

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

**Charakterisierung EpCAM-unabhängig angereicherter
zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten
Mammakarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von
Alicia Sicking
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Comparative analysis of EpCAM high-expressing and low-expressing circulating tumour cells with regard to their clonal relationship and clinical value 2023, *British Journal of Cancer*

André Franken 1, Annika Kraemer 1, Alicia Sicking 1, Meike Watolla 1, Mahdi Rivandi 1, Liwen Yang 1, Jens Warfsmann 2, Bernhard M Polzer 2, Thomas W P Friedl 3, Franziska Meier-Stiegen 1, Nikolas H Stoecklein 4, Davut Dayan 3, Sabine Riethdorf 5, Volkmar Mueller 6, Klaus Pantel 5, André Koch 7, Andreas D Hartkopf 3, Natalia Krawczyk 1, Eugen Ruckhaeberle 1, Dieter Niederacher 1, Tanja Fehm 1, Hans Neubauer 1

1: Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital and Medical Faculty of the Heinrich-Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany.

2: Division "Personalized Tumor Therapy", Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Regensburg, Germany.

3: Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Ulm, Ulm, Germany.

4: General, Visceral and Pediatric Surgery, University Hospital and Medical Faculty of the Heinrich Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany.

5: Department of Tumor Biology, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

6: Department of Gynecology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

7: Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany..

Investigation of EpCAM negative CTCs as a prognostic and predictive biomarker in metastatic breast cancer

2022, Conference Paper: 64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V.

Alicia Sicking 1, André Franken 1, Annika Kraemer 1, Meike Watolla 1, Mahdi Rivandi 1, Liwen Yang 1, Jens Warfsmann 2, Bernhard M Polzer 2, Thomas W P Friedl 3, Franziska Meier-Stiegen 1, Dieter Niederacher 1, Tanja Fehm 1, Hans Neubauer 1

1: Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital and Medical Faculty of the Heinrich-Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany.

2: Division "Personalized Tumor Therapy", Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Regensburg, Germany.

3: Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Ulm, Ulm, Germany.

Zusammenfassung

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) gelten als Vorläufer der Fernmetastasierung und können als prognostischer und prädiktiver Biomarker fungieren. Ihre Anreicherung basiert hauptsächlich auf immunomagnetischen Anreicherungsverfahren, die auf Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) abzielen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CTCs mit niedriger EpCAM-Expression von diesen Verfahren nicht erfasst werden. Aus diesem Grund haben wir EpCAM-abhängig und -unabhängig angereicherte CTCs hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit als prognostischer und prädiktiver Biomarker verglichen. CTCs wurden aus Blutproben oder EpCAM-depletierten Blutfraktionen (EDF) von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter Verwendung von Antikörpern gegen EpCAM oder Trop2 und CD49f angereichert. Um die Prozessierung zu automatisieren und vergleichbarer zu machen, haben wir die Methode für die EpCAM-unabhängige Anreicherung auf das CellSearch-System – den aktuellen Goldstandard zur CTC-Anreicherung – übertragen. Ihre phylogenetische Verwandtschaft wurde im Anschluss mittels Low-Pass-Sequenzierung und durch die Analyse prädiktiver Punktmutationen untersucht.

Die Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherungsmethode erhöhte die CTC-Positivitätsrate von 77,8 % auf 88,9 % im Vergleich zur alleinigen EpCAM-basierten Anreicherung. Die Analyse der EDF bestätigte, dass eine bestimmte CTC-Population mit dem Trop2-/CD49f-Antikörpergemisch erfasst werden kann, die durch das EpCAM-abhängige Verfahren nicht detektiert werden konnten. Durch die Kombination beider Ansätze konnten CTCs in 100% der analysierten Blutproben nachgewiesen werden. Die CTC-Zahlen, die mit beiden Methoden gemessen wurden, korrelierten mit dem progressionsfreien und dem Gesamtüberleben der Patientinnen.

Trotz morphologischer Unterschiede – Trop2-/CD49f-basiert angereicherte CTCs waren kleiner und weniger zirkulär – wiesen CTCs, die mit beiden Strategien angereichert waren, ähnliche genomische Aberrationen und identische prädiktive Mutationen auf, so dass wir davon ausgehen können, dass sie ähnliche genomische Tumorzellklone repräsentieren. Daher könnten EpCAM-negative CTCs als Tumorsurrogatmaterial von klinischer Relevanz verwendet werden, insbesondere wenn keine EpCAM-positiven CTCs nachgewiesen werden.

Summary

Circulating tumor cells (CTCs) are considered as precursors of distant metastatic spread and can act as a prognostic and predictive biomarker. Their enrichment is mainly based on immunomagnetic technologies targeting antibodies against the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). However, it was shown that CTCs with low expression of EpCAM are not captured by such approaches.

Therefore, we compared EpCAM dependently and EpCAM independently isolated CTCs regarding their utility as a prognostic and predictive biomarker.

CTCs were enriched from blood samples or EpCAM depleted blood fractions (EDF) of metastatic breast cancer patients using antibodies targeting EpCAM or Trop-2 and CD-49f. To automate and make the results more comparable we transmitted the workflow for EpCAM-independent enrichment into the CellSearch system. Their phylogenetic relationship was examined by low pass sequencing comparing predictive mutations.

Cell enrichment with antibodies targeting Trop-2 and CD-49f increased the CTC-positivity rate from 77.8% to 88.9% compared to EpCAM-based enrichment alone. Analysis of the EDF confirmed that a certain CTC population can be captured using the Trop2/CD49f antibody cocktail, that was missed out by targeting EpCAM. Combining both approaches, CTCs were detected in 100% of the analyzed blood samples. CTC numbers measured with both methods correlated with progression free and overall survival.

Despite morphological differences – Trop2/CD49f-based enriched CTCs were smaller and less circular – CTCs enriched with both strategies presented similar genomic aberrations and identical predictive mutations, so that we can assume that they are representing similar genomic tumor cell clones. Therefore, EpCAM negative CTCs could be used as a tumor surrogate material of clinical relevance especially if no EpCAM-positive CTCs are detected.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1.	Epidemiologie und klinische Relevanz der Krebserkrankungen	10
1.2.	Genese einer Krebserkrankung	10
1.3.	Brustkrebs	11
1.3.1.	Epidemiologie	11
1.3.2.	Risikofaktoren und Früherkennung	11
1.3.3.	Subtypen	12
1.3.4.	Metastasierung	12
1.4.	Zirkulierende Tumorzellen (CTCs).....	14
1.4.1.	Klinische Bedeutung	14
1.4.2.	Anreicherungsmethoden von CTCs aus Vollblut	16
1.4.3.	Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und EpCAM	17
1.4.4.	Anreicherung EpCAM-negativer CTCs	18
1.5.	Ziel der Arbeit	22
2.	Material	24
2.1.	Patientinnenkollektiv	24
2.2.	Chemikalien	24
2.3.	Puffer	25
2.4.	Medium	25
2.5.	Zelllinien	26
2.6.	Verwendete Antikörper.....	26
2.7.	Verwendete Kits	27
2.8.	Verbrauchsmaterialien	28
2.9.	Geräte	29
2.10.	Software.....	30

3. Methoden	31
3.1. Methoden der Zellkultur	31
3.1.1. Kultivierung	31
3.1.2. Subkultivierung	31
3.1.3. Kryokonservierung	31
3.1.4. Auftauen der kryokonservierten Zellen	32
3.1.5. Ernten der ausgesähten Zellen	32
3.2. Anreicherungsmethoden	33
3.2.1. Vorbereitung von Zelllinienzellen für <i>Spike-In</i> -Experimente	33
3.2.2. Gewinnung der mononukleären Zellfraktion aus Vollblut	33
3.2.3. Inkubation mit biotinylierten Antikörper	34
3.2.4. Trop2-/CD49f-abhängige CTC-Anreicherung mittels IsoFlux	34
3.2.4.1. Färbung der angereicherten Zellen in Suspension	36
3.2.4.2. Ablösen der <i>Beads</i>	36
3.2.4.3. Färbung von Präparaten aus dem Cytospin nach dem Ablösen der <i>Beads</i>	37
3.2.4.4. Platzierung und Färbung der Probe auf Sievewell <i>Multiwell Slides</i> ...	37
3.2.1. EpCAM-abhängige Anreicherung mittels CellSearch	39
3.2.2. CTC-Anreicherung mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf....	40
3.2.3. Analyse der Proben und Isolation der Einzelzellen im CellCelector	41
3.3. Methoden der CTC-Analyse	42
3.3.1. Expressionsanalyse E-Cadherin und Vimentin	42
3.3.2. Analyse der Zellmorphologie	42
3.3.3. DNA-Amplifikation mittels <i>Whole Genome Amplification (WGA)</i>	42
3.3.4. DNA-Analysen der isolierten CTCs	42

4. Ergebnisse	43
4.1. Etablierung der Immunfluoreszenzfärbungen an Zelllinienzellen	43
4.2. Vergleich EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger Anreicherung von Zelllinienzellen im IsoFlux	45
4.3. Anreicherung von Sk-Br-3-Zellen aus EDFs	46
4.4. EpCAM-unabhängige Anreicherung von zusätzlichen MDA-MB-231-Zellen im IsoFlux-System nach Prozessierung mittels CellSearch	48
4.5. Gewährleistung hoher <i>Recovery</i> -Zahlen bei guter DNA-Qualität durch Optimierung des Färbevorgangs.....	49
4.6. Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung mittels CellSearch... 52	
4.6.1. Erste <i>Spike-In</i> -Experimente.....	52
4.6.2. Titration CD49f-Antikörper für die CellSearch-Anreicherung	55
4.6.3. Titration Trop2-Antikörper für die CellSearch-Anreicherung.....	57
4.6.4. Vergleich EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger Anreicherung von Zelllinienzellen der Linie MDA-MB-231 im CellSearch.....	58
4.6.5. Zusätzliche Anreicherung von MDA-MB-231-Zellen mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf nach EpCAM-abhängigem CellSearch-Lauf... 59	
4.7. CTC-Anreicherung aus Patientinnenproben	61
4.7.1. EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs aus Patientinnenproben mittels IsoFlux-Prozessierung.....	61
4.7.2. EpCAM- unabhängige Anreicherung von CTCs aus Patientinnenproben mittels modifiziertem CellSearch CTC Kit	64
4.8. Vergleich angereicherter CTCs hinsichtlich ihres Status der EMT anhand des E-Cadherin-/Vimentinverhältnisses	67
4.8.1. Klinische Daten der Patientinnen mit EMT-Vergleichsanalyse	69
4.8.2. DNA-Mutationsvergleich angereicherter CTCs mit unterschiedlichem EMT-Status.....	70

4.9.	Vergleich EpCAM- abhängig und EpCAM-unabhängig mittels CellSearch angereicherter CTCs.....	71
4.9.1.	Morphologischer Vergleich EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig mittels CellSearch angereicherter CTCs.....	71
4.9.1.1.	Größe der angereicherten CTCs - EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung	73
4.9.1.2.	Zirkularität der angereicherten CTCs - EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung	75
4.9.1.3.	Durchschnittliche CK-Intensität der angereicherten CTCs EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung.....	77
4.9.1.4.	Korrelation der Diskrepanzen in Größe und Zirkularität – EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung.....	79
4.9.2.	DNA-Mutationsvergleich EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängiger CTCs	80
4.9.3.	Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger CTC-Anreicherung im CellSearch.....	82
4.10.	Analyse des PFS sowie OS bezogen auf die nachgewiesene CTC-Anzahl	85
4.11.	CTC-Anreicherung aus EDFs	87
4.11.1.	Morphologie angereicherter CTCs aus EDFs.....	88
4.11.2.	Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-unabhängiger CTC-Anreicherung aus der EDF	91
5.	Diskussion	93
5.1.	Vorbemerkung.....	93
5.2.	Gewährleistung hoher <i>Recovery</i> -Zahlen bei guter DNA-Qualität durch Optimierung des Färbevorgangs.....	93
5.3.	Umstellung der Trop2-/CD49f-abhängigen Anreicherung vom IsoFlux-auf das CellSearch-System	94

5.4. Zusätzliche Anreicherung von CTCs in Patientinnenproben mittels Trop2- und CD49f-AK-Gemisch	95
5.5. Analyse angereicherter CTCs unterschiedlicher EMT-Stadien gemessen an ihrem E-Cadherin-/Vimentinfluoreszenzquotienten	95
5.6. Morphologischer Vergleich EpCAM-abhängig und –unabhängig angereicherter CTCs.....	96
5.7. Vergleichende Sequenzierung EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherter CTCs	97
5.8. Anreicherung von CTCs aus EDFs	98
5.9. Prognostische Relevanz der EpCAM-unabhängigen CTC-Anreicherung ...	99
5.10. Limitationen	101
5.11. Schlussbetrachtung und Ausblick	103
Abbildungsverzeichnis	106
Tabellenverzeichnis	109
Literaturverzeichnis	111
Danksagung.....	116

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
xg	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
µg, mg, g	(Mikro-, Milli-) Gramm
µl, ml, l	(Mikro-, Milli-) Liter
AK	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CK	Zytokeratin (<i>cytokeratin</i>)
CTCs	Zirkulierende Tumorzelle (<i>circulating tumor cell</i>)
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDF	EpCAM-depletierte Fraktion
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition (<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>)
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)

PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PFS	Progressionsfreies Überleben (<i>progression-free survival</i>)
s.	Siehe
WGA	Amplifikation des gesamten Genoms (<i>whole genome amplification</i>)

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und klinische Relevanz der Krebserkrankungen

Im Jahr 2016 wurden in Deutschland circa 492.000 Erstdiagnosen (ED) einer Krebserkrankung gestellt. Davon betrafen die Hälfte aller Erkrankungen das Gewebe der Brust, der Prostata, des Dickdarms oder der Lunge [1]. Auch auf der globalen Ebene besitzen Krebserkrankungen eine hohe Inzidenz. So lag die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2018 weltweit bei über 18 Millionen und es traten etwa 9,6 Millionen Todesfälle auf [2]. Durch den demographischen Wandel und die stetig wachsende Weltbevölkerung ist mit einem weiteren Anstieg der Fallzahlen in den nächsten Jahren zu rechnen [1].

1.2. Genese einer Krebserkrankung

Die Entstehung eines Tumors beruht auf dem unkontrollierten Wachstum einzelner Zellen. Mit der Fähigkeit zur Invasion in umliegendes Gewebe wird ein Tumor maligne und eine Krebserkrankung entsteht. Der Krebs wird je nach Ursprungsgewebe in unterschiedliche Subtypen unterteilt. Ein Tumor, der von epitheliale Gewebe ausgeht, wird zum Beispiel Karzinom genannt [3].

Der Initiator des unkontrollierten Wachstums kann eine „*Gain of function*“-Mutation eines Onkogens oder eine „*Loss of function*“-Mutation eines Tumorsuppressorgens sein [4]. Die Mutationen liegen in Genen, die für Proteine codieren, die an den Regulationszyklen der Zelle beteiligt und in gesunden Zellen für die Kontrolle einer normalen Zellproliferation und Homöostase zuständig sind [5].

Es gibt verschiedene Mechanismen, die die Entstehung einer Krebserkrankung begünstigen können. Zum einen können manche Krebszellen sich eigenständig mit Wachstumssignalen versorgen, zum anderen können sie ihre Sensibilität für inhibitorische Signale verlieren. Die mutierten Zellen umgehen die Apoptose und besitzen unlimitiertes Replikationspotential. Sie befördern anhaltend die Angiogenese, infiltrieren in umgehendes Gewebe und bilden Fernmetastasen [5].

Neben der Zulieferung von Energie über die Angiogenese kann eine Reprogrammierung des Energiemetabolismus die Proliferation des Tumors unterstützen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Krebszellen über verschiedenste Mechanismen der Immunabwehr des Körpers entgehen können [6].

All die genannten Prozesse im Tumor werden durch zwei sogenannte „*Enabling Characteristics*“ initiiert und verstärkt. Einerseits ermöglicht die genetische Instabilität das Auftreten von Mutationen, die dann dem Immunsystem verborgen bleiben, sodass die mutierte Zelle der Apoptose entgehen kann. Andererseits können entzündliche Reaktionen innerhalb des Tumors die Angiogenese forcieren, und aus der direkten Tumorumgebung können Faktoren freigesetzt werden, die das Wachstum zusätzlich unterstützen [6].

1.3. Brustkrebs

1.3.1. Epidemiologie

Von den in 1.1 genannten Krebserkrankungen betrifft ein Großteil das Gewebe der Brust. Das Mammakarzinom ist mit jährlich circa 69.000 Neuerkrankungen die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frauen in Deutschland [1]. Im Jahr 2017 gab es deutschlandweit mehr als 18.000 Todesfälle in Folge eines Mammakarzinoms [1]. Die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung eines Mammakarzinoms beträgt für eine in Deutschland lebende Frau etwa 12,5% [1]. Von 100 ED wird circa eine bei einem Mann gestellt [1]. Auch weltweit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung und Krebstodesursache der Frau mit über zwei Millionen Neuerkrankungen und über 600.000 Todesfällen im Jahr 2018 [2].

1.3.2. Risikofaktoren und Früherkennung

Verschiedene Faktoren können das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms erhöhen. Dazu gehören vor allem Faktoren, die Einfluss auf den Hormonspiegel der Frau haben, wie eine früheinsetzende Menarche und späte Menopause, eine Hormonersatztherapie, ein höheres Erstgebärendenalter sowie Kinderlosigkeit [1]. Faktoren der Brust, die das Brustkrebsrisiko erhöhen, sind eine erhöhte mammographische Dichte, gutartige Strukturveränderungen und vorrausgehende Krebserkrankungen der Brust [1, 7]. Außerdem kann ein erhöhtes genetisches Risiko für Brustkrebserkrankungen in der Familie vorliegen [7]. Lebensstilfaktoren, die das Entartungsrisiko der Brust erhöhen, sind Adipositas sowie Bewegungsmangel vor allem während der Menopause [1]. Auch Alkohol und Nikotinabusus sind als Risikofaktoren gesichert [1].

Um Veränderungen der Brust frühzeitig zu erkennen gibt es ein gesetzliches Screeningprogramm, bei dem Frauen ab 30 Jahren regelmäßige Tastuntersuchungen und zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle 24 Monate eine Mammographie empfohlen wird [1].

1.3.3. Subtypen

Histologisch zeigt sich ein heterogenes Bild der Mammatumore [8]. Dabei liegt in etwa 75% der Fälle ein Karzinom vor, das von den Zellen des Milchgangs ausgeht und dem sogenannten nicht spezifischen Typ zuzuordnen ist [9]. In der Häufigkeit folgt das invasiv lobuläre Karzinom, das in den Drüsenläppchen entsteht. Beide Unterarten zusammen machen 90% der Gesamttumore aus. Andere histologische Subtypen, wie zum Beispiel das medulläre, muzinöse oder invasiv tubuläre Karzinom, betreffen nur eine sehr geringe Patient:innenzahl [8].

Auf molekularer Ebene unterscheidet man weitere Subtypen entsprechend der Expression verschiedener Rezeptoren. Die Haupteinteilung erfolgt in den basalartigen, den luminalen und den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-2 (HER2/neu)-positiven Typen [10]. Der luminal Typ wird definiert durch die Überexpression des Östrogen- und/oder des Progesteronrezeptors und wird weiter unterteilt in den luminalen Typ A und Typ B, je nach Anteil der Ki67-positiven Tumorzellen und des HER2/neu-Rezeptorstatus. Typ B wird definiert durch eine hohe Ki67-Expression und/oder einen positiven HER2/neu-Rezeptorstatus. Die basalartigen Tumore exprimieren weder den Östrogen-, den Progesteron- noch den HER2/neu-Rezeptor und werden deshalb auch triple-negativ genannt [10].

1.3.4. Metastasierung

Bei den Mammakarzinompatient:innen sind Metastasen für 90% der krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich. Die genaue Pathogenese der Metastasierung ist jedoch bis heute nur in Teilen verstanden [11].

Die Metastasierung ist definiert durch die Streuung von Zellen des Primärtumors in ferne Organe und die dortige Ansiedlung und Proliferation [12]. Sie entsteht durch die gegenseitige Beeinflussung der gestreuten Krebszellen („*the seeds*“) und der spezifischen Umgebung des entfernten Organs („*the soil*“) [12].

Zellen, die vom Primärtumor abgehen und die Metastasierung initiieren, müssen die Fähigkeit zur Migration besitzen und in Gewebe eindringen können. Die Zellen reduzieren ihre Größe und bewegen sich durch die extrazelluläre Matrix des umgebenden Gewebes um in Lymph- und Blutgefäße zu infiltrieren. Von dort aus können sie zu sekundären Organen gelangen [11].

