.3. Überstand abnehmen, ohne das Zellpellet zu berühren
 - 3.4. Resuspendiere das Pellet in 600 µL PF10
 - 3.5. Wiederhole Schritt 3.2. bis 3.4 zwei Mal
4. Vorbereitung Dynabeads Biotin Binder
 - 4.1. Transferiere 40 µL *Beads* in einen *Protein LoBind Tube*
 - 4.2. Halte einen Magneten an eine Seite des *Tubes*, Pufferlösung abnehmen
 - 4.3. Entferne den Magneten, füge 1 mL PF Puffer hinzu um die *Beads* zu waschen
 - 4.4. Ziehe die *Beads* mittels Magneten durch den Puffer
 - 4.5. Wiederhole Schritt 4.2 – 4.4
 - 4.6. Halte einen Magneten an eine Seite des *Tubes*, Pufferlösung abnehmen
 - 4.7. Entferne den Magneten und resuspendiere die *Beads* in 40 µL PF
 - 4.8. Füge 30 µL der *Beads* nach Schritt 3.5. zu der Zellprobe
 - 4.9. Inkubiere *Beads* und Zell-Protein-Suspension bei langsamer Rotation für 30min bei 4°C
5. Anreicherung KingFisher
 - 5.1. Transferiere die Zellprobe in die Mikrotitrierplatte des KingFisher, lege die Pipettenspitze zur Seite

- 5.2. Pipettiere 100 μL PF10 in den *Protein LoBind Tube* und wasche diesen mit der zuvor zur Seite gelegten Pipettenspitze, transferiere die 100 μL zu der Probe
- 5.3. Pipettiere 600 μL PF10 als Waschpuffer ebenfalls in die Mikrotitrierplatte
- 5.4. Die Anreicherung mittels KingFisher erfolgt nach eingestelltem Protokoll
- 5.5. Die angereicherten Zellen werden in 100 μL PF10 resuspendiert

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Fehm und meinem Co-Betreuer Herrn Prof. Stoecklein sowie dem Labor der Frauenheilkunde, insbesondere Herrn Dr. Niederacher und Herrn Prof. Neubauer, mit deren Unterstützung, Anregungen und konstruktiver Kritik diese Doktorarbeit erst ermöglicht wurde.

Ich möchte insbesondere André Franken aus dem Team des Labors danken für all die Stunden unermüdliches Einarbeiten, Erklären und die Unterstützung. Ohne die Tischkicker-Turniere in der Mittagspause hätte es nur halb so viel Spaß gemacht. Weiterhin möchte ich Liwen Yang und Mahdi Rivandi danken für ihre Unterstützung.

Außerdem möchte ich Dr. Rui Neves und JunHao Wu aus dem Labor für experimentelle, chirurgische Onkologie danken für die freundliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gebührt Ali Salanti, Mette Agerbæk und Sara R. Bang-Christensen aus dem Institut für Immunologie und Mikrobiologie der Universität Kopenhagen ohne deren Hilfe und regen Austausch diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich Benjamin Oebels sowie meinen Eltern Ursula und Ulrich Wietz einen großen Dank aussprechen. Ihr standet mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hattet ein offenes Ohr für mich. Vielen Dank.