Wie Fidler *et al.* 2003 beschrieben haben, durchlaufen die metastasierenden Zellen eine mehrschrittige Kaskade vom Ursprung innerhalb des Primärtumors bis hin zur Bildung einer Fernmetastase [12].

Im ersten Schritt einer Krebserkrankung mutieren die Zellen im Ursprungsgewebe und die Tumorpheriferation beginnt. Um den Tumor in seinem Wachstum ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, wird die Tumormasse zusätzlich vaskularisiert und dadurch ein Wachstum erreicht, das 1-2 mm überschreitet [12, 13]. Dieser Prozess wird durch die Synthese und Sekretion von angiogenetischen Faktoren ausgehend vom Tumor und der Tumorumgebung unterstützt [13].

Die Streuung der ersten Tumorzellen startet mit der lokalen Intravasation in das umgebende Stroma. Von dort aus durchwandern sie das Endothel von Blut- und Lymphgefäßen und gelangen in die Zirkulation. Diese sogenannten zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) lösen sich vom Endothel und können mit anderen Blutbestandteilen aggregieren [12].

Um Zellen bei der Zirkulation im Blutstrom und noch vor der Metastasierung zu stoppen, ist die Eliminierung dieser Zellen nach Identifizierung durch das Immunsystem unabdingbar. Viele Proteine, die für den Metastasierungsprozess verantwortlich sind, spielen jedoch auch eine wichtige Rolle in der Regulation des programmierten Zelltods. Als Beispiel sind hier die Metalloproteinasen zu nennen [14].

Einzelne CTCs, die im Blutstrom überlebt haben, können dann im Kapillarbett anderer Organe adhären und über Extravasation die Zirkulation in das umgebende Gewebe verlassen, um eine Mikrometastase zu formen [15]. Damit eine makroskopische Metastase entstehen kann, wird auch im sekundären Organ Angiogenese betrieben und die direkte Umgebung über zahlreiche Faktoren beeinflusst [15].

1.4. Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

1.4.1. Klinische Bedeutung

In den letzten Jahren ist die individuelle Krebstherapie, die immer spezifischer auf den Tumor des/der Patient:in angepasst wird, in den Fokus der Forschung gerückt [16]. Gewebebiopsien sind dabei das aktuelle Standardverfahren zur Detektion spezifischer Tumorfaktoren wie Mutationen. Allerdings bilden sie nur den Status des Tumors zum Zeitpunkt der Entnahme der Biopsie ab und spiegeln nicht die Dynamik des Tumors wieder. Ihre Durchführbarkeit hängt außerdem von dem Zustand des/der Patienten/-in bezogen auf Alter, Komorbidität und Risiken für Komplikationen ab [16]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass innerhalb des Tumors und auch zwischen dem Primärtumor und Metastasen eine Heterogenität besteht, die durch eine Gewebebiopsie nicht sicher dargestellt werden kann [17].

Aufgrund dieser Limitationen hat die *Liquid Biopsy* als minimal-invasive diagnostische Methode an Bedeutung in der Forschung gewonnen. Diese ist möglich, da schon im frühen Stadium einer Krebserkrankung Einzelzellen vom Primärtumor disseminieren und als CTCs in den Blutstrom gelangen [18]. Die Dissemination dieser Tumorzellen stellt den Zwischenschritt zwischen lokaler und systemischer Ausbreitung dar und die Quantifizierung und molekulare Charakterisierung der CTCs kann die Wirksamkeit spezifischer systemischer Therapien überprüfen [19].

Aufgrund ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften können CTCs durch verschiedene Verfahren aus Blutproben angereichert werden. Eine *Liquid Biopsy* kann im Gegensatz zur Metastasenbiopsie durch ihre geringe Invasivität oft wiederholt werden und bildet damit die dynamische Entwicklung des Tumors in Echtzeit ab [18].

Die prognostische Relevanz der CTCs für den Verlauf einer Brustkrebserkrankung konnte bereits nachgewiesen werden. So sinkt bei einer Zahl von mehr als fünf CTCs pro 7,5 ml Blut, die mit dem CellSearch-System angereichert werden konnten, das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) im Vergleich zur Patient:innenpopulation mit geringerer CTC-Anzahl [20]. Andere Studien zeigen, dass bereits die Präsenz von schon einer CTC in einer Blutprobe, die mittels CellSearch-System prozessiert wurde, mit einer signifikanten Reduzierung des Gesamt-, des

krankheitsfreien, des fernmetastasenfreien und des brustkrebspezifischen Überlebens assoziiert ist [21].

Ferner konnte ebenfalls für einige andere Krebsentitäten, unter anderem für das metastasierte kolorektale Karzinom [22], das metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinom [23], das metastasierte nichtkleinzellige [24] und kleinzellige [25] Lungenkarzinom, eine prognostische Relevanz des CTC-Nachweises, bezogen auf das OS und PFS, aufgezeigt werden.

Neben der Aussagekraft zur Prognose der Mammakarzinompatient:innen können CTCs außerdem als Parameter für das Therapieansprechen herangezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine konstant hohe CTC-Zahl nach dem ersten Zyklus einer Chemotherapie mit einer schlechteren Prognose einhergeht, anders als eine sinkende CTC-Zahl im Laufe der Therapie, und somit für ein Therapieversagen spricht [26].

In Bezug auf das Therapieansprechen sind CTCs außerdem bessere Indikatoren als die klassischen bildgebenden Verfahren, da sie ein früherer und besser wiederholbarer Spiegel des Krankheitszustandes sind und besser mit dem OS der Patient:innen korrelieren als Veränderungen in der Bildgebung [27]. Aktuell gibt es außerdem zunehmend Publikationen, die den prädiktiven Nutzen von CTCs auch im Bezug auf Therapiemöglichkeiten beweisen.

In der DETECT-III-Studie konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit initial HER-2-negativen Tumoren, bei denen jedoch HER-2-mutierte CTCs angereichert werden konnten, von einer HER-2-Rezeptor-gerichteten Therapie hinsichtlich des OS profitieren können. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass CTC unabhängig von ihrem Nutzen als Tumorsurrogatmaterial auch über den Primärtumor hinausgehende Informationen mit klinischer Relevanz tragen können. [28]

Auch die STIC-Studie von Bidard et. al zeigt die mögliche prognostische Aussagekraft von CTCs im Rahmen der Therapieentscheidungsfindung bei Mammakarzinompatientinnen. In dieser Studie wurde die Erstlinientherapie bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus und negativem HER-2- Status in der Kontrollgruppe von den üblichen klinischen Prognosefaktoren abhängig gemacht, in der Interventionsgruppe jedoch von der CTC-Anzahl pro 7,5 ml. Bei mehr als 5

nachgewiesenen CTCs in der untersuchten Probe erhielten die Patientinnen Chemotherapie wie üblicherweise bei prognostisch ungünstigen klinischen Faktoren. Wurden weniger als 5 CTCs in den 7,5 ml nachgewiesen, erhielten die Patientinnen als entsprechendes Niedrigrisikokollektiv eine endokrine Therapie. Dabei zeigte sich in der Gruppe mit der CTC-abhängigen Therapie ein PFS von 15,5 Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 13,9 Monaten PFS, sodass ein Einbinden der CTC-Anzahl in den Entscheidungsfindungsprozess hinsichtlich einer Therapieeskalation bei Mammakarzinompatientinnen in der Zukunft durchaus eine größere Rolle spielen könnte. [29]

1.4.2. Anreicherungsmethoden von CTCs aus Vollblut

Die Anreicherung von CTCs aus Blutproben von Krebspatient:innen stellt eine Herausforderung dar, da pro 10^6 - 10^7 der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) nur circa eine CTC auftritt. Um dennoch eine Detektion zu ermöglichen, bedarf es sehr sensitiver und spezifischer Selektionsmethoden [30-33].

Die Differenzierung zwischen einer CTC und einer Blutzelle erfolgt über spezifische Charakteristika der CTCs. Physikalische Eigenschaften, die eine Unterscheidung ermöglichen, sind unter anderem die Größe und Formbarkeit, die über Filtrierungsverfahren - zum Beispiel mittels Parsortix - eine Trennung ermöglichen [30, 34-36]. Außerdem können die CTCs anhand der Dichte über Zentrifugation von den Erythrozyten getrennt werden. Auch die elektrische Ladung der Zellen ermöglicht eine Differenzierung [30].

Hinsichtlich der Oberflächenproteine ergeben sich ebenfalls Diskrepanzen, die eine Differenzierung zwischen einer CTC und einer PBMC ermöglichen. Hier erfolgt die Anreicherung vor allem abhängig von Antikörpern (AK) gegen die Oberflächenmarker. Zum einen können CTCs über positive Selektion herausgefiltert werden, zum anderen kann die Population der PBMCs über negative Selektionen depletiert werden [30].

Das am häufigsten genutzte Oberflächenprotein, das zur Anreicherung von CTCs epithelialer Tumorarten genutzt wird, ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM). Der Goldstandard für dieses Verfahren ist die Prozessierung mittels CellSearch-System, das automatisiert über an Ferrofluide gekoppelte EpCAM-AK CTCs aus jeweils 7,5 ml Patient:innenblut anreichert. Das CellSearch-System ist

bisher die einzige CTC-Anreicherungsmethode, die von der Food and Drug Administration anerkannt wurde [32, 37, 38]. Das IsoFlux-System macht sich ebenfalls die Bindung von AK an das Oberflächenprotein EpCAM der CTCs zunutze, verwendet aber immunomagnetische *Beads*, an die die EpCAM-Antikörper gebunden sind, statt der Ferrofluide. Die Zellen an den *Beads* können dann über einen Magneten im IsoFlux-System angereichert werden [39].

1.4.3. Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und EpCAM

Der Oberflächenmarker EpCAM, der beim Standardverfahren des CellSearch-Systems zur CTC-Detektion genutzt wird [38], kann in der Mehrheit der epithelialen Gewebe auf der basolateralen Membran gefunden werden. Außerdem zeigen die meisten humanen Karzinome eine Überexpression von EpCAM, unter anderem auch Primärtumoren der Brust [40, 41]. Allerdings weisen einige Mammakarzinome, auch abhängig vom histologischen Subtyp, keine oder nur eine geringe EpCAM-Expression auf [41]. Hinsichtlich der EpCAM-Expression von CTCs zeigt sich keine Korrelation zu der Stärke der EpCAM-Expression des Primärtumors [42].

Ursächlich für die Unterschiede in der EpCAM-Expression ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Während dieses Prozesses verändern sich differenzierte Zellen epithelialen Ursprungs hin zu einem mesenchymaleren Phänotyp und können dabei die EpCAM-Expression herunterregulieren oder sogar gänzlich verlieren [43-45].

Die Nutzung der EpCAM-Expression zur Anreicherung führt also zu einem Verlust von CTCs, die sich bereits durch den Prozess der EMT verändert haben und sind nicht geeignet um die Gesamtpopulation der CTCs abzubilden [42, 45]. Zusätzlich wurden niedrige Expressionslevel von EpCAM und somit fortgeschrittene Transition zu einem mesenchymaleren Zelltypen mit hoher Aggressivität und Invasivität von CTCs in Verbindung gebracht [43, 45]. Diese Eigenschaften sind dadurch bedingt, dass die Tumorzellen während der EMT ihre Zell-Zell-Kontakte sowie ihre Polarität verlieren und Veränderungen im Zytoskelett durchlaufen. Ihr invasives und metastatisches Verhalten wird verstärkt und sie werden resistenter gegenüber der Apoptose. Die EMT ist deshalb eng verknüpft mit der Tendenz zur Gefäßinvasion, Generierung von CTCs und Metastasierung [44, 46, 47].

Wie Yu *et al.* 2013 beschrieben haben, ist der Vorgang der EMT aber keine Einbahnstraße und es gibt nicht nur den epithelialen und den mesenchymalen Typen, sondern er ist ein fließender Prozess mit vielen Zwischenstufen, die auch eine Rückentwicklung der CTCs im Rahmen der mesenchymal-epithelialen Transition erlauben [43].

Einhergehend mit der phänotypischen Transition der Tumorzellen verändert sich die Expression verschiedener Marker auch über EpCAM hinaus. Dabei werden mesenchymale Proteine wie zum Beispiel Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin induziert [44, 46]. Dieser Prozess zeigt sich vermehrt bei Tumoren des triple negativen Subtyps und ist auch mit einem höheren histologischen Grading assoziiert. Parallel dazu zeigt sich in triple negativen Subtypen – wie zum Beispiel MDA-MB-231 - häufig eine verminderte Expression von epithelialen Tumormarkern wie E-Cadherin und den Zytokeratinen (CK) 8,18 und 19 [48].

Proteine, die Rückschlüsse auf den EMT-Status einer Zelle zulassen, sind also unter anderem E-Cadherin und Vimentin. Sie werden lediglich selektiv exprimiert und spielen eine spezifische Rolle bei dem epithelialen beziehungsweise mesenchymalen Status von Zellen. Vimentin ist als Intermediärfilament intrazellulär vor allem in mesenchymalen Zellen exprimiert und erhöht die Flexibilität des Zytoskeletts. E-Cadherin ist ein transmembranäres Glykoprotein und ist als typisches Oberflächenprotein auf epithelialen Zellen verantwortlich für die Zell-Zell-Adhäsion. Eine hohe Expression von E-Cadherin, kombiniert mit einer niedrigen Vimentin-Expression, ist charakteristisch für Zellen epithelialen Ursprungs. Tumorzellen mit mesenchymalem Phänotyp zeigen die gegensätzliche Ausprägung der beiden Proteine und neigen zur Zellmigration [49-53].

1.4.4. Anreicherung EpCAM-negativer CTCs

Trotz guter Wiederfindungsraten von Tumorzellen mit hoher EpCAM-Expression durch das CellSearch-System können Zellen mit niedriger EpCAM-Expression kaum angereichert werden. Es konnte gezeigt werden, dass aus den EpCAM-depletierten Fraktionen (EDF) nach einem CellSearch-Lauf über EpCAM-unabhängige Anreicherungsverfahren, wie zum Beispiel Filtration, weitere Tumorzellen nachgewiesen werden können [54].

In Experimenten wurden bei metastasierten Brustkrebspatient:innen in 32% der Proben fünf oder mehr EpCAM-positive CTCs, in 36% der Proben fünf oder mehr EpCAM-negative CTCs und in 64% der Proben fünf oder mehr EpCAM-positive und/oder EpCAM-negative CTCs gefunden. Bei der Nutzung eines Verfahrens, das durch eine Unabhängigkeit von EpCAM beide Subtypen anreichern kann, könnte man also bei einer prozentual höheren Anzahl von Patient:innenproben den Nachweis von CTCs erbringen [55].

Schneck *et al.* haben verschiedene AKs gegen Oberflächenmarker (Trop2, -CD49f, -CD146, -CK8, -c-Met, -CD44, -CD47, -AQP5, -ADAM8, -TEM8) und Komponenten der extrazellulären Matrix zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von CTCs getestet. Die an die AK gebundenen Zellen wurden dabei immobilisiert oder an immunomagnetische *Beads* gekoppelt. Nach Tests an Brustkrebszelllinien konnten sie auch eine Anreicherung von CTCs aus EDFs des CellSearch-Systems nachweisen. Als EpCAM-positive Kontrolle wurden MCF-7- und Sk-Br-3-Zellen verwendet, als EpCAM-negative MDA-MB-231-Zellen. Die MCF-7 und Sk-Br-3 Zellen adhärten an die Flächen, die mit EpCAM-AK beladen waren und die Bindung an diese konnte erhöht werden, wenn zusätzlich ein Trop2- oder CD49f-AK oder Komponenten der extrazellulären Matrix verwendet wurden. Die MDA-MB-231-Zellen zeigten kaum Bindung zu den EpCAM-AK, jedoch banden sie an Trop2- und CD49f-AK und Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Adhäsion zu den CD49f-AK zeigte sich am deutlichsten. Bei der Prozessierung von Patient:innenproben konnten mithilfe der Kombination aus AK gegen Trop2, CD49f und CK8 potentielle EpCAM-negative CTCs aus EDFs nachgewiesen werden [56].

Einige CTCs, die EpCAM-unabhängig angereichert wurden, zeigten nach der Isolation genomische Aberrationen, sodass sie als Tumorzellen verifiziert werden konnten. Außerdem konnten zusätzliche Mutationen in der EpCAM-negativen Population aufgezeigt werden [56]. DNA-Analysen EpCAM-unabhängig angereicherter CTCs könnten also möglicherweise weitere, klinisch relevante Informationen aufdecken.

Die Verwendung von AK gegen CD49f – auch als Integrin- α -6-Adhäsionsmolekül bezeichnet- zeigte schon zuvor die Potenz zur Verbesserung der Sensitivität der CTC-Anreicherung bei Brustkrebspatient:innen [57]. Außerdem spielt CD49f eine

unterstützende Rolle beim Tumorwachstum und der Metastasenbildung und wird als Stammzellmarker mit negativer Korrelation mit dem Gesamtüberleben von Patient:innen gehandelt [58-60].

Vor allem basal-ähnliche Brustkrebssubtypen zeigen eine hohe CD49f-Expression im Vergleich zu luminalen und HER2-positiven Subtypen [61, 62].

Trop2 als Glykoprotein der Zelloberfläche wurde als ergänzender Angriffspunkt zur Anreicherung von CTCs ausgewählt, da es in der Mehrheit der Karzinome überexprimiert wird und maßgeblich am Tumorwachstum beteiligt ist [63, 64]. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass Trop2 zur Anreicherung von Tumorzellen sowie als therapeutisches Angriffsziel genutzt werden kann [65-67].

Eine Überexpression von Trop2 korreliert mit einer hohen Expression von E-Cadherin und einer niedrigen Ausprägung mesenchymaler Marker [68].

Die Methodik zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von CTCs aus den Patient:innenproben ist in der CTC-Arbeitsgruppe der Frauenklinik bereits etabliert worden. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit dieser Methode CTCs mit unterschiedlicher EpCAM-Expression angereichert werden können. [69]

Bei der etablierten Methode werden zunächst die Erythrozyten aus dem Blut von Patient:innen mittels Dichtezentrifugation entfernt, sodass lediglich CTCs sowie die PBMCs verbleiben. Im nächsten Schritt werden die CTCs, die sich in der Fraktion der mononukleären Zellen befinden, mit biotinylierten AK gegen Trop2 und CD49f markiert. Im weiteren Verlauf werden die Zellen mit magnetischen Beads inkubiert, die an das Biotin der AK binden, um im Anschluss im IsoFlux-System isoliert zu werden. [69, 70]

In den bereits durchgeführten Spike-In-Experimenten wurde die Funktion der selektierten AK mithilfe des IsoFlux-Anreicherungs-systems erfolgreich getestet mit Wiederfindungsraten von 84,3% bei Sk-Br-3-Zelllinienzellen mittels Trop-2-Antikörpern und 55,9% bei MDA-MB-231-Zelllinienzellen mittels CD49f-Antikörpern. Eine Kombination der beiden Antikörper konnte bei Zelllinienzellen keinen signifikanten Anstieg der Wiederfindungsrate bewirken. Im Gegensatz dazu konnte

durch die Kombination der beiden Antikörper bei ersten Test an Patientinnenproben ein synergistischer Effekt in der Anzahl angereicherter CTCs nachgewiesen werden. [69, 70]

Eine Anwendungsübertragung der Trop2-/CD49f-basierten Methode auf das CellSearch-System stand zu Beginn meiner Promotionsarbeit noch aus.

1.5. Ziel der Arbeit

Die Promotionsarbeit sollte untersuchen, inwiefern sich EpCAM-abhängig und -unabhängig angereicherte CTCs bei Patient:innen mit metastasiertem Mammakarzinom unterscheiden und ob Trop2-/CD49f-basiert CTCs mit Varianzen im Hinblick auf ihren EMT-Status mit ursächlichen DNA-Mutationen angereichert werden können.

a) Optimierung der Trop2-/CD49f-abhängigen CTC-Anreicherung **- Etablierung der Anreicherungsmethode im CellSearch-System**

Die bereits von der Arbeitsgruppe etablierte EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs mithilfe biotinylierter AK gegen Trop 2 und CD49f sollte von der Anwendung im IsoFlux-System auf die Anwendung im automatisierteren und standardisierteren CellSearch-System mit anschließender maschineller Analyse übertragen werden. Durch Optimierung des Anreicherungsverfahrens sollte die Anzahl und Qualität der angereicherten CTCs verbessert werden.

b) Darstellung von CTCs unterschiedlicher EMT-Phänotypen

Patient:innenproben, für die wir die höchste CTC-Positivitätsrate und die höchsten CTC-Zahlen erwarteten, sollten EpCAM-unabhängig angereichert und im Anschluss nach Immunfluoreszenz-Analyse mittels epithelialer und mesenchymaler Marker isoliert werden. Im Folgenden sollte nun ein Vergleich der verschiedenen CTC-Populationen hinsichtlich ihres EMT-Phänotyps sowie des DNA-Mutationsprofils erfolgen.

c) EpCAM-abhängige und -unabhängige Anreicherung von CTCs aus Proben von Patient:innen mit metastasiertem Mammakarzinom **- Vergleichende Morphologieanalyse und Analyse der Überlebensdaten**

Zusätzlich sollten Unterschiede zwischen den EpCAM-abhängig und -unabhängig angereicherten CTCs durch Charakterisierung der CTCs hinsichtlich der Zellmorphologie und der Expression von Oberflächenmarkern untersucht werden. Außerdem sollten die Überlebensdaten (PFS und OS) in Bezug auf den erfolgreichen Nachweis von CTCs mit den verschiedenen Methoden beleuchtet werden.

d) Nachweis von chromosomalen Aberrationen mittels *Low Pass Sequencing* zur Untersuchung der evolutionären Verwandtschaft EpCAM-abhängig und –unabhängig angereicherter CTCs

Mithilfe von Einzelzell-*Low Pass Sequencing* wurden die chromosomalen Aberrationen der isolierten CTCs mit unterschiedlichen Anreicherungsverfahren verglichen, um dadurch die evolutionäre Verwandtschaft der CTC-Subpopulationen und DNA-Unterschiede zwischen den EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig angereicherten CTCs zu ermitteln.¹

¹ **Bemerkung:** Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Proben von weiblichen Patientinnen untersucht wurden, wird im Folgenden auf die Nennung weiterer Geschlechterformen verzichtet.

2. Material

2.1. Patientinnenkollektiv

Die Patientinnenproben stammten aus den Studien Augusta und DETECT III-V. Eingefasst wurden volljährige Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs. Es wurden Proben von Patientinnen im Alter von 37 bis 78 Jahren analysiert.

Die oben genannten Studien wurden jeweils mittels Ethikvotum genehmigt:

Augusta Studie: Ethikkommission der HHU Düsseldorf, Referenz-Nummer 3430

Detect III- Studie : NCT01619111 [71]

Detect IV- Studie: NCT02035813 [72]

Detect V-Studie: NCT02344472 [73]

Alle Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer Blutproben für CTC-Analysen und translationale Forschungsprojekte. Die Patientinnenmerkmale wurden anonymisiert.

2.2. Chemikalien

Die Lagerung und Verwendung der Chemikalien erfolgte nach Vorgabe der Hersteller.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4´6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation Saint Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Corporation Saint Louis, MO, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Corporation Saint Louis, MO, USA
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Corporation Saint Louis, MO, USA

Nucblue Live Cell Stain Ready Probes reagent (Hoechst)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Saponin	Sigma-Aldrich Corporation Saint Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Corporation Saint Louis, MO, USA

2.3. Puffer

Alle Puffer wurden mittels Natronlauge auf einen pH von 7,35 bis 7,45 eingestellt. Nach Herstellung wurden die Puffer maximal eine Woche verwendet und bei -4°C gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Puffer

Bezeichnung	Bestandteile
Puffer 1	0,1 % BSA in DPBS
Puffer 2	0,1 % BSA und 1% EDTA in DPBS
Puffer 3	RPMI 1640 mit 1% FCS, 1mM CaCl ₂ und 5 mM MgCl ₂

2.4. Medium

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte mittels mit Supplementen versetztem RPMI 1640 Medium von Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), das L-Glutamin enthält.

Tabelle 3: Supplemente des Mediums

Supplement	Hersteller	Anteil
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	10%
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	1%

2.5. Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Medium
MCF-7	Adhärente, humane Mammakarzinomzelle Hormonrezeptor positiv, HER2 negativ ATCC HTB-22	RPMI
MDA-MB-231	Adhärente, humane Mammakarzinomzelle Triple negativ ATCC HTB-26	RPMI
Sk-Br-3	Adhärente, humane Mammakarzinomzelle Hormonrezeptor negativ, HER2 positiv ATCC HTB-30	RPMI

2.6. Verwendete Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Name	Ursprungsorganismus	Verdünnung	Hersteller
Trop 2 Biotin (REA916)	Rekombinant (Maus und Mensch)	1:100	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
CD49f Biotin (REA518)	Rekombinant (Maus und Mensch)	1:30	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Integrin alpha 6 (GoH3) Biotin	Ratte	1:33,3	abcam Cambridge, UK
CK Pan TRITZ (CII/AEI,AE3)	Maus	1:100/1:200	Aczon SRL Bologna, Italien

E-Cadherin (EP700Y,AF 488)	Kaninchen	1:25/1:50	abcam Cambridge, UK
Vimentin (V9, AF 647)	Maus	1:2000/1:4000	abcam Cambridge, UK
CD45 35-Z6 (AF 647)	Maus	1:25	Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA
CD45 (HI30) DyLight	Maus	1:12,5/1:25	Novus Biologicals Centennial, CO, USA

2.7. Verwendete Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Ampli1 Low Pass Sequenzierungs- Kit	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
Ampli1 QC Kit	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
Ampli1 WGA Kit	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
CELLlection Biotin Binder Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
CellSearch CTC Kit	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
CellSearch CXC Kit	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
CellSearch Profile Kit	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
Fluxion CTC Enrichment Kit	Fluxion Biosciences Alameda, CA, USA
MiSeq System	Illumina San Diego, USA

2.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
CellSave Preservative Tubes	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
Cell Dissociation Buffer	Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Cell Tracker Green	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Dako Antibody Diluent	Dako Corporation Santa Clara, CA, USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako Corporation Santa Clara, CA, USA
Dako Protein Block Serum Free	Dako Corporation Santa Clara, CA, USA
Dako Wash Buffer	Dako Corporation Santa Clara, CA, USA
Diagnostic Microscope Slides 3 Well	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Soline)	Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
EDTA-Röhrchen	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Ficoll Paque PLUS	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Pipetten	eppendorf Hamburg, Deutschland
Protein LoBind Tubes 1,5 ml	eppendorf Hamburg, Deutschland

SepMate PBMC-Isolation Tube	Stemcell technologies Vancouver, Kanada
Sievwel <i>Multiwell Slides</i>	Tokyo Ohka Kogyo Co. Ltd. Kawasaki, Japan
Streptavidin-Ferrofluide	BioMagnetic Solutions LLC State College, PA, USA
Trypsin-EDTA 0,5%	Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland

2.9. Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
<i>Automated Sample Collection Device</i>	De Wit, S. <i>et al.</i> [54]
Axioplan 2 Mikroskop	Zeiss Oberkochen, Deutschland
Beckman GS-15 Zentrifuge	Hyland Scientific Stanwood, WA, USA
CellTracks Autoprep System (CellSearch)	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
CellTracks Analyzer II	Menarini Silicon Biosystems Florenz, Italien
CellCelector	Automated Lab Solutions Jena, Deutschland
Centrifuge 543OR	eppendorf Hamburg, Deutschland
Cytospin	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

Hybaid Shake'n'Stack Hybridisierungsöfen	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
IsoFlux CTC System	Fluxion Biosciences Alameda, CA, USA
Megafuge 16R Heraeus	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer Improved 0,1 mm Tiefe	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen, Deutschland
Rotofix 32A	Hettich Tuttlingen, Deutschland
Stuart Rotator SB3	Stuart Staffordshire, UK
Waage	Mettler Toledo Columbus, OH, USA

2.10. Software

Die Analysen der Zellmorphologie wurden mittels ImageJ durchgeführt. [74]

Die statistischen Analysen erfolgten mittels GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, United States). Es wurden ungepaarte t-Tests sowie Two Way Anova mit posthoc Bonferroni Test zur Berechnung der Signifikanz angewendet, p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3. Methoden

3.1. Methoden der Zellkultur

3.1.1. Kultivierung

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5% CO₂, >90% Luftfeuchtigkeit und in Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One. Als Medium wurde RPMI Medium 1640 mit Glutamin der Firma Gibco (Thermo Fisher Scientific) verwendet und dieses mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin versetzt. Alle Arbeiten mit den Kulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank.

3.1.2. Subkultivierung

Das Passagieren der Zellkulturen erfolgte bei 80-90% Konfluenz. Dazu wurde zunächst das Medium entnommen und im Anschluss wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin und fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Durch Zugabe von Medium und Abnahme einer errechneten Menge der Zellsuspension wurde die Wirkung des Trypsins aufgehoben und die gewünschte Verdünnung erzielt. Die entnommene Zellsuspension konnte dann entweder in einer weiteren Zellkulturflasche subkultiviert oder entsorgt werden. Die 250 ml Zellkulturflaschen wurden mit je 12 ml Medium aufgefüllt.

3.1.3. Kryokonservierung

Zur Konservierung der Zellen wurden diese in Dimethylsulfoxid(DMSO)-haltigem Medium in einem Stickstofftank gelagert. Dafür wurden zunächst wie in 3.1.2 erläutert die Zellen vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension in ein 14 ml Röhrchen überführt. Nachdem das Röhrchen mit Medium aufgefüllt wurde, wurde es für 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in einem zuvor vorbereiteten Einfriermedium bestehend aus 50% RPMI Medium, 40% FCS und 10% DMSO resuspendiert. Jedes Kryoröhrchen wurde nun mit 1 ml der Suspension befüllt und zügig bei -80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter langsam heruntergekühlt. Im Anschluss konnten die Zelllinien langfristig im Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert werden.

3.1.4. Auftauen der kryokonservierten Zellen

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden diese zunächst zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und mit Medium versetzt. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Das zugesetzte Medium wird nach circa 24 Stunden gewechselt, um mögliche Reste des toxischen DMSOs zu entfernen.

3.1.5. Ernten der ausgesähten Zellen

Wenn die Zellkultur auf dem Flaschenboden eine Konfluenz von mindestens 70% erreicht hatte, wurden die Zellen geerntet und für Experimente genutzt. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und circa 15 Minuten mit *Cell Dissociation Buffer* bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn die Zellen sich unter dem Lichtmikroskop als gelöste Einzelzellen darstellten, wurden sie mit Medium versetzt und in ein 14 ml Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension konnte nun für weitere Experimente verwendet werden.

3.2. Anreicherungsverfahren

Bei allen Etablierungsexperimenten sind mindestens 3 Replikate durchgeführt worden.

3.2.1. Vorbereitung von Zelllinienzellen für *Spike-In*-Experimente

Nach dem Ernten der Zelllinienzellen wie in 3.1.5 beschrieben wurde 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei gewünschter Vorfärbung mit 1 µl *Cell Tracker Green* für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je nach Größe des Zellpellets in 500 µl bis 1 ml PBS resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml errechnet und die benötigte Menge der Suspension für die gewünschte Zellanzahl berechnet. Diese Menge wurde sowohl in die Probe pipettiert, als auch auf alle 3 Senken eines vorbereiteten Objektträgers mit je 100µl PBS, der zur Kontrolle der Zellzahl ausgezählt wurde.

3.2.2. Gewinnung der mononukleären Zellfraktion aus Vollblut

In ein *SepMate PBMC Isolation Tube* wurden 15 ml Ficoll Paque (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) pipettiert und anschließend 5 ml Vollblut einer Patientinnenprobe oder gesundes Probandenblut mit versetzten Zelllinienzellen darauf geschichtet. Bei anschließender zehnmütiger Zentrifugation (1200 ×g bei Raumtemperatur) wurde die Probe anhand der Dichte in Plasma, die mononukleäre Zellfraktion und durch die Zuckerlösung davon getrennte Erythrozyten- und Granulozytenfraktion separiert.

Die oberen Schichten -Plasma und mononukleäre Zellen- werden in ein 14 ml Röhrchen abgekippt, mit PBS mit 2% zugesetztem FCS aufgefüllt, invertiert und bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird in ein weiteres Röhrchen überführt und das verbleibende Pellet in PBS mit 2% zugesetztem FCS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Überstände beider Röhrchen verworfen.

Das Pellet des ursprünglichen Röhrchens wird in 400µl Puffer 2 resuspendiert und in ein 1,5 ml *Protein LoBind Tube* überführt. Die Pipettenspitze und das Röhrchen wurden anschließend mit 100µl Puffer 2 gewaschen. Das Pellet des

Überstandröhrchens wird in 100 µl Puffer 2 resuspendiert und ebenfalls in das *Protein LoBind Tube* gegeben.

3.2.3. Inkubation mit biotinylierten Antikörper

Zu den 600µl der Probe wurden 20µl (1µg) des biotinylierten CD49f-AK und 6µl (2,25µg) des biotinylierten Trop2-AK hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei vier Grad Celcius und langsamer Rotation inkubiert. Durch zweifache achtminütige Zentrifugation bei 350 xg und 8°C, Abtragung des Überstandes sowie anschließender Resuspension des entstandenen Pellets in Puffer 2 wurden die überschüssigen AK ausgewaschen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

3.2.4. Trop2-/CD49f-abhängige CTC-Anreicherung mittels IsoFlux

Im nächsten Schritt erfolgt - bei geplanter Anreicherung der Probe im IsoFlux - die Inkubation mit den Biotin-bindenden *Beads*. Nach zweimaligem Waschen der *Beads* in Puffer 1 wurden je 10µl der *Beads*-Suspension zu jeder Probe dazugegeben und das Gemisch für 20 Minuten bei 4°C und langsamer Rotation inkubiert.

Durch Inkubation des Probenbehälters für den IsoFlux mit FCS sollte das Adhären von Zellen und *Beads* am Rande der Probenkammer reduziert werden, um einen möglichst geringen Zellverlust zu gewährleisten. Danach wurde eingefüllter Puffer 2 als Präparationsvorgang im IsoFlux-System durch die Kapillare des Probenbehälters gezogen, durch die im Anschluss die Probe laufen sollte.

Die Suspension aus PBMCs und AK-Gemisch und den magnetischen *Beads* wurde im Anschluss an den Präparationsdurchlauf in die Probenkammer gegeben und der Anreicherungs-IsoFlux-Lauf gestartet. Nach Abschluss des Laufes befand sich im Probenbehälter die aus der Probe mittels IsoFlux-Magneten extrahierte *Bead*- und Zellfraktion. [75]

Durch zweifache Zugabe von je 50µl Puffer 2 wurde das Pellet im Probenbehälter resuspendiert und die Zellreste aus dem Behälter gewaschen, sodass die Suspension aus *Beads* und selektierter Zellfraktion zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung stand.



Abbildung 1: IsoFlux CTC System (Fluxion Biosciences)

Mit Antikörpern und immunomagnetischen Beads beladene Patientinnenblutproben wandern durch einen mikrofluiden Kanal, der in der Isolationszone breiter wird und so eine Isolation der Zellen bei geringerer Durchflussgeschwindigkeit erlaubt. Die Isolation erfolgt mittels eines magnetischen Feldes, das die magnetischen Beads mit den angehafteten Zellen von der Restprobe trennt.

[75]

Im Anschluss an die Anreicherung im IsoFlux wurde je nach Probenart unterschiedlich verfahren.

Bei Prozessierung einer EDF, also einem bereits mittels EpCAM-AK angereicherten Probenrest, oder bei Vollblutproben, in denen im EpCAM-abhängigen CellSearch keine CTC nachgewiesen werden konnte, wurde um den Zellverlust möglichst gering zu halten, ein Cytospin-Präparat angefertigt, dass im Anschluss gefärbt wurde, wie in 3.2.4.3 beschrieben. Zuvor wurden wie in 3.2.4.2 die *Beads* von den angereicherten Zellen abgelöst.

Bei Proben mit zu erwartender hoher CTC-Zahl wurde eine Färbung in Suspension inklusive der EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin wie in 3.2.4.1 durchgeführt. Anschließend erfolgte nach der *Beads*-Ablösung (3.2.4.2) die Aufbringung auf Objektträger mittels Cytospin, einer Technik bei der mittels Zentrifugation

Dünnschichtpräparate erstellt werden, sodass eine Analyse der Zellen mittels ImageJ nach Identifikation und Dokumentation im CellCelector möglich war.

Wenn eine spätere Isolierung der CTCs mittels CellCelector geplant war, erfolgte die Platzierung und Färbung auf vorbereiteten Sievewell *Multiwell Slides*, wie in 3.2.4.4 beschrieben.

3.2.4.1. Färbung der angereicherten Zellen in Suspension

Die 100µl der Probe nach dem IsoFlux-Lauf wurden mit 100µl eines AK-Gemisches inklusive Saponin zur Permeabilisierung für eine Stunde bei Raumtemperatur und langsamer Rotation inkubiert und anschließend zweimal mit Puffer 1 gewaschen.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur Färbung der angereicherten Zellen

Antikörper	Konzentration	Fluoreszenzkanal
Saponin	1:5	-
Hoechst	1:10	DAPI
CK	1:100	TRITC
Anti-E-Cadherin	1:25	FITC
Anti-Vimentin	1:2000	Cy5
Anti-CD45	1:12,5	Cy7
Puffer 2	Auffüllen auf 100 µl	-

3.2.4.2. Ablösen der Beads

Die an *Beads* gebundenen Zellen wurden in vorgewärmtem (37°C) Puffer 3 resuspendiert und DNase (*CELLlection Releasing Buffer* des *CELLlection Biotin Binder Kit*) wurde hinzugegeben. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur und langsamer Rotation wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren von den *Beads* gelöst und bei Anhalten eines Magnetes aus dem Reaktionsgefäß entnommen. Die

Zellen der entnommenen Flüssigkeit wurden mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht und dieser nach Zugabe von *Mounting Medium* eingedeckelt.

3.2.4.3. Färbung von Präparaten aus dem Cytospin nach dem Ablösen der *Beads*

Nach Fixierung der Probe auf einen Objektträger mittels Cytospin wurde diese zunächst für mindestens 24 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger mittels *CellSave*-Konservierungsmittel fixiert und mit 0,1% Triton permeabilisiert. Mit *Dako Protein Block* sollten unspezifische Bindungen reduziert werden. Anschließend wurde das Präparat mit in der Tabelle 10 aufgelistetem AK-Gemisch zur Färbung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Nun konnte eine Analyse unter dem CellCelector erfolgen. Zellen mit positivem DAPI- sowie CK- und negativem CD45-Signal wurden als CTCs gewertet.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper zur Färbung der Zellen auf Objektträgern nach Anfertigung mittels Cytospin

Antikörper	Konzentration	Fluoreszenzkanal
DAPI	1:20	DAPI
CK	1:100	TRITC
CD45	1:25	Cy5
Dako AK-Diluent	Auf 100µl auffüllen	-

3.2.4.4. Platzierung und Färbung der Probe auf Sievewell *Multiwell Slides*

Die verwendeten Sievewell *Multiwell Slides* bestehen aus einer oberen und einer unteren Kammer. Die obere Kammer besteht aus zahlreichen Senken, die in ihrer Mitte durch 2µm große Poren mit der unteren Kammer in Verbindung stehen. Flüssigkeit kann über zwei seitliche Löcher der unteren Kammer entnommen werden und feste Bestandteile wie Zellen, die größer sind als die Poren der oberen Kammer, verbleiben in den Senken [76].

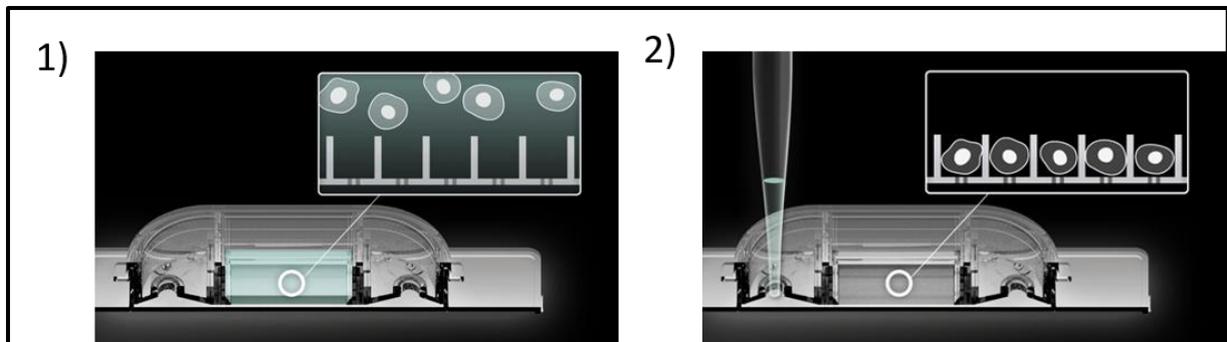


Abbildung 2: Sievewell Multiwell Slides

Bild 1: Die Probe wird in Suspension auf die Kammer aufgetragen, die Zellen schwimmen frei.

Bild 2: Die Flüssigkeit wird aus der unteren Kammer entnommen, die Zellen setzen sich in die Senken.
[76]

Vor dem Auftragen der Probe auf die Objektträger wurde dieser zunächst mit Ethanol inkubiert und im Anschluss dreifach mit PBS gewaschen. Zur Reduzierung der Adhäsion von Zellen am Material der Kammern, wurden diese zusätzlich eine halbe Stunde vor Beladung mit der Probe mit dem BSA-haltigen Puffer 1 gefüllt.

Nach dieser Zeit wurde so viel Puffer entnommen, dass sich zusammen mit der im Anschluss in die obere Kammer zugegebene Probe 1 ml Flüssigkeit in den Kammern befand.

Sollten im vorherigen Schritt die *Beads* mittels DNase abgelöst worden sein, wurden die Zellen zunächst zweimal gewaschen durch Zugabe von 1 ml PBS, dreiminütigem Verbleib auf einem Schüttler und anschließender Flüssigkeitsabnahme über die Löcher der unteren Kammer.

Nach Zugabe der Probe in die obere Kammer des vorbereiteten Objektträgers und dem Auswaschen der DNase –falls eine vorherige *Beads*ablösung durchgeführt worden war – wurde die Flüssigkeit abgenommen. Auf die trockene Kammer wurden dann 500 µl AK-Gemisch mit den doppelten Konzentrationen der AK, die in Tabelle 10 aufgelistet sind, gegeben. Nach einer Stunde Inkubation auf dem Schüttler wurde die Probe dreimal mit Puffer 1 gewaschen und im letzten Schritt mit diesem auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend stand die Probe mit den gefärbten angereicherten Zellen auf

dem Sievewell *Multiwell Slides* zur Analyse und Einzelzellisolation mittels CellCelector bereit.

3.2.1. EpCAM-abhängige Anreicherung mittels CellSearch

Die zu Vergleichszwecken durchgeführte EpCAM-abhängige Anreicherung von CTCs aus Patientinnenproben erfolgte im CellTracks Autoprep System mittels CellSearch CTC Kit nach Herstellerprotokoll. Die Anreicherung der CTCs erfolgt mittels EpCAM-Antikörpern sowie immunomagnetischen Ferrofluiden. Als CTCs werden im Anschluss im Analyse-System des Cell Tracks Analyzer II Zellen gewertet, die eine positives Signal für CK sowie ein negatives Signal für CD45 aufweisen. [77] Wenn eine Verarbeitung der EDF erfolgen sollte, wurde diese mittels des *Automatic Sample Collection Device* aufgefangen [54].



Abbildung 3: CellSearch-System
CellTracks Autoprep System zur Anreicherung und CellTracks Analyzer II zur Analyse von CTCs [78]

3.2.2. CTC-Anreicherung mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf

Als alternatives standardisiertes Anreicherungsverfahren zu dem mittels IsoFlux wurde die Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung im CellSearch etabliert.

Nach der wie in 3.2.2-3.2.3 beschriebenen Separierung der PBMCs aus Vollblut, Inkubation mit den biotinylierten AK und Waschung mit Puffer 2, wurde nach Zentrifugation der Überstand abgenommen, das Pellet mittels des Verdünnungspuffer aus dem CellSearch-Kit resuspendiert und in ein CellSearch-Röhrchen überführt. Zur Imitation eines Erythrozytenlevels für die spätere Abtragung im CellSearch-System wurde das untere Drittel des Röhrchens angefärbt. Nach Auffüllen der Probe auf 14 ml wurde sie nach CellSearch-Protokoll zentrifugiert.

Das jeweils genutzte CellSearch-Kit (CTC, CXC oder Profile) wurde so modifiziert, dass es EpCAM-unabhängig arbeitet. Dazu wurden die EpCAM-Ferrofluide gegen Streptavidin-Ferrofluide ausgetauscht, die an das Biotin der verwendeten CD49f- und Trop2-AK binden können. Außerdem wurde das *Capture Enhancement Reagent*, der normalerweise zur Verstärkung der Menge an EpCAM-Ferrofluiden pro gebundener Zelle führt, gegen PBS ausgetauscht. Alle weiteren Schritte und der CellSearch-Lauf erfolgten nach Herstellerprotokoll, so dass Proben deren Anreicherung durch CellSearch-CTC- oder CXC-Kit erfolgt ist, während des Laufes bereits für CK, DAPI und CD45 gefärbt werden.

Proben, die mittels CellSearch-CTC- oder CXC-Kit prozessiert wurden, wurden im Anschluss mittels CellTracks Analyzer II gescannt und analysiert. In diesem System werden Zellen als CTCs gewertet, wenn sie ein positives Signal für CK und DAPI aufweisen, sowie CD45 negativ sind. Nach Gabe der Probe auf Sievewell *Multiwell Slides* (3.2.4.4) ohne Färbung erfolgte die Einzelzellisolierung wie unter Punkt 3.2.7 beschrieben.

Proben, die mittels CellSearch-Profile-Kit prozessiert wurden, wurden nach Gabe auf Sievewell *Multiwell Slides* wie in 3.2.4.4 beschrieben gefärbt und erst im Anschluss mittels CellCelector isoliert. Die Bilder der CTCs aus diesen Proben konnten mittels ImageJ auf ihre E-Cadherin- und Vimentinexpression untersucht werden.

3.2.3. Analyse der Proben und Isolation der Einzelzellen im CellCelector

Alle prozessierten Proben, die mittels IsoFlux angereichert wurden oder bei denen Einzelzellen isoliert werden sollten, wurden mit dem CellCelector analysiert und Bilder der Zellen in allen Kanälen, für die eine AK-Färbung vorlag, aufgenommen. Zellen, die ein Signal für CK und DAPI zeigten, aber kein CD45-Signal aufwiesen, wurden als CTCs gewertet. Proben, die mittels CellSearch angereichert wurden, wurden nur mittels CellTracks Analyzer II analysiert, falls keine Isolation der Zellen geplant war.

Tumorzellen aus Proben, die auf Sievewell *Multiwell Slides* aufgebracht wurden oder die sich in einem CellSearch-Probenbehälter befanden, konnten mittels des Zellisolutionsroboters, des CellCelectors isoliert, in einen PCR-Probenbehälter abgelegt und bei -80°C eingefroren werden.

3.3. Methoden der CTC-Analyse

3.3.1. Expressionsanalyse E-Cadherin und Vimentin

Die Bilder der im CellCelector als CTCs identifizierten Zellen wurden mittels ImageJ weiter analysiert. Dabei wurde die durchschnittliche Fluoreszenz der E-Cadherinfärbung im FITC-Kanal und die durchschnittliche Fluoreszenz der Vimentinfärbung im Cy5-Kanal ermittelt. Das Verhältnis von E-Cadherin- geteilt durch Vimentinexpression wurde zur Einschätzung des EMT-Status genutzt.

3.3.2. Analyse der Zellmorphologie

Die CTCs, die im CellSearch gefärbt und mittels CellTracks Analyzer gescannt wurden, wurden im Anschluss mittels ImageJ analysiert. Die EpCAM-abhängig angereicherten CTCs wurden hinsichtlich Größe, Zirkularität und Stärke der CK-Fluoreszenz mit den Trop2-/CD49f-abhängig angereicherten CTCs verglichen.

3.3.3. DNA-Amplifikation mittels *Whole Genome Amplification* (WGA)

Die DNA der isolierten Zellen wurde mittels WGA mit dem Ampli1 WGA Kit amplifiziert. Die folgende Messung der DNA-Integrität erfolgte mittels Ampli1 QC Kit.

3.3.4. DNA-Analysen der isolierten CTCs

Die WGA-Produkte mit der höchsten Qualität wurden zur Analyse der Kopienzahlvarianten mittels Ampli1 Low Pass Kit und dem MiSeq-System von Illumina sequenziert [79]. Die Analyse der CTC-DNA wurde im Fraunhofer Institut Regensburg durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Immunfluoreszenzfärbungen an Zelllinienzellen

Zur Evaluation des EMT-Status angereicherter CTCs wurden ein epithelialer (E-Cadherin) und ein mesenchymaler Marker (Vimentin) zur Färbung ausgewählt.

Um diese Marker später an Patientinnenproben anwenden zu können, musste zunächst eine Färbung etabliert werden. Dazu wurden beide Marker in verschiedener Verdünnungen getestet. Als Positivkontrolle für die E-Cadherin-Färbung diente die luminale und eher epitheliale Zelllinie MCF-7. Als Positivkontrolle für die Vimentin-Färbung diente die triple-negative Zelllinie MDA-MB-231, die einen eher mesenchymalen Phänotyp besitzt. [80, 81]

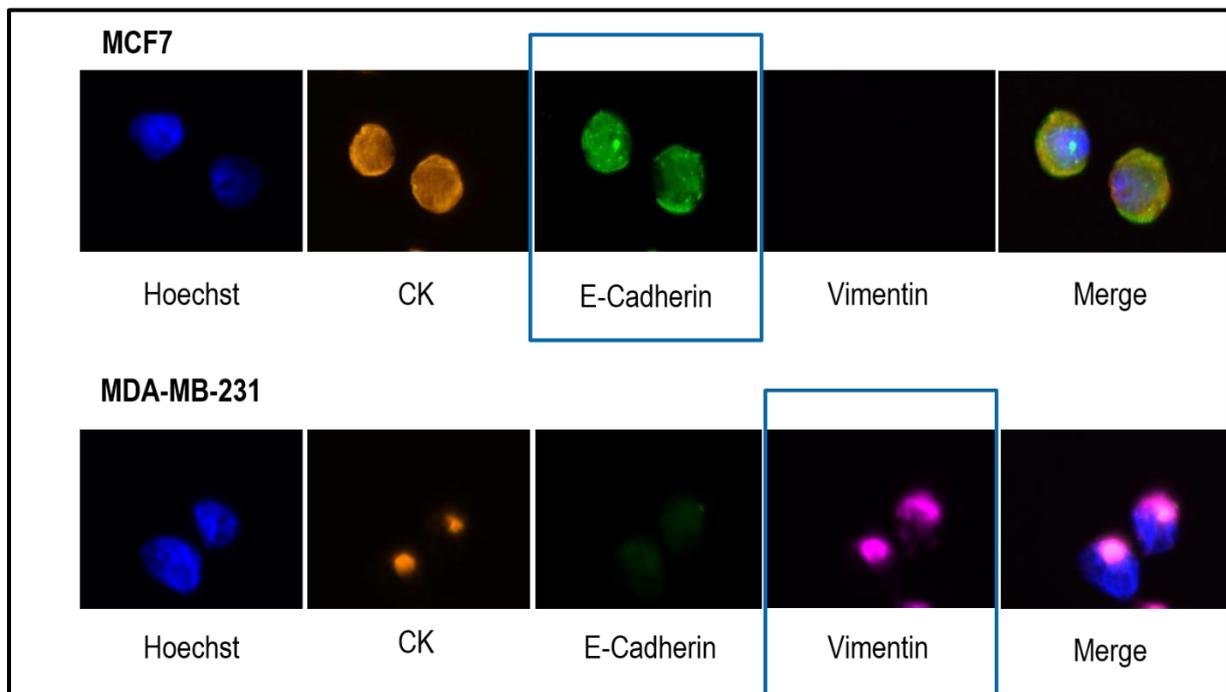


Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Färbung für epithelialen und mesenchymalen Marker

Zellen der Linien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden in Suspension entsprechend der Tabelle 11 gefärbt, mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem 40x-Vergrößerungs-Objektiv ausgewertet.

Tabelle 11: Färbung der Zelllinien, Antikörper mit jeweiligem Kanal

Fluoreszenzkanal	Antikörper
DAPI	Nucblue Live Cell Stain Ready Probes reagent (Hoechst)
TRITC	CK
FITC	E-Cadherin
Cy5	Vimentin

Zur Validierung der unveränderten Expression der Marker durch die geplante EpCAM-unabhängige Anreicherung und durch die Färbung auf Sievewell *Multiwell Slides* wurden die Referenzbilder sowohl ohne Anreicherung als auch mit Anreicherung und mit Färbung auf Sievewell *Multiwell Slides* aufgenommen.

Alle Bilder wurden mittels ImageJ analysiert und es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Expressionsverhältnisses von E-Cadherin zu Vimentin bei den Zelllinienzellen durch die Anreicherungsmethode. Hinsichtlich der Diskrepanzen zwischen den verglichenen Zelllinien zeigte sich ein signifikanter Unterschied im E-Cadherin- zu Vimentinexpressionsverhältnis zwischen den MDA-MB-231- und den MCF-7-Zellen. Wie erwartet zeigten die luminalen MCF-7-Zellen ein deutlich höheres Expressionsverhältnis zugunsten der E-Cadherinexpression.

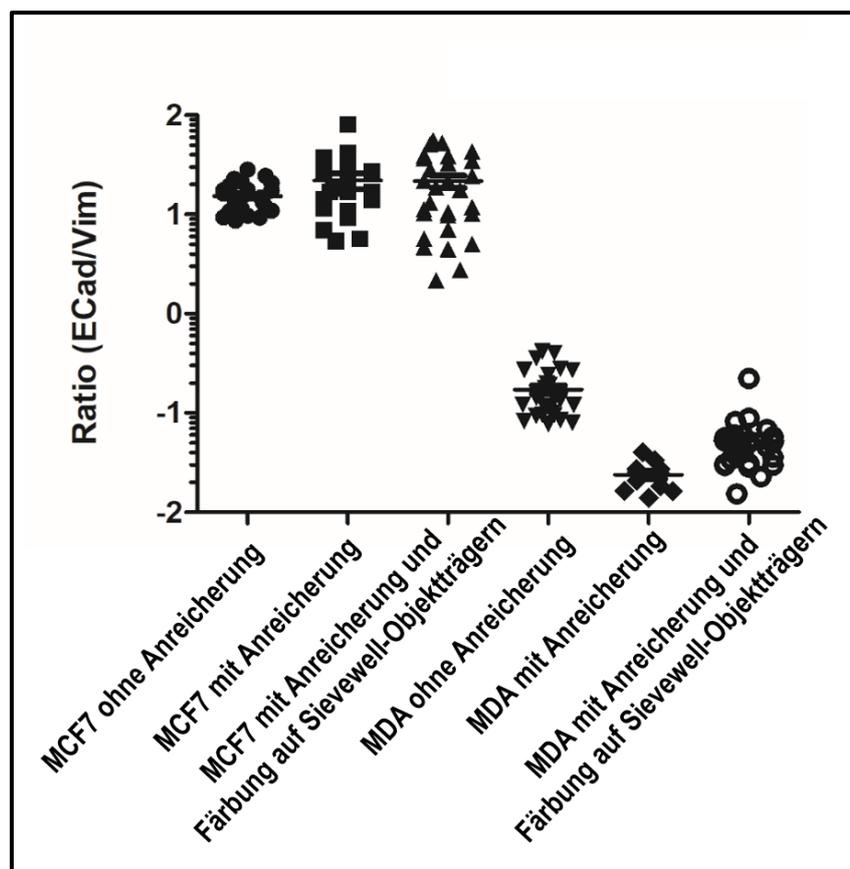


Abbildung 5: MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen als Referenzen der Expression von E-Cadherin und Vimentin

Zellen der Linien MDA-MB-231 und MCF-7 wurden mittels E-Cadherin- und Vimentin- Fluoreszenz-AK gefärbt. Die Färbung wurde mit beiden Zelllinien jeweils ohne Anreicherung in Suspension, mit Anreicherung durch Trop2- und CD49f-AK und Färbung in Suspension, und mit Anreicherung und folgender Färbung auf Sievewell *Multiwell Slides* durchgeführt. Ziel war es, zu ermitteln, ob die

Anreicherung und die Färbungsmethode einen Einfluss auf das Verhältnis der E-Cadherin- zu Vimentin-Expression hat. Innerhalb einer Zelllinienzellgruppe (MCF7 und MDA-MB-231) zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Expressionsquotienten durch die Prozessierung. Vergleicht man jedoch die MCF7- und MDA-MB-231-Expressionen miteinander so zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in allen verglichenen Gruppen unabhängig vom Prozessierungsschritt.

Statistik: Two Way Anova mit posthoc Bonferroni Test

Zusätzlich zur Möglichkeit der Abschätzung des EMT-Status sollte die an Patientinnenproben angewandte Färbung eine sichere Abgrenzung von Tumorzellen zu PBMCs ermöglichen. Aus diesem Grund wurde eine CD45-Färbung, die PBMCs identifiziert, für den Cy7-Kanal etabliert. Als Positivkontrolle dienten mittels Ficoll separierte Leukozyten aus gesundem Spenderblut und als Negativkontrolle dienten die Zelllinien MDA-MB-231 und Sk-Br-3.

4.2. Vergleich EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger Anreicherung von Zelllinienzellen im IsoFlux

Die Anreicherung von CTCs aus Patientinnenblut erfolgt beim IsoFlux-System mit einem Magnetfeld, das immunomagnetische *Beads* isolieren kann, die an biotinylierte AK binden. Im Original-Kit des Herstellers sind AK gegen EpCAM enthalten, die an die immunomagnetischen *Beads* binden. Dieses Kit wurde als Vergleich zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung mittels den zwei ebenfalls biotinylierten AK gegen Trop2 und CD49f genutzt.

Es konnte ein signifikanter Zugewinn der Zellzahl bei der Anreicherung der EpCAM niedrig-exprimierenden Zelllinie MDA-MB-231 mittels AK-Gemisch im Vergleich zur Anreicherung mittels EpCAM-abhängigem Fluxion Kit aufgezeigt werden. Bei der EpCAM hoch-exprimierenden Zelllinie SkBr3 hingegen zeigte sich ein Anstieg der Wiederfindungsrate durch die EpCAM-unabhängige Anreicherungsform, der jedoch statistisch nicht signifikant war.

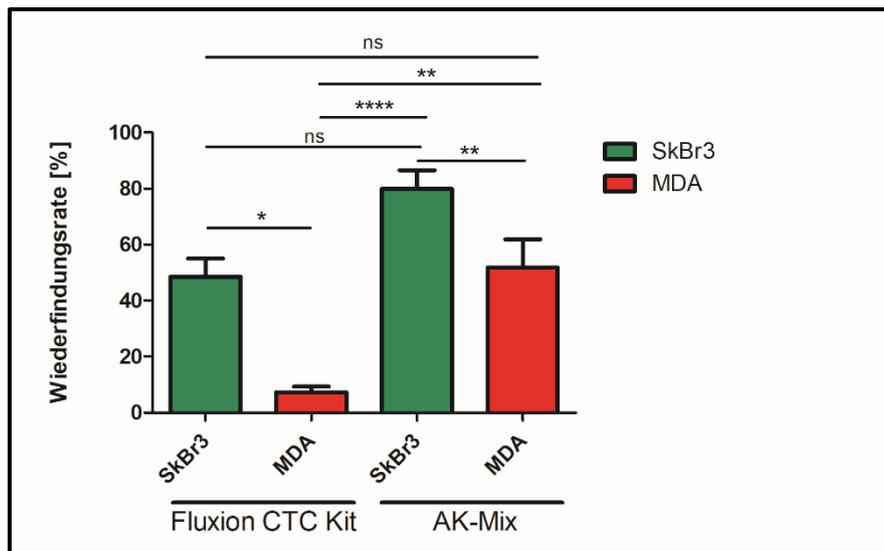


Abbildung 6: Wiederfindungsrate von Zellen der Linie Sk-Br-3 und MDA-MB-231, Fluxion CTC Kit vs. Antikörper-Gemisch

Es wurden jeweils 500 mittels CellTracker Green vorgefärbte Zellen zum einen der Zelllinien Sk-Br-3 und zum anderen MDA-MB-231 in 5 ml Vollblut von gesunden Probandinnen gegeben. Diese wurden entweder nach der Separierung der mononukleären Fraktion durch Dichtezentrifugation mit Ficoll mittels Fluxion CTC Kit im IsoFlux-System nach Herstellerprotokoll angereichert oder mit einem Trop2- und einem CD49f-AK inkubiert und mittels immunomagnetischen *Beads*, die an die biotinylierten AK binden, im IsoFlux-System angereichert. Die angereicherten Zellen aller Proben wurden im CellCelector ausgezählt.

Statistik: Two Way Anova mit posthoc Bonferroni Test

Fluxion CTC Kit:MDA-BM-231 vs. Fluxion CTC Kit:SKBR3: p-Wert 0,0272

Fluxion CTC Kit:MDA-BM-231 vs. AB Mix:MDA-BM-231: p-Wert 0,0030

Fluxion CTC Kit:MDA-BM-231 vs. AB Mix:SKBR3: p-Wert 0,9828

Fluxion CTC Kit:SKBR3 vs. AB Mix:MDA-BM-231: p-Wert <0,0001

Fluxion CTC Kit:SKBR3 vs. AB Mix:SKBR3: p-Wert 0,0663

AB Mix:MDA-BM-231 vs. AB Mix:SKBR3: p-Wert 0,0030

Tabelle 12: Mittelwert Wiederfindungsrate Sk-Br-3- und MDA-MB-231-Zellen, Fluxion Kit vs. Antikörper-Gemisch

Zelllinie	Fluxion Kit	Antikörper-Mix
Sk-Br-3	48,52%	79,99% [69]
MDA-MB-231	7,3%	51,83% [69]

4.3. Anreicherung von Sk-Br-3-Zellen aus EDFs

Um zu testen, ob eine EpCAM-unabhängige Anreicherung von Tumorzellen auch aus bereits mittels CellSearch-prozessierten Proben möglich ist, wurden Zellen der Zelllinie Sk-Br-3 in EDFs, die während der Probenprozessierung im CellSearch

aufgefangen wurden, hineingegeben. Es wurden je 500 vorgefärbte Sk-Br-3-Zellen nach dem unter 3.2.1 beschriebenen Protokoll ausgezählt. Die Proben wurden im Anschluss wie in 3.2.2 - 3.2.4 beschrieben prozessiert.

Die Proben wurden nach 24, 48 und mehr als 48 Stunden verarbeitet, um den optimalen Zeitpunkt der Trop2-/CD49f-abhängigen Prozessierung mit der folglich höchsten Wiederfindungsrate zu ermitteln.

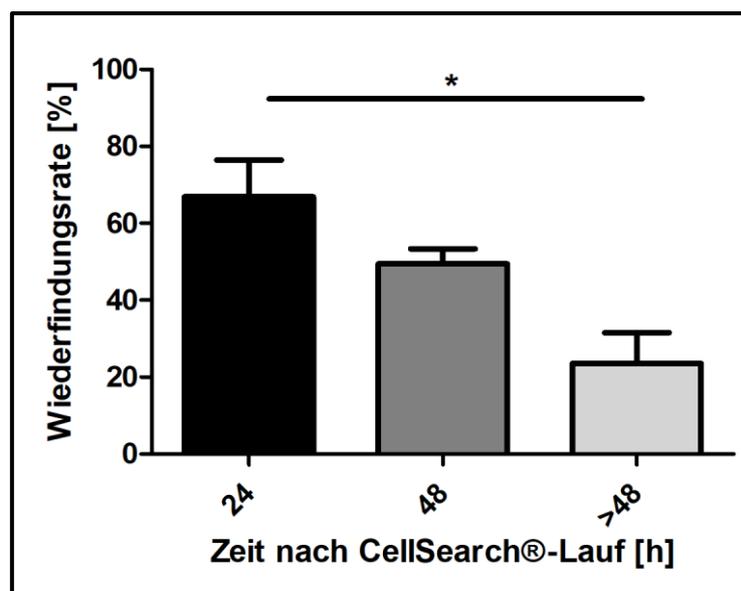


Abbildung 7: Wiederfindungsrate von Sk-Br-3-Zellen [%] in Abhängigkeit des Alters der EpCAM-depletierten Fraktion

Es wurden EDFs von Patientinnenproben, die mittels CellSearch prozessiert wurden, gesammelt und nach 24, 48 oder mehr als 48 Stunden weiterverarbeitet. Dann wurden je 500 mittels CellTracker Green gefärbte Sk-Br-3-Zellen in die EDF gegeben. Die mononukleäre Zellfraktion wurde nach Separierung durch Dichtezentrifugation und Ficoll mit einem Trop2- und einem CD49f-AK inkubiert und mittels immunomagnetischen *Beads*, die an die biotinylierten AK binden, im IsoFlux angereichert und die Zellen anschließend im CellCelector ausgezählt.

Statistik: One Way Anova mit posthoc Bonferroni Test

24h vs. 48h: $p = 0,4616$

24h vs >48h: $p = 0,0275$

48h vs >48h: $0,2532$

Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil angereicherter Zellen an den zugegebenen Zelllinienzellen signifikant höher ist, wenn die EDF möglichst innerhalb von 24 Stunden nach CellSearch-Lauf weiterverarbeitet wird.

Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit EDFs innerhalb von 24 Stunden nach dem jeweiligen CellSearch-Lauf durchgeführt.

4.4. EpCAM-unabhängige Anreicherung von zusätzlichen MDA-MB-231-Zellen im IsoFlux-System nach Prozessierung mittels CellSearch

Um den Nutzen der EpCAM-unabhängigen Anreicherung im Anschluss an die EpCAM-abhängige Anreicherung aufzuzeigen, wurden die EDFs von Blutproben gesunder Probandinnen mit zuvor 500 hinzugegebenen MDA-MB-231-Zellen, die wie in 3.1.5 beschrieben geerntet und wie in 3.2.1 ausgezählt wurden, während des CellSearch-Lauf gesammelt und anschließend zusätzlich Trop2-/CD49f-abhängig mittels IsoFlux prozessiert.

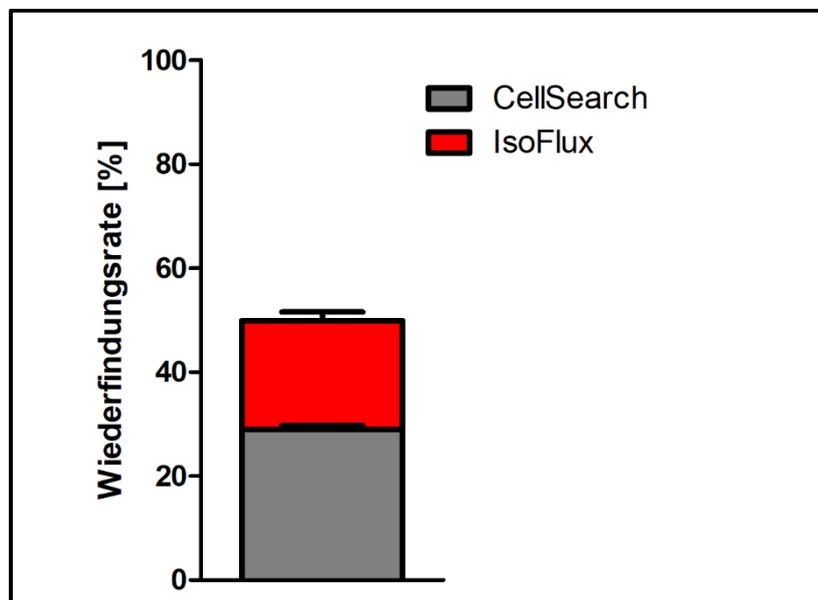


Abbildung 8: Anreicherung von MDA-MB-231-Zellen aus Vollblut mittels CellSearch-Lauf und anschließendem IsoFlux-Lauf

Es wurden je 500 mittels CellTracker Green vorgefärbte MDA-MB-231-Zellen in 7,5 ml Vollblut von gesunden Probanden gegeben. Die Proben wurden dann zunächst nach Herstellerprotokoll mittels CellSearch angereichert und dabei die EDFs gesammelt. Diese wurden dann nach Separierung der mononukleären Zellfraktion durch Dichtezentrifugation und Ficoll mit einem Trop2- und einem CD49f-AK inkubiert und mittels immunomagnetischen *Beads*, die an die biotinylierten AK binden, im IsoFlux angereichert. Anschließend erfolgte die Auszählung der angereicherten Zellen im CellCelector.

Es konnte gezeigt werden, dass EpCAM-abhängig im Mittel 28,91% der zugegebenen MDA-MB-231-Zellen angereichert werden konnten. Bei der anschließenden Prozessierung im IsoFlux konnten mittels AK-Gemisch im Mittel zusätzliche 20,96% der Tumorzellen wiedergefunden werden.

4.5. Gewährleistung hoher *Recovery*-Zahlen bei guter DNA-Qualität durch Optimierung des Färbeprogangs

Führende Ziele bei der Anreicherung mit anschließender Isolierung der Patientinnen-CTCs waren zum einen das Erreichen hoher Zellzahlen mit Abbildung unterschiedlicher CTC-Populationen, sowie zum anderen die Gewährung guter DNA-Qualität für die anschließende Analyse.

Wenn bei der Prozessierung zunächst gefärbt (3.2.4.1) und im Anschluss die *Beads* mittels DNase abgelöst wurden (3.2.4.2), kam es durch die Permeabilisierung der Zellen mit Saponin während der Färbung und der anschließenden Zugabe von DNase zu DNA-Schäden.

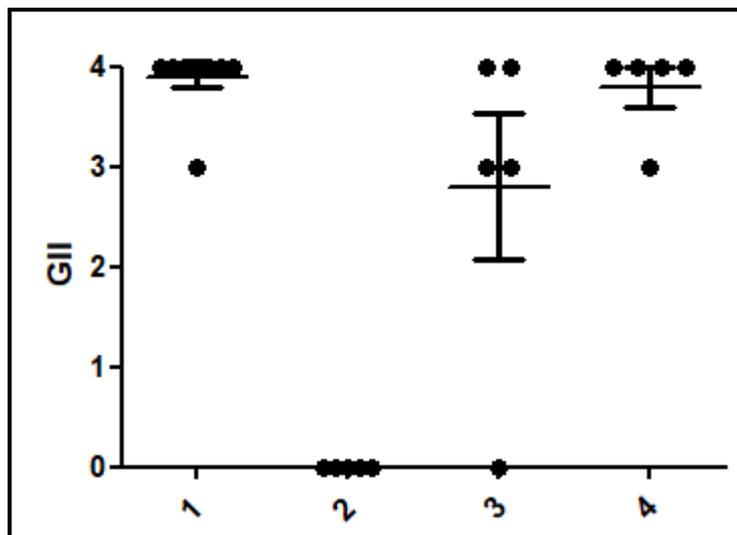


Abbildung 9: Genome Integrity Index nach Polzer et al. [82] der angereicherten CTCs bei unterschiedlichen Arbeitsabläufen

Jeder Punkt repräsentiert das WGA-Produkt einer Zelle.

1: Prozessierung der Probe: Separierung der Probe durch Dichtezentrifugation und Ficoll, Inkubation mit einem Trop2- und einem CD49f-Antikörper (AK) Anreicherung im IsoFlux mittels immunomagnetischen *Beads*, die an die biotinylierten AK binden, keine Färbung

2: Prozessierung der Probe wie in 1, zunächst Färbung, im Anschluss Ablösung der *Beads*

3: Prozessierung der Probe wie in 1, zunächst Ablösung der *Beads*, 1x Waschen vor anschließender Färbung

4: Prozessierung der Probe wie in 1, zunächst Ablösung der *Beads*, 2x Waschen vor anschließender Färbung

Statistik: One Way Anova, posthoc Bonferroni Test

1 vs. 2: $p = <0,0001$

1 vs. 3: $p = 0,0727$

1 vs. 4: $p = 0,9952$

2 vs. 3: $p = <0,0001$

2 vs. 4: $p = <0,0001$

3 vs. 4: $p = 0,2023$

Abbildung 9 zeigt, wie sich der *Genome Integrity Index* bei unterschiedlichen Arbeitsabläufen verhielt. Dieser ist ein Maß für die Qualität von DNA nach erfolgter Durchführung einer WGA. Er wurde von Polzer et. al etabliert und gibt an, bei wie vielen von vier ausgewählten DNA-Fragmenten eine erfolgreiche Multiplex-PCR durchgeführt werden konnte. Daraus kann die Wahrscheinlichkeit für den Erfolg geplanter DNA-Analysen isolierter CTCs je nach Anreicherungs-methode abgeschätzt werden [82].

Wie in Abbildung 9 zu sehen, verursacht die alleinige Anreicherung ohne Färbung keine signifikanten DNA-Schäden, sodass der Arbeitsablauf an sich keine Gefahr für die DNA-Qualität darstellt. Bei Färbung vor Ablösung der *Beads* hingegen, konnte keines der vier DNA-Fragmente in der Multiplex-PCR erfasst werden. Wurden vor der Färbung zunächst die *Beads* abgelöst, konnte ein *Genome Integrity Index* von drei bis vier erreicht werden. Mit zusätzlichen Waschschr-itten konnte die DNA-Qualität darüber hinaus verbessert werden.

Wenn jedoch zunächst die *Beads* abgelöst werden und erst im Anschluss die Färbung durchgeführt wurde, kam es durch das ohne *Beads* farblose und instabile Pellet zu Zellverlusten bei den Waschschr-itten der Färbung.

Um die Ablösung der *Beads* zeitlich gesehen vor die Färbung setzen zu können ohne Zellverluste zu verursachen, wurde die Färbung auf Sievewell *Multiwell Slides*, wie in 3.2.4.4 beschrieben, getestet.

Dazu wurden je 500 Sk-Br-3-Zellen in gesundes Probandinnenblut gegeben, nach Protokoll mittels AK-Gemisch angereichert und im Anschluss die *Beads* abgelöst. Die Probe wurde dann auf die vorbereiteten Sievewell *Multiwell Slides* gegeben, gefärbt und gewaschen. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen im CellCelector ausgezählt. Die Vergleichsproben wurden nach Anreicherung und *Beads*ablösung in Suspension gefärbt, auf einen Standard-Objektträger aufgetragen und ebenfalls im Anschluss im CellCelector ausgezählt.

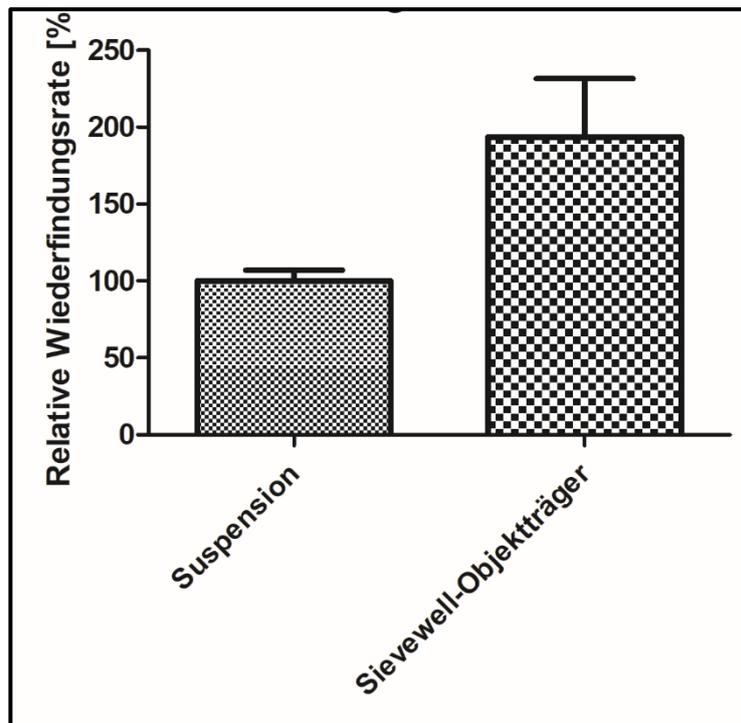


Abbildung 10: Relative Wiederfindungsrate von Sk-Br-3-Zellen in Abhängigkeit der Färbungsmethode

Es wurden je 500 Zellen der Linie Sk-Br-3 in Vollblut gegeben und die Probe wurde separiert durch Dichtezentrifugation und Ficoll. Die mononukleäre Zellfraktion wurde dann mit einem Trop2- und einem CD49f-AK inkubiert. Die Anreicherung erfolgte im IsoFlux mittels immunomagnetischen *Beads*, die an die biotinylierten AK binden. Die angereicherten Zellen wurden dann entweder in Suspension oder auf Sieviewell *Multiwell Slides* gefärbt. Die Wiederfindungsrate wurde nach Auszählung mittels CellCelector errechnet. Die Wiederfindungsrate bei Färbung in Suspension als Ausgangsverfahren wurde als 100% gesetzt und die anderen Prozentzahlen relativ dazu errechnet.

Statistik: t-Test, p-Wert 0,0508

Dabei konnte gezeigt werden, dass die wiedergefundene Zellanzahl bei Färbung auf den Sieviewell *Multiwell Slides* mit 193,68% nahezu doppelt so hoch lag wie beim Färben in Suspension nach Ablösen der *Beads*.

4.6. Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung mittels CellSearch

4.6.1. Erste *Spike-In*-Experimente

Es wurden erste Experimente mit Zelllinienzellen in gesundem Spenderblut durchgeführt, um zu evaluieren ob eine Anreicherung von Tumorzellen mithilfe des AK-Gemisches auch im CellSearch möglich ist. Durch die Nutzung eines standardisierten und automatisierten Gerätes, das auch von der FDA zur Isolierung von CTCs zugelassen ist, sollte der Ablauf der CTC-Anreicherung vergleichbarer gemacht werden.

Die Aufbereitung von je 5 ml gesunden Probandenblut mit den hinzugegebenen Zelllinienzellen erfolgte nach Protokoll (3.2.1-3.2.3). Nach dem Hineingeben der ausgezählten Zellen wurde die Probe mit Ficoll zentrifugiert, um nur noch die mononukleäre Zellfraktion zu erhalten. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den biotinylierten Trop2- und CD49f-AKs und die Zentrifugation nach CellSearch-Protokoll. Die Anreicherung im Autoprep System wurde mit einem modifizierten CellSearch CTC-Kit durchgeführt, sodass statt der EpCAM-Ferrofluide Streptavidin-Ferrofluide zur Probe hinzugegeben wurden, die an die biotinylierten AK binden. Die durch den CellSearch detektierte Zellfraktion, die im Probenbehälter angesammelt wurde, wurde im Anschluss mittels CellTracks Analyzer II eingescannt und analysiert.

Es wurden sowohl Experimente mit Sk-Br-3-Zellen, als auch MDA-MB-231-Zellen ausgeführt.

Im ersten Testlauf wurden 250 vorgefärbte Sk-Br-3-Zellen zusammen mit 250 vorgefärbten MDA-MB-231-Zellen in eine Blutprobe hineingegeben. Zur anschließenden Unterscheidung von Sk-Br-3- und MDA-Zellen wurde im CellSearch zum CXC-Kit der HER2/neu-Marker hinzugegeben, der nur bei den HER2-positiven-Sk-Br-3-Zellen ein eindeutig positives Signal erzeugt.

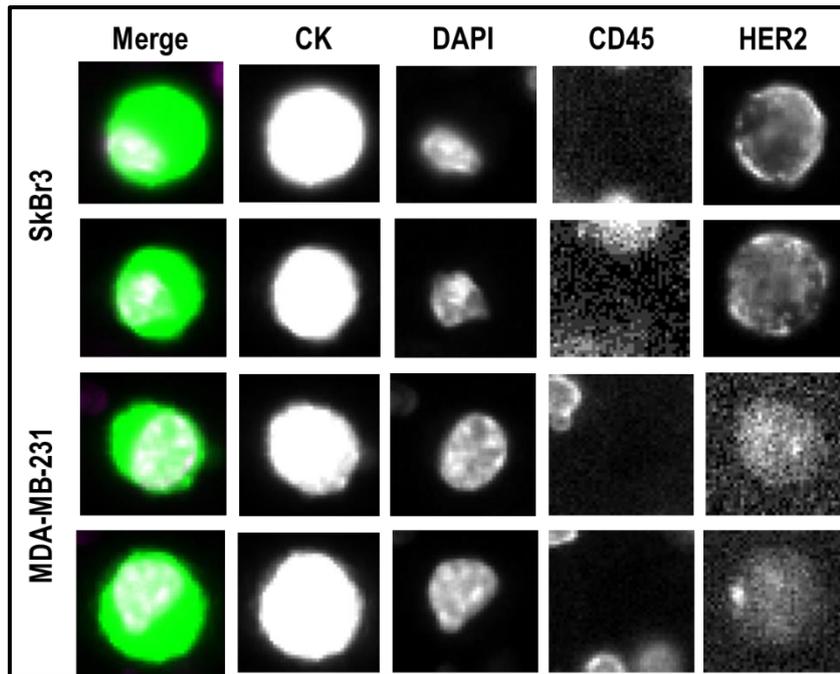


Abbildung 11: Mittels CellSearch-System EpCAM-unabhängig angereicherte, vorgefärbte Zellen der Linien Sk-Br-3 und MDA-MB-231

Es wurden 250 Sk-Br-3- und 250 MDA-MB-231-Zellen, die mit CellTracker Green vorgefärbt wurden, zusammen in 5 ml Vollblut gegeben. Die Anreicherung erfolgte mittels CellSearch-System und Ferrofluiden nach Inkubation der durch Dichtezentrifugation und Ficoll separierten mononukleären Zellfraktion mit biotinylierten AK gegen Trop2 und CD49f. Die Analyse wurde mit dem CellTracks Analyzer II in der voreingestellten Vergrößerung und Belichtungszeit durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung beider Zelllinien –Sk-Br-3 sowie MDA-MB-231 - mittels EpCAM-unabhängigen CellSearch und modifiziertem CellSearch-CTC Kit möglich ist.

In einem weiteren Experiment wurden je 500 Sk-Br-3-Zellen und 500 MDA-MB-231-Zellen unabhängig voneinander in zwei getrennte Blutproben gegeben. Die Prozessierung erfolgte nach gleichem Vorgehen.

Auch hier konnte gezeigt werden, dass sowohl Sk-Br-3-, als auch MDA-MB-231-Zellen mittels des AK-Gemisches und Ferrofluiden im CellSearch angereichert werden können.

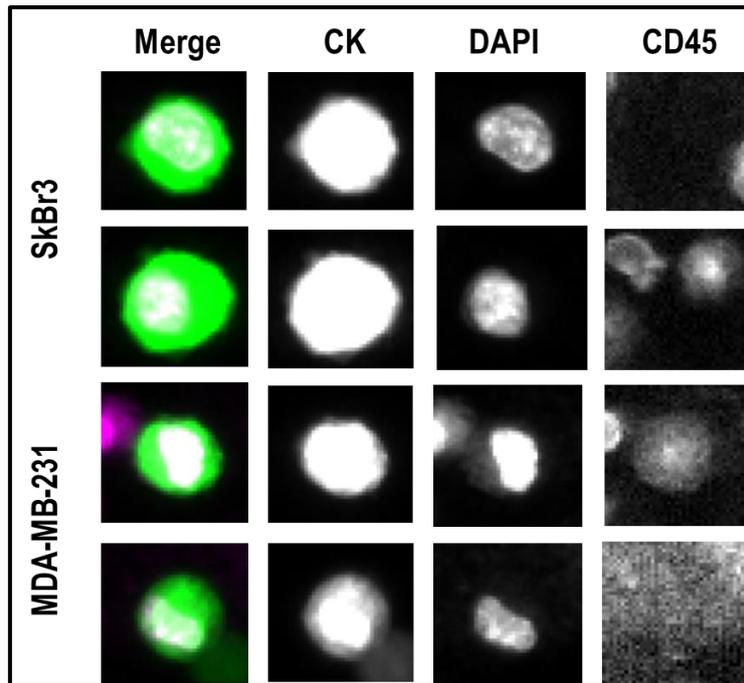


Abbildung 12: Mittels CellSearch-System EpCAM- unabhängig angereicherte, vorgefärbte Zellen der Linien Sk-Br-3 und MDA-MB-231 aus getrennten Blutproben

Es wurden 500 Sk-Br-3- und 500 MDA-MB-231-Zellen, die mit CellTracker Green vorgefärbt wurden, getrennt in je 5 ml Vollblut gegeben. Die Anreicherung erfolgte mittels CellSearch-System und Ferrofluiden nach Inkubation der durch Dichtezentrifugation und Ficoll separierten mononukleären Zellfraktion mit biotinylierten AK gegen Trop2 und CD49f. Die Analyse wurde mit dem CellTracks Analyzer II in der voreingestellten Vergrößerung und Belichtungszeit durchgeführt.

Nach den Experimenten mit vorgefärbten Tumorzelllinien wurde als nächster Etablierungsschritt eine Anreicherung ohne Vorfärbung angestrebt, um eine spätere Übertragung der Arbeitsschritte auf Patientinnenproben zu ermöglichen. Dazu wurden 500 SkBr3- und 500 MDA-MB-231-Zellen ohne Vorfärbung in zwei getrennte Blutproben gegeben und die EpCAM-unabhängige Anreicherung im CellSearch wiederholt.

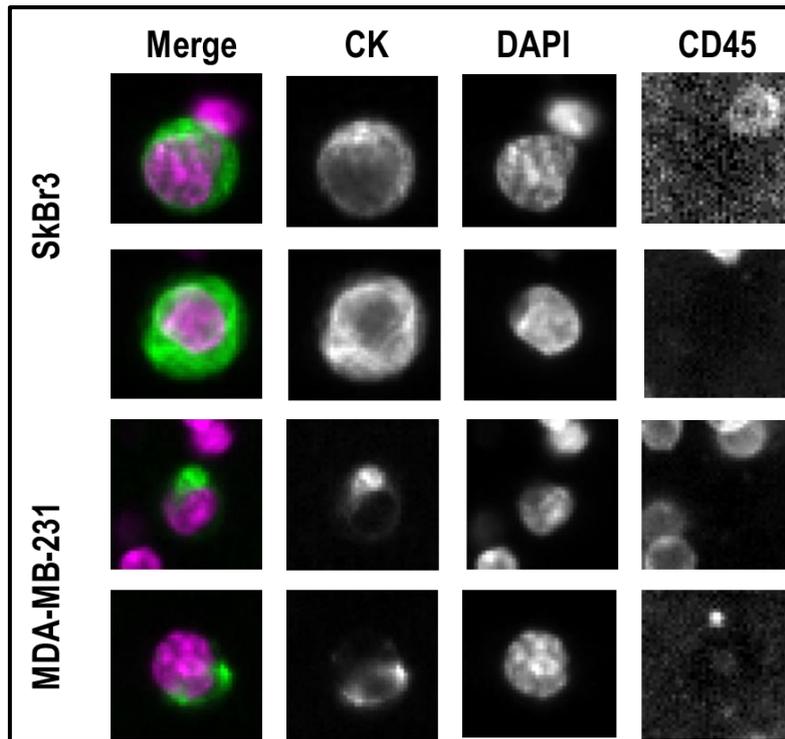


Abbildung 13: Mittels CellSearch-System EpCAM-unabhängig angereicherte Zellen der Linien Sk-Br-3 und MDA-MB-231 aus getrennten Blutproben und ohne Vorfärbung

Es wurden 500 Sk-Br-3- und 500 MDA-MB-231-Zellen ohne Vorfärbung getrennt in je 5 ml Vollblut gegeben. Die Anreicherung erfolgte mittels CellSearch-System und Ferrofluiden nach Inkubation der durch Dichtezentrifugation und Ficoll separierten mononukleären Zellfraktion mit biotinylierten AK gegen Trop2 und CD49f. Die Analyse wurde mit dem CellTracks Analyzer II in der voreingestellten Vergrößerung und Belichtungszeit durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen der beiden ausgewählten Zelllinien auch ohne Vorfärbung mittels des EpCAM-unabhängigen CellSearch-Laufes angereichert werden können.

4.6.2. Titration CD49f-Antikörper für die CellSearch-Anreicherung

Um die Dosierung der AK, die ursprünglich für die IsoFlux-Prozessierung titriert wurden, auf die Detektion des CellSearch anzupassen, wurden gesunde Patientinnenproben mit je 500 hinzugegebenen Zellen in wiederholten Versuchen mit 33%, 100% und 300% der CD49f-Menge, die für die Anreicherung mittels IsoFlux genutzt wurde, versetzt. Es wurden MDA-MB-231-Zellen genutzt, da diese als stammzellnahe Zelllinie eine hohe Expression an CD49f aufweisen [69].

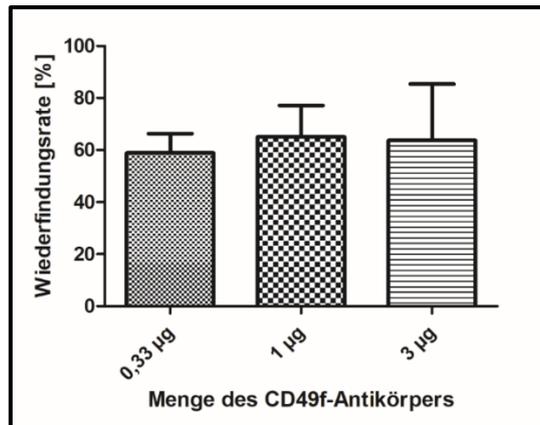


Abbildung 14: Titration CD49f-Antikörper für die EpCAM-unabhängige Anreicherung mittels CellSearch

Es wurden je 500 mittels CellTracker Green vorgefärbte MDA-MB-231-Zellen in Vollblut gegeben. Nach Separierung durch Dichtezentrifugation und Ficoll wurde die mononukleäre Zellfraktion mit dem biotinylierten CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mittels Ferrofluiden im CellSearch prozessiert und die Anzahl der wiedergefundenen Zellen im CellTracks Analyzer ausgezählt.

Statistik: One Way Anova, posthoc Bonferroni Test

0,33 µg vs. 1 µg: $p = 0,9544$

0,33 µg vs. 3 µg: $p = 0,9716$

1 µg vs. 3 µg: $p = 0,9978$

Es konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb des getesteten Bereichs der AK-Menge keine signifikante Erhöhung der Wiederfindungsrate ergibt. Da durch den AK gegen den Stammzellmarker CD49f auch einige PBMCs erfasst werden, könnte eine erhöhte Menge des AK durch die Vermehrung des Hintergrundes zu einer erschwerten Detektion der Tumorzellen im CellSearch führen. Aus diesem Grund wurde die ursprüngliche AK-Menge von 1 µg beibehalten.

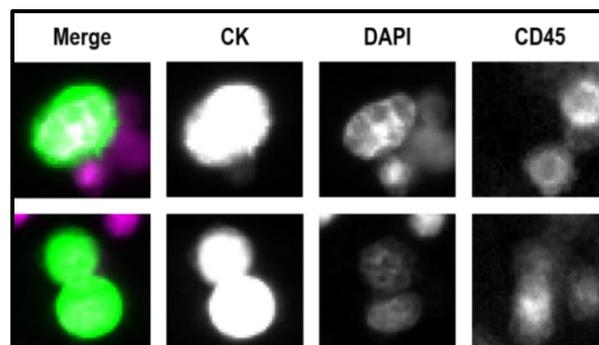


Abbildung 15: Anreicherung von Einzelzellen und Clustern der Zelllinie MDA-MB-231 mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf und CD49f-Antikörper

Es wurden mittels CellTracker Green vorgefärbte MDA-MB-231-Zellen in Vollblut gegeben. Nach Separierung durch Dichtezentrifugation und Ficoll wurde die mononukleäre Zellfraktion mit dem biotinylierten CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss Prozessierung mittels Ferrofluiden im CellSearch und Analyse im CellTracks Analyzer mit standardisierter Vergrößerung und Belichtungszeit.

Ferner konnte gezeigt werden, dass es mittels des CD49f-AK und der Anreicherung im CellSearch möglich ist, sowohl Einzelzellen als auch *Cluster* anzureichern.

4.6.3. Titration Trop2-Antikörper für die CellSearch-Anreicherung

Ebenfalls wurde die optimale Menge des Trop2-AK für die EpCAM-unabhängige Anreicherung im CellSearch austitriert. Auch hier wurde die 1/3-, 1- und 3-fache Menge des AK im Vergleich zur Anreicherung mittels IsoFlux getestet. Da Trop2 vor allem von Zellen der Linie Sk-Br-3 exprimiert wird, wurden diese für die Dosisanpassung genutzt [69].

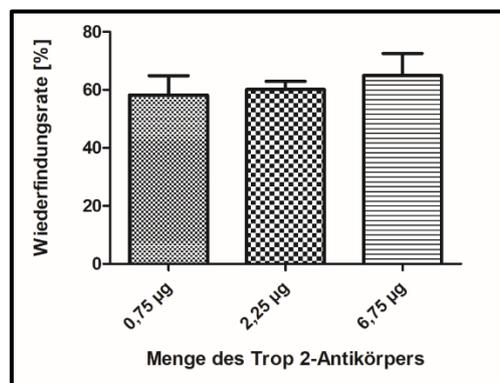


Abbildung 16: Titration Trop 2-Antikörper für die EpCAM-unabhängige Anreicherung mittels CellSearch mittels Sk-Br-3-Zellen

Es wurden je 500 mittels CellTracker Green vorgefärbte Sk-Br-3-Zellen in Vollblut gegeben. Nach Separierung durch Dichtezentrifugation und Ficoll wurde die mononukleäre Zellfraktion mit dem biotinylierten Trop2-AK inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mittels Ferrofluiden im CellSearch prozessiert und die Anzahl der wiedergefundenen Zellen im CellTracks Analyzer II ausgezählt.

Statistik: One Way Anova, posthoc Bonferroni Test

0,75 µg vs. 2,25 µg: $p = 0,9726$

0,75 µg vs. 6,75 µg: $p = 0,7361$

2,25 µg vs. 6,75 µg: $p = 0,8490$

Es konnte keine signifikante Verbesserung der Wiederfindungsrate der hereingegebenen Sk-Br-3-Zellen bei Erhöhung oder Erniedrigung der AK-Menge gezeigt werden, sodass alle weiteren Experimente mit der ursprünglichen Menge von 2,25 µg wie bei der IsoFlux-Anreicherung durchgeführt wurden.

Die Anreicherung von Sk-Br-3-Zellen mittels Trop2-AK zeigte ebenso wie die Anreicherung von MDA-MB-231-Zellen mit dem CD49f-AK, dass sowohl Einzelzellen als auch *Cluster* detektiert werden können.

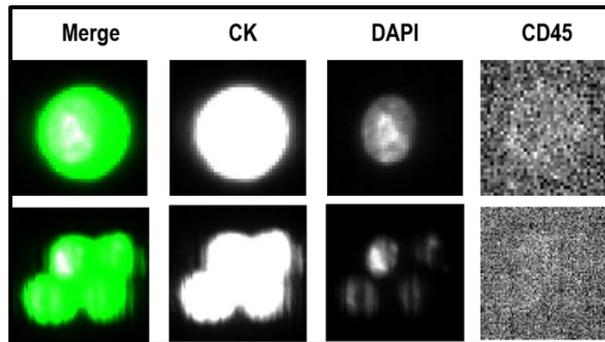


Abbildung 17: Anreicherung von Einzelzellen und Clustern der Zelllinie Sk-Br-3 mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf und Trop 2-Antikörper

Es wurden mittels CellTracker Green vorgefärbte Sk-Br-3-Zellen in Vollblut gegeben. Nach Separierung durch Dichtezentrifugation und Ficoll wurde die mononukleäre Zellfraktion mit dem biotinylierten Trop2-AK inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mittels Ferrofluiden im CellSearch prozessiert und im CellTracks Analyzer II mit standardisierter Vergrößerung und Belichtungszeit analysiert.

4.6.4. Vergleich EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger Anreicherung von Zelllinienzellen der Linie MDA-MB-231 im CellSearch

Zum direkten Vergleich der prozentualen Wiederfindungsrate von MDA-MB-231-Zellen wurden 500 dieser mit CellTracker Green vorgefärbt und entweder EpCAM-abhängig oder EpCAM-unabhängig mittels CellSearch angereichert und im Anschluss mittels CellTracks Analyzer II ausgezählt.

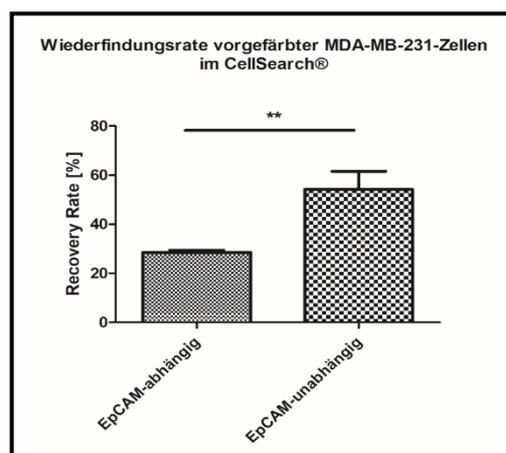


Abbildung 18: Wiederfindungsrate vorgefärbter Zellen der Linie MDA-MB-231 bei EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf im Vergleich zum EpCAM-abhängigem CellSearch-Lauf

Es wurden Zellen der Linie MDA-MB-231, die mit CellTracker Green vorgefärbt wurden, in je 5 ml Vollblut gegeben. Die Anreicherung erfolgte mittels CellSearch-System und Ferrofluiden nach Inkubation der durch Dichtezentrifugation und Ficoll separierten mononukleären Zellfraktion mit biotinylierten AK gegen Trop2 und CD49f. Die Analyse und Auszählung der wiedergefundenen Zellen wurde mit dem CellTracks Analyzer II durchgeführt. Statistik: t-Test, p-Wert 0,0018

In diesem Experiment ergab sich für die MDA-MB-231-Zellen eine mittlere Wiederfindungsrate von 54,18% mittels Trop2-/CD49f-abhängiger Anreicherung.

Vergleicht man die Zahlen der EpCAM-unabhängigen Anreicherung von MDA-MB-231-Zellen im CellSearch mit denen der EpCAM-abhängigen Anreicherung im gleichen Gerät, so ergibt sich eine Steigerung der mittleren Wiederfindungsrate um 25,668%. Die prozentuelle Anzahl der angereicherten an den hinzugegebenen Zellen der triple-negativen und eher mesenchymal gearteten Linie hat sich bei Anreicherung mit dem Trop2-/CD49f-AK-Gemisch also nahezu verdoppelt.

4.6.5. Zusätzliche Anreicherung von MDA-MB-231-Zellen mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf nach EpCAM-abhängigem CellSearch-Lauf

Da wie in 4.4 gezeigt mittels EpCAM-unabhängiger Anreicherung mit dem Trop2- und CD49f-AK-Gemisch eine zusätzliche Detektion von MDA-MB-231-Zellen nach der bereits erfolgten EpCAM-abhängigen Anreicherung möglich ist, stellte sich die Frage, ob aus der EDF einer Blutprobe, die bei einem Standard-CellSearch-Lauf gesammelt wird, in einem zusätzlichen EpCAM-unabhängigen CellSearch-Lauf weitere Tumorzellen gewonnen werden können.

Bei diesem Experiment wurden die aufgefangenen EDFs von mit MDA-MB-231-Zellen versetzten Blutproben erneut mittels CellSearch prozessiert, nachdem sie erneut nach Protokoll (3.2.2) aufbereitet und mit dem AK-Mix inkubiert wurden.

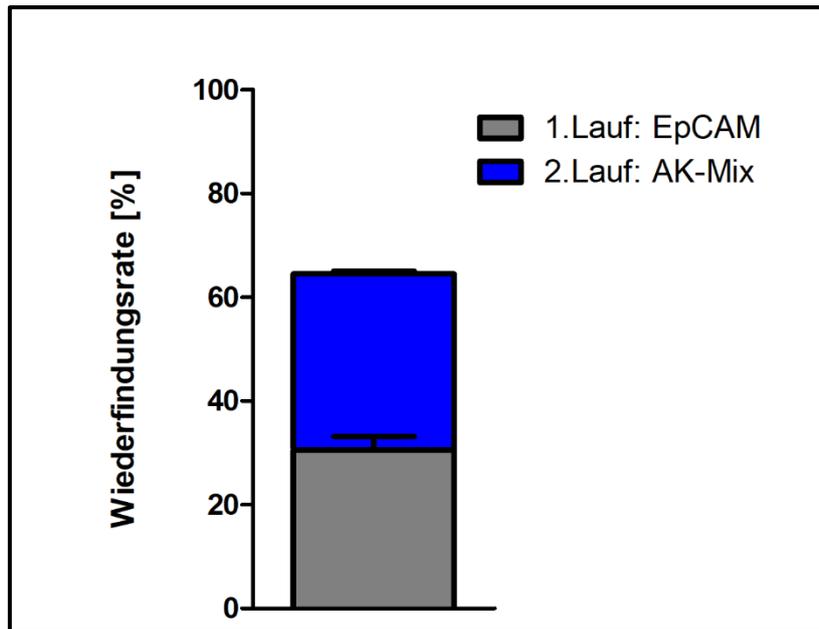


Abbildung 19: Prozessierung von mit MDA-MB-231 versetzten Blutproben mittels EpCAM-abhängigem und anschließendem EpCAM-unabhängigen CellSearch-Lauf

Es wurden je 500 mittels CellTracker Green vorgefärbte MDA-MB-231-Zellen in 7,5 ml Vollblut von gesunden Probanden gegeben. Die Proben wurden dann zunächst nach Herstellerprotokoll mittels CellSearch EpCAM-abhängig angereichert und dabei die EDFs gesammelt. Diese wurden dann nach Separierung der mononukleären Zellfraktion durch Dichtezentrifugation und Ficoll mit einem Trop2- und einem CD49f-AK inkubiert und mittels Ferrofluiden, die an die biotinylierten AK binden, erneut im CellSearch angereichert. Die angereicherten Zellen beider Läufe wurden im CellTracks Analyzer II ausgezählt.

Es konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu der mittleren Wiederfindungsrate von MDA-MB-231-Zellen von 30,55% im ersten, EpCAM-abhängigen CellSearch-Lauf durchschnittlich weitere 33,96% der initial hereingegebenen Zellen mittels Trop-2/-CD49f-abhängigem CellSearch-Lauf detektiert werden konnten. Insgesamt konnten nach beiden CellSearch-Läufen im Mittel 64,51% der zu Blutproben von gesunden Probandinnen zugegebenen MDA-MB-231-Zellen wiedergefunden werden.

4.7. CTC-Anreicherung aus Patientinnenproben

4.7.1. EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs aus Patientinnenproben mittels IsoFlux-Prozessierung

Nach der Etablierung der EMT-Färbung sowie der Optimierung der einzelnen Prozessierungsschritte inklusive der Reihenfolge der Zwischenschritte erfolgte zunächst die Anwendung des Anreicherungsverfahrens an Patientinnenproben mithilfe des IsoFlux-Systems. Es erfolgte die Prozessierung von 15 Patientinnenproben, jeweils EpCAM-abhängig im CellSearch-System sowie EpCAM-unabhängig mittels IsoFlux-System.

Tabelle 13: CTC-Anreicherung aus Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom: EpCAM-abhängige Anreicherung mittels CellSearch (Probevolumen 7,5 ml) vs. EpCAM-unabhängiger Anreicherung (Probevolumen 5 ml) mittels IsoFlux

*: zwei Proberöhrchen der jeweiligen Patientin wurden an verschiedenen Tagen prozessiert

Probe	EpCAM-abhängig angereicherte CTCs	EpCAM-unabhängig angereicherte CTCs
1	104	0
2	1	0
3	21	0
4	11	0
5	7	1
6.1*	Ca. 8500	31
6.2*	“	23
7	5	4
8	14	0
9	Ca.7500	Ca.500
10.1*	121	7 (Cluster)
10.2*	“	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	2

In sechs der 15 Proben (40%) konnten mit beiden Anreicherungsverfahren CTCs nachgewiesen werden. In weiteren 40% der analysierten Proben war nur mittels CellSearch-Prozessierung die Anreicherung von CTCs möglich. In einer der prozessierten Proben konnten nur EpCAM-unabhängig CTCs nachgewiesen werden.

In zwei Fällen wurden jeweils zwei Blutröhrchen einer Patientin prozessiert. Die jeweils zweite EpCAM-unabhängige Prozessierung erbrachte einen verminderten CTC-Nachweis, sodass eine frühzeitige Verarbeitung der Probe nach der Blutentnahme ein verbessertes Ergebnis zu erbringen scheint.

Die Probe 10.1 ergab den Nachweis eines Clusters, sodass auch ein Patientinnenproben gezeigt werden konnte, dass eine Clusteranreicherung mit der etablierten EpCAM-unabhängigen Anreicherung möglich ist.

Insgesamt zeigte sich bei der EpCAM-unabhängigen Anreicherung mittels IsoFlux im Vergleich zur standardisierten Anreicherung im FDA-zugelassenen CellSearch-System ein deutlich geringerer CTC-Nachweis, bei jedoch auch geringerer Probengröße (5 ml zu 7,5 ml). Dies ist unter anderem in der subjektiven Auswertung im CellCelector zu begründen, für die es keine eindeutig festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien von CTCs gibt. Da die Auswertung im CellTracks-AnalyzerII ebenso wie die Anreicherung im CellSearch standardisierter, automatisierter und vergleichbarer ist als im IsoFlux-System, erfolgte nach oben erläuteter Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung im CellSearch die Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung der weiteren Patientinnenproben im CellSearch-System.

4.7.1.1. Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger Anreicherung im CellSearch und EpCAM-unabhängiger CTC-Anreicherung im IsoFlux

Tabelle 14: Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger Anreicherung im CellSearch und EpCAM-unabhängiger Anreicherung im IsoFlux

*: zwei Proberöhrchen der jeweiligen Patientin wurden an verschiedenen Tagen prozessiert

Probe	Alter bei ED	Alter bei CTC-Anreicherung	Subtyp	Histologie	Grading	Mx
1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	54 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 n.a.	n.a.	n.a.	ossär, peritoneal, hepatisch, pulmonal
5	58 Jahre	61 Jahre	Luminal HER2 n.a.	Invasiv lobulär	3	n.a.
6*	65 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, vesical
7	38 Jahre	43 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	n.a.	n.a.
8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9	65 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, vesical
10	50 Jahre	53 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	2	ossär, lymphogen, hepatisch

11	66 Jahre	69 Jahre	Triple negativ	n.a.	3	hepatisch
12	54 Jahre	58 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv duktal	3	hepatisch, pulmonal
13	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
14	58 Jahre	65 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv duktal	2	pleural
15	37 Jahre	61 Jahre	Luminal HER 2-	Invasiv duktal	2	ossär, pulmonal

Legende: n.a. = nicht angegeben, Mx = Metastasierung

4.7.2. EpCAM- unabhängige Anreicherung von CTCs aus Patientinnenproben mittels modifiziertem CellSearch CTC Kit

Es wurden Blutproben von je 7,5 ml von 21 Patientinnen mit Mammakarzinom nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert.

Je 5 ml von Blutproben derselben Patientin wurden vergleichend Trop2-/CD49f-abhängig im CellSearch-System angereichert. Dafür wurde die Blutprobe zunächst durch Dichtezentrifugation und Ficoll separiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde dann mit biotinylierten Trop2- und CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mittels Streptavidin-Ferrofluiden in einem modifizierten CTC-Kit im CellSearch-System angereichert. Im Anschluss wurde die Probe im CellTracks Analyzer II analysiert.

Als CTCs wurden Zellen gewertet, die im CellSearch ein positives Signal für CK sowie DAPI zeigten und CD45 negativ waren.

Als Kontrolle wurden Blutproben von gesunden Probandinnen mit einem durchschnittlichen Alter, das der Hauptrisikogruppe für Brustkrebs entspricht, ebenfalls mittels EpCAM- unabhängigen CTC-Kit im CellSearch prozessiert. So konnte ausgeschlossen werden, dass Zellen des peripheren Blutes, die mittels des

AK-Gemisches angereichert wurden, als CTCs fehlinterpretiert werden. In keiner der Proben konnten Zellen gefunden werden, die den Kriterien von CTCs entsprechen.

Tabelle 15: Vergleich EpCAM-abhängiger (Probenvolumen 7,5 ml und –unabhängiger Anreicherung (Probenvolumen 5 ml) mittels CellSearch von CTCs aus Patientinnenproben

Probe	EpCAM-abhängig angereicherte CTCs	EpCAM-unabhängig angereicherte CTCs
1	23	8
2	3	0
3	110	7
4	0	5
5	Ca. 15.000	Ca. 6000
6	1	2
7	73	6
8	0	5
9	33	11
10	0	7
11	Ca.3800	170
12	3	9
13	592	236
14	0	3
15	0	3
16	27	5
17	1	0
18	2	8
19	239	200

Von den 19 untersuchten Patientinnenproben konnte in 16 Proben der Nachweis von CTCs mittels EpCAM-unabhängiger Anreicherung erbracht werden. In zwei Proben konnten nur EpCAM-abhängig CTCs nachgewiesen werden. In sieben der 19 Proben ergab sich eine vermehrte oder alleinige Anreicherung von CTCs mittels Trop2-/CD49f-abhängigem CellSearch-Lauf trotz kleinerer Probenmenge. Kombiniert man

beide Anreicherungsverfahren, so konnte in jeder der untersuchten Patientinnenproben mindestens eine CTC nachgewiesen werden.

Die klinischen Daten der Patientinnen von denen die Proben für diese Experimente genutzt wurden, finden sich unter 4.9.3.

4.8. Vergleich angereicherter CTCs hinsichtlich ihres Status der EMT anhand des E-Cadherin-/Vimentinverhältnisses

Um eine Einschätzung der CTCs hinsichtlich ihres Status der EMT vornehmen zu können, wurde die 3.2.4.1 erläuterte Färbung etabliert. Die Färbung der CTCs erfolgte nach vorheriger EpCAM-unabhängiger Anreicherung mit einem Trop2- und CD49f-AK-Gemisch im IsoFlux mittels immunomagnetischer Beads oder im CellSearch mittels Streptavidin-Ferrofluiden. Bei Prozessierung im CellSearch wurde das CellSearch Profile Kit verwendet, sodass keine Färbung während des Anreicherungslaufes durchgeführt wurde. Für dieses Experiment wurden Patientinnenproben mit zu erwartender hoher CTC-Positivität genutzt, um eine größere Anzahl von CTCs mit gegebenenfalls größerem Spektrum zu vergleichen. Wurden die CTCs auf Sievwel *Multiwell Slides* transferiert und gefärbt, standen diese zur Isolierung mittels CellCelector-Mikromanipulator zur Verfügung, nachdem sie durch die Färbung identifiziert wurden. Die angefertigten Aufnahmen der einzelnen CTCs wurden mittels ImageJ aufgearbeitet, um das Verhältnis der E-Cadherin- zu Vimentin-Fluoreszenz bestimmen zu können.

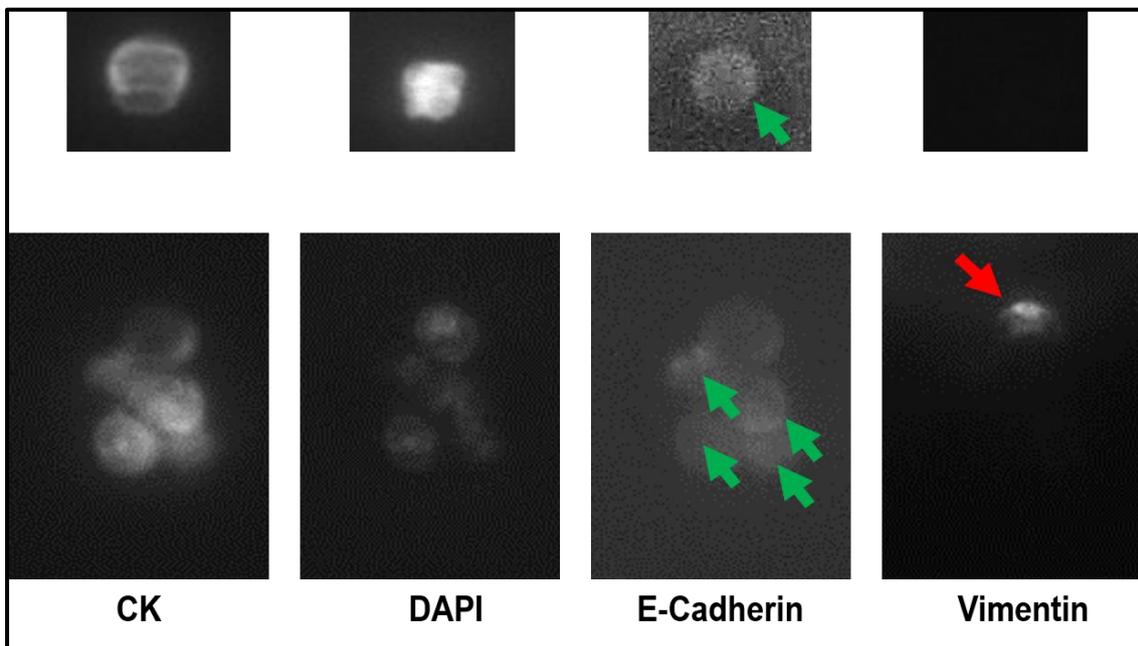


Abbildung 20: Beispiele epithelialer und mesenchymaler CTCs, Einzelzelle und Cluster
Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden zunächst durch Dichtezentrifugation und Ficoll separiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde dann mit biotinylierten Trop2- und CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen, die an die AK gebunden sind, entweder mittels immunomagnetischen *Beads* im IsoFlux-System oder mittels Ferrofluiden im CellSearch-System ohne Färbung mittels Profile-Kit angereichert. Die gewonnenen Zellen wurden gefärbt mit DAPI, CK-, E-Cadherin-(grüner Pfeil), Vimentin (roter Pfeil)- und CD45-AK. Die Analyse erfolgte mittels CellCelector in 40x-facher Vergrößerung und ImageJ.

In Abbildung 21 sind exemplarisch CTCs mit hoher E-Cadherin- (grüne Pfeile) oder hoher Vimentinexpression (rote Pfeile) abgebildet. Es konnte außerdem ein Zellcluster angereichert werden, das sowohl eher epitheliale, als auch eher mesenchymale Zellen enthält.

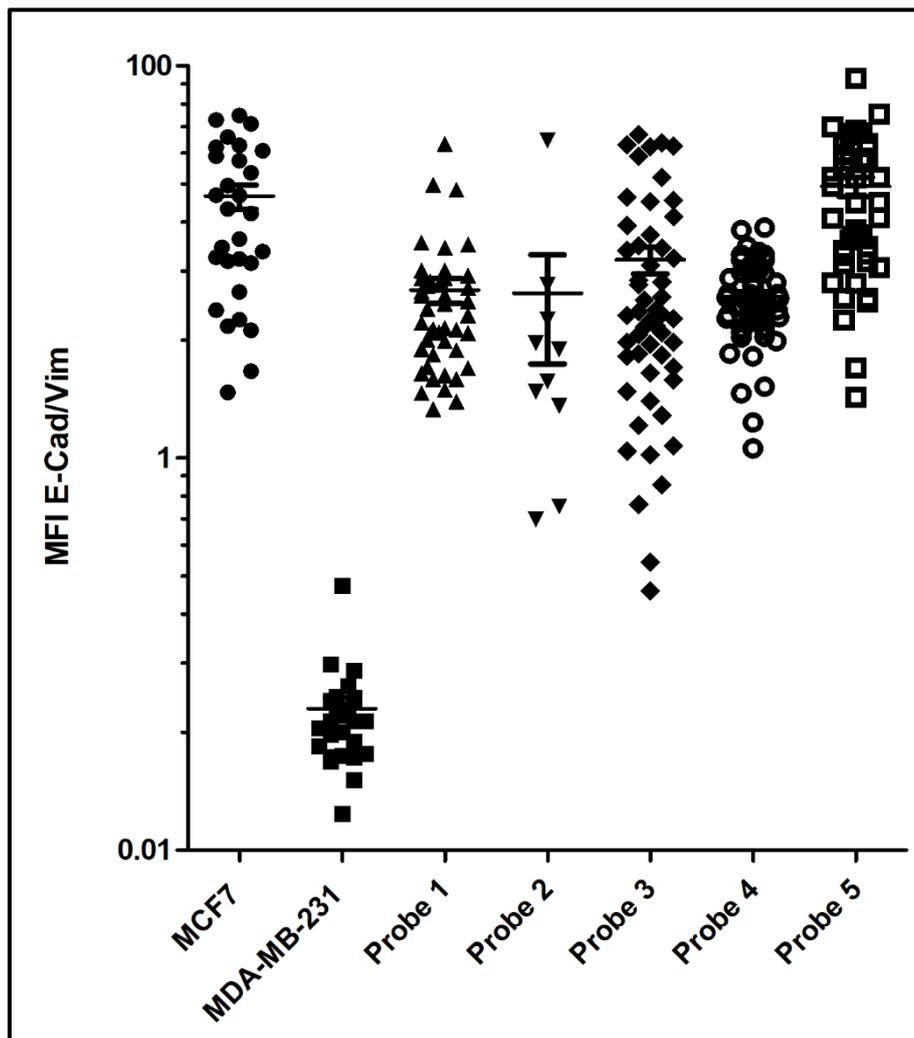


Abbildung 21: Verhältnis der mittleren Fluoreszenz-Intensität E-Cadherin/Vimentin verschiedener Patientinnenproben im Vergleich zu den Referenzzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden zunächst durch Dichtezentrifugation und Ficoll separiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde dann mit biotinylierten Trop2- und CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen, die an die AK gebunden sind, entweder mittels immunmagnetischen *Beads* im IsoFlux-System oder mittels Ferrofluiden im CellSearch-System ohne Färbung mit einem Profile-Kit angereichert. Die gewonnenen Zellen wurden gefärbt mit DAPI, CK-, E-Cadherin-, Vimentin- und CD45-AK. Zellen, die ein positives DAPI und Cytokeratin und keine CD45-Fluoreszenz aufwiesen, wurden als CTCs gewertet. Die Aufnahme der Bilder von den als CTC identifizierten Zellen erfolgte durch das CellCelector-System und die E-Cadherin- und Vimentin-Expression wurde mittels ImageJ gemessen.

Um eine Einordnung der entnommenen CTCs im Spektrum der eher epithelialen und eher mesenchymalen Tumorzellen vornehmen zu können, wurden Zellen der Linien MCF-7 sowie MDA-MB-231 als Referenz des E-Cadherin-/Vimentinexpressionsverhältnisses hinzugezogen.

In den fünf analysierten Patientinnenproben zeigte sich durchweg eine Varianz der CTCs hinsichtlich des E-Cadherin- zu Vimentinverhältnisses. Der Bereich erstreckt sich über Werte von 0,21 bis hin zu 86,5. Insgesamt scheint ein eher epithelialeres Spektrum abgebildet zu werden.

4.8.1. Klinische Daten der Patientinnen mit EMT-Vergleichsanalyse

Tabelle 16: Klinischen Daten der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit durchgeführter EMT-Vergleichsanalyse nach EpCAM-unabhängiger Anreicherung der CTCs

Probe	Alter	Alter bei bei ED CTC- Anreicherung	Subtyp	Histologie	Grading	Mx
1	65 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, vesikal
2	50 Jahre	53 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	2	ossär, lymphogen, hepatisch
3	65 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, vesical
4	65 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, vesical
5	66 Jahre	73 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	2	ossär

Legende: n.a. = nicht angegeben

4.8.2. DNA-Mutationsvergleich angereicherter CTCs mit unterschiedlichem EMT-Status

Um Mutationen in der DNA der Tumorzelle als potentielle Ursache der Variabilität des EMT Status zu beleuchten, wurden CTCs, die stärker zu einem Pol tendiert haben, nach der Extraktion aus der Probe isoliert.

Exemplarisch wurden zur vergleichenden DNA-Analyse isolierte CTCs der Probe 5 verwendet, da diese nach erfolgter WGA die beste DNA-Qualität aufwiesen. Das *Low Pass Sequencing* erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut in Regensburg.

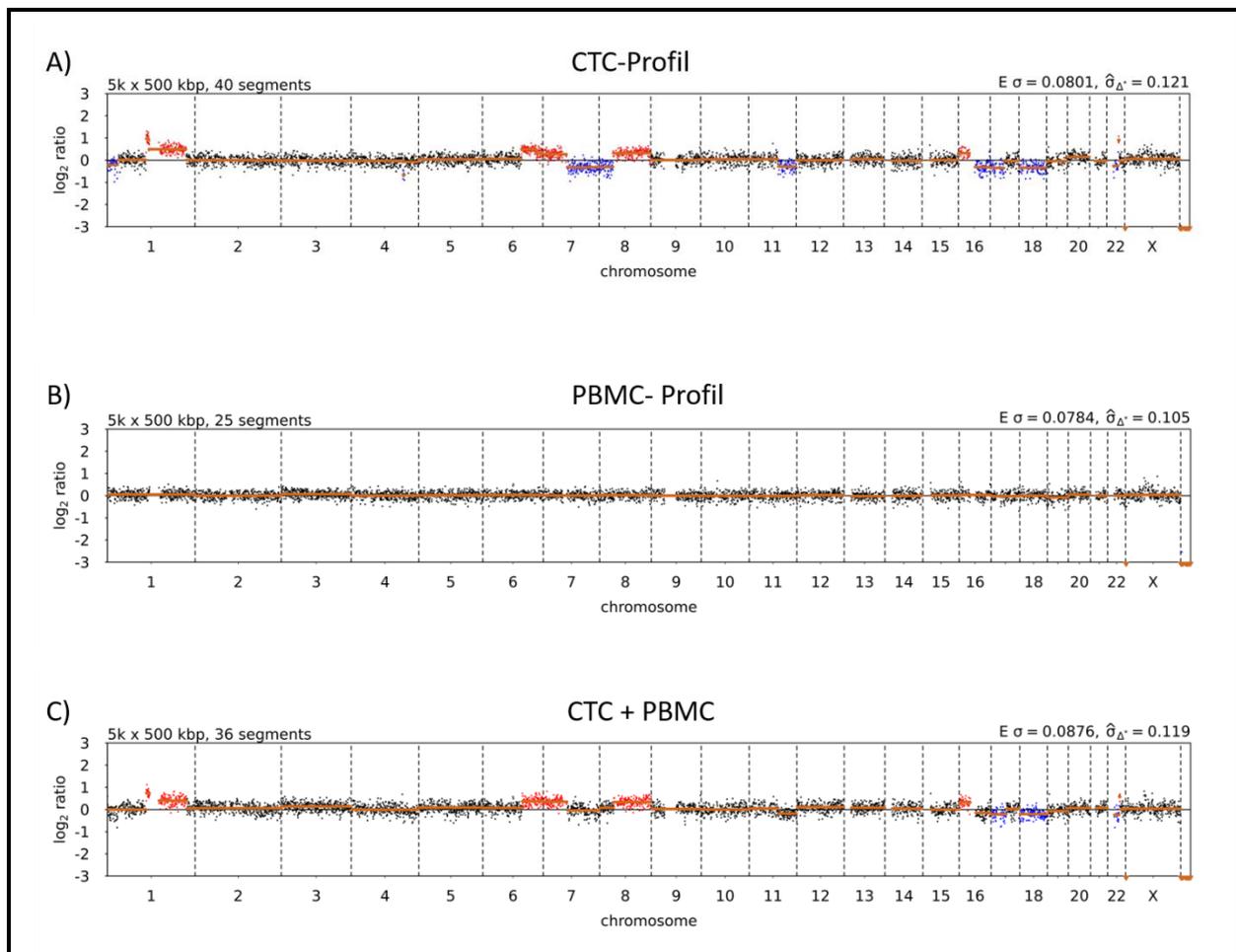


Abbildung 22: DNA-Sequenzierung isolierter CTCs nach EpCAM-unabhängiger Anreicherung
CTCs aus Patientenproben wurden EpCAM-unabhängig mittels Trop2- und CD49f- AK-Gemisch im IsoFlux oder CellSearch angereichert und mittels CellCelector isoliert. Anschließend erfolgte die DNA-Amplifikation zur nachfolgenden *Low-Pass-Sequenzierung* zur Detektion der Kopienzahlvarianten der einzelnen CTCs.

Legende: Schwarz = balanciertes Genom mit 2 Kopien, Rot = DNA-Amplifikation, Blau = DNA-Deletion

Abbildung 22 zeigt beispielhafte Profile der isolierten Zellen. Schwarz abgebildete DNA-Regionen stehen für ein balanciertes und damit unmutiertes Genom mit 2 Kopien. Rote Regionen bilden Amplifikationen und blaue Regionen Deletionen und somit Kopienzahlvarianten der entsprechenden DNA-Region ab.

Grafik A zeigt exemplarisch das DNA-Muster der CTCs, die aus Probe 5 extrahiert wurden. CTCs mit diesem Profil wiesen EMT-Expressionsraten (E-Cadherin/Vimentin) von 2,04 bis 40,19 auf.

Das Profil auf Grafik B zeigt, dass auch Zellen ohne DNA-Mutationen -und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit PBMCs- isoliert und sequenziert wurden.

Einige CTCs wurden vermutlich nicht als einzelne Zellen, sondern in Kombination mit PBMCs isoliert. Diese zeigten damit ein abgeschwächtes, aber im Sinne der veränderten Regionen mit Grafik A vergleichbares, Mutationsprofil wie in Grafik C abgebildet. Die hier abgebildeten CTCs wiesen Expressionsraten (E-Cadherin/Vimentin) von 7,77 bis 86,50 auf.

4.9. Vergleich EpCAM- abhängig und EpCAM-unabhängig mittels CellSearch angereicherter CTCs

4.9.1. Morphologischer Vergleich EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig mittels CellSearch angereicherter CTCs

Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden sowohl EpCAM-abhängig nach Herstellerprotokoll als auch EpCAM-unabhängig mittels Trop2-und CD49f-AK-Gemisch (3.2.5) prozessiert.

Die mittels AK-Gemisch angereicherten CTCs schienen im Vergleich zu den EpCAM-abhängig angereicherten CTCs im Allgemeinen kleiner und weniger rund zu sein. Außerdem wirkte die durchschnittliche CK-Intensität geringer.

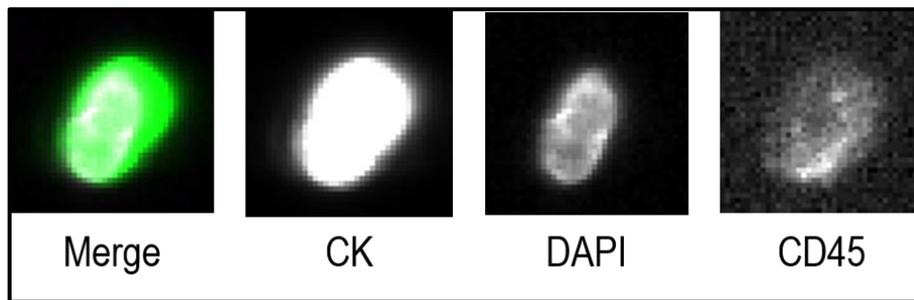


Abbildung 23: Beispiel einer CTC, die mittels EpCAM-Antikörper angereichert wurde
 Die Bilder zeigen beispielhaft eine CTC aus einer Blutprobe einer Patientin mit Mammakarzinom, die im CellSearch-System nach Herstellerprotokoll mittels EpCAM-AK angereichert und nach Standardeinstellungen mittels CellTracks Analyzer II analysiert wurde.

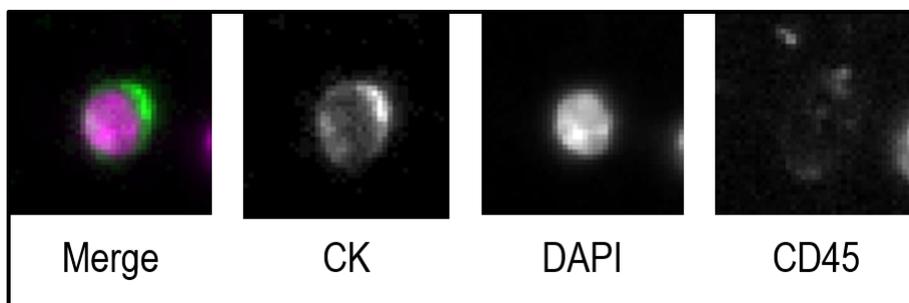


Abbildung 24: Beispiel einer CTC, die mittels Trop2-/CD49f-Antikörper-Gemisch angereichert wurde

Die Bilder zeigen beispielhaft eine CTC, die EpCAM-unabhängig im CellSearch-System angereichert und mittels CellTracks Analyzer analysiert wurde. Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden zunächst durch Dichtezentrifugation und Ficoll separiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde dann mit biotinylierten Trop2- und CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen, die an die AK gebunden sind, mittels Ferrofluiden im CellSearch-System angereichert und nach Standardeinstellungen im CellTracks Analyzer II analysiert.

Um diesen Eindruck quantifizieren zu können, wurden die Patientinnenproben, bei denen sowohl im EpCAM-abhängigen als auch im EpCAM-unabhängigen CellSearch-Lauf CTCs gefunden werden konnten, mittels Image J hinsichtlich Größe, Zirkularität und durchschnittlicher Intensität der CK-Fluoreszenz verglichen. Hinsichtlich der Gesamtsignifikanz wurden die jeweiligen Mittelwerte der drei Vergleichsfelder über alle Proben hinweg von den EpCAM-abhängig und -unabhängig angereicherten Proben mittels gepaartem t-Test verglichen. Um auszuschließen, dass eventuelle signifikante Unterschiede der Heterogenität der Proben des AK-Gemisches geschuldet sind und somit allein extreme Ausreißer zur Verschiebung der Mittelwerte beitragen, wurde zusätzlich ebenfalls die Gesamtsignifikanz der Mediane in Bezug auf die Einzelgrößen mit gepaarten t-Tests berechnet.

4.9.1.1. Größe der angereicherten CTCs - EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

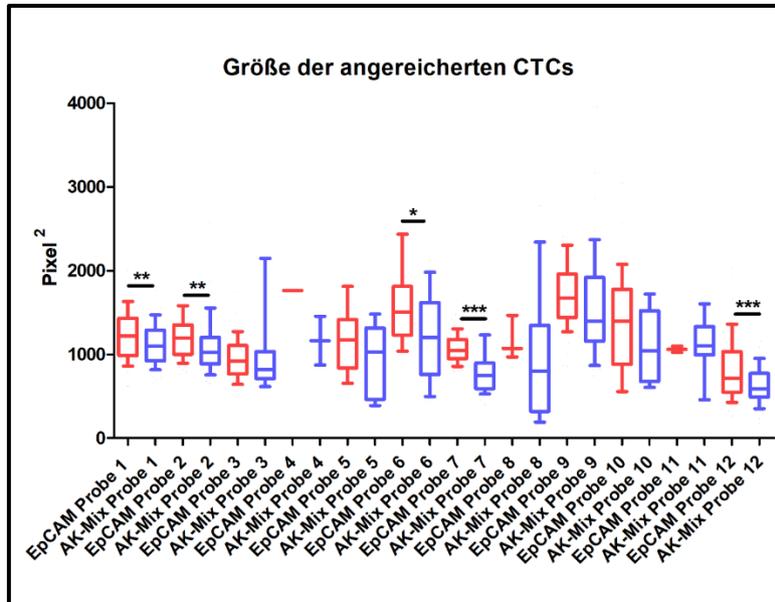


Abbildung 25: Vergleich der Größe der angereicherten CTCs, EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patientin wurden vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2/CD49f-AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die Größe der CTCs beider Proben wurde mittels ImageJ gemessen und verglichen.

Statistik: ungepaarter t-Test

- EpCAM Probe 1 vs. AK Mix Probe 1: p-Wert 0,0099
- EpCAM Probe 2 vs. AK Mix Probe 2: p-Wert 0,0042
- EpCAM Probe 3 vs. AK Mix Probe 3: p-Wert 0,7814
- EpCAM Probe 4 vs. AK Mix Probe 4: zu geringe Datenmenge zur t-Test-Analyse
- EpCAM Probe 5 vs. AK Mix Probe 5: p-Wert 0,2178
- EpCAM Probe 6 vs. AK Mix Probe 6: p-Wert 0,0317
- EpCAM Probe 7 vs. AK Mix Probe 7: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 8 vs. AK Mix Probe 8: p-Wert 0,6235
- EpCAM Probe 9 vs. AK Mix Probe 9: p-Wert 0,1167
- EpCAM Probe 10 vs. AK Mix Probe 10: p-Wert 0,3166
- EpCAM Probe 11 vs. AK Mix Probe 11: p-Wert 0,8690
- EpCAM Probe 12 vs. AK Mix Probe 12: p-Wert 0,0006

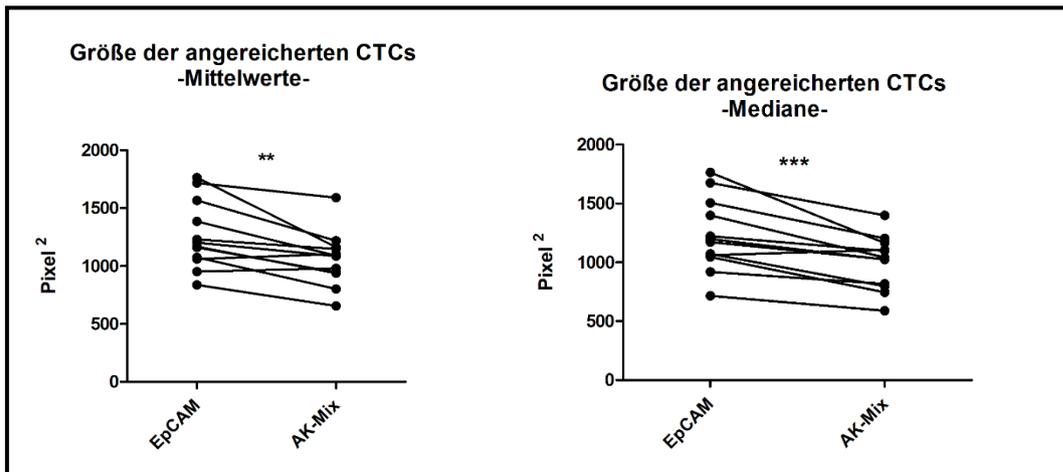


Abbildung 26: Vergleich Gesamtsignifikanzen Größe EpCAM-anhängig und EpCAM-unabhängig angereicherte CTCs, links: Mittelwerte, rechts: Median

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patientin wurden vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die Größe der CTCs beider Proben wurde mittels ImageJ gemessen. Zum einen wurden die Mittelwerte der Größe in den jeweiligen Proben verglichen, zum anderen die Mediane.

Statistik: ungepaarter T-Test: p-Wert Mittelwerte 0,0022, p-Wert Mediane 0,0005

Bezüglich der Größe zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen innerhalb der Einzelproben angereichert mit EpCAM im Vergleich zur mittels AK-Mix angereicherten Probe. Auch in der Betrachtung der gesamten Proben zeigte sich im gepaarten t-Test, dass die Mittelwerte der Größe der CTCs, die EpCAM-unabhängig angereichert wurden signifikant kleiner waren. Der p-Wert betrug hier 0,0022. Auch beim Vergleich der Mediane zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Größe mit einem p-Wert von 0,0005. Außerdem erstrecken sich die 10.-90. Perzentile bei den Trop2-/CD49f-basiert angereicherten Proben über einen breiteren Bereich, sodass von einem heterogeneren Bild der Zellen auszugehen ist.

4.9.1.2. Zirkularität der angereicherten CTCs - EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

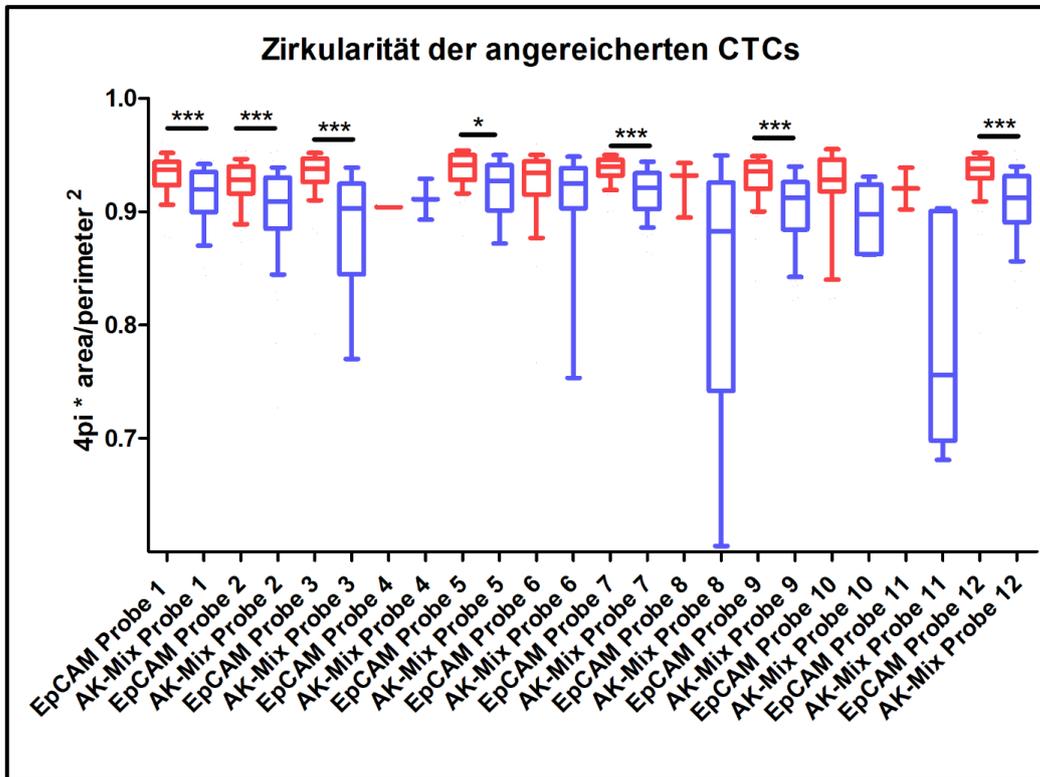


Abbildung 27: Vergleich der Zirkularität der angereicherten CTCs, EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patientin wurden vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2/CD49f-AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die Zirkularität der CTCs beider Proben wurde mittels ImageJ gemessen und verglichen.

Statistik: ungepaarter t-Test

- EpCAM Probe 1 vs. AK Mix Probe 1: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 2 vs. AK Mix Probe 2: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 3 vs. AK Mix Probe 3: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 4 vs. AK Mix Probe 4: zu geringe Datenmenge zur t-Test-Analyse
- EpCAM Probe 5 vs. AK Mix Probe 5: p-Wert 0,0187
- EpCAM Probe 6 vs. AK Mix Probe 6: p-Wert 0,2448
- EpCAM Probe 7 vs. AK Mix Probe 7: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 8 vs. AK Mix Probe 8: p-Wert 0,2133
- EpCAM Probe 9 vs. AK Mix Probe 9: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 10 vs. AK Mix Probe 10: p-Wert 0,1162
- EpCAM Probe 11 vs. AK Mix Probe 11: p-Wert 0,1039
- EpCAM Probe 12 vs. AK Mix Probe 12: p-Wert <0,0001

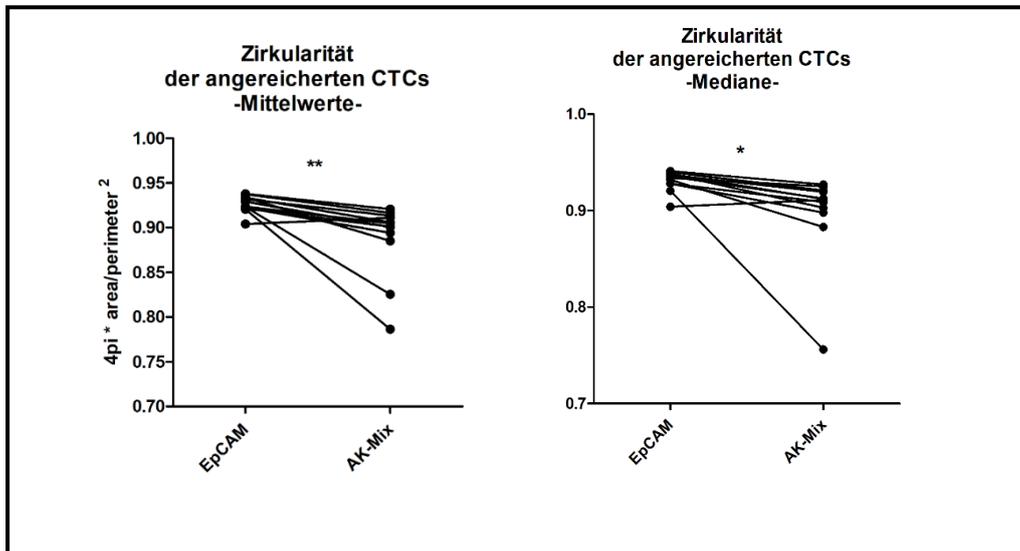


Abbildung 28: Vergleich Gesamtsignifikanzen Zirkularität EpCAM-anhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherte CTCs, links: Mittelwerte, rechts: Median

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patientin wurden vergleichend EpCAM-unabhängig mittels AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die Zirkularität der CTCs beider Proben wurde mittels ImageJ gemessen. Zum einen wurden die Mittelwerte der Zirkularität in den jeweiligen Proben verglichen, zum anderen die Mediane.

Statistik: ungepaarter T-Test: p-Wert Mittelwerte 0,0068, p-Wert Mediane 0,0228

Es zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zirkularität zwischen den CTCs, je nach Art der Anreicherung. Auch hier gab es Differenzen sowohl innerhalb der einzelnen Proben, als auch über alle Proben hinweg. So zeigte sich, dass die EpCAM-unabhängig detektierten Zellen insgesamt eine geringere Zirkularität aufwiesen. Der p-Wert betrug hier 0,0068.

Beim Vergleich der Mediane zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zirkularität zwischen den EpCAM-abhängig und -unabhängig angereicherten Zellen mit einem p-Wert von 0,0228. Außerdem deckten auch hier die Ergebnisse der Zellen, die mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch angereichert wurden, einen breiteren Bereich in Bezug auf die 10.-90.- Perzentile ab.

4.9.1.3. Durchschnittliche CK-Intensität der angereicherten CTCs EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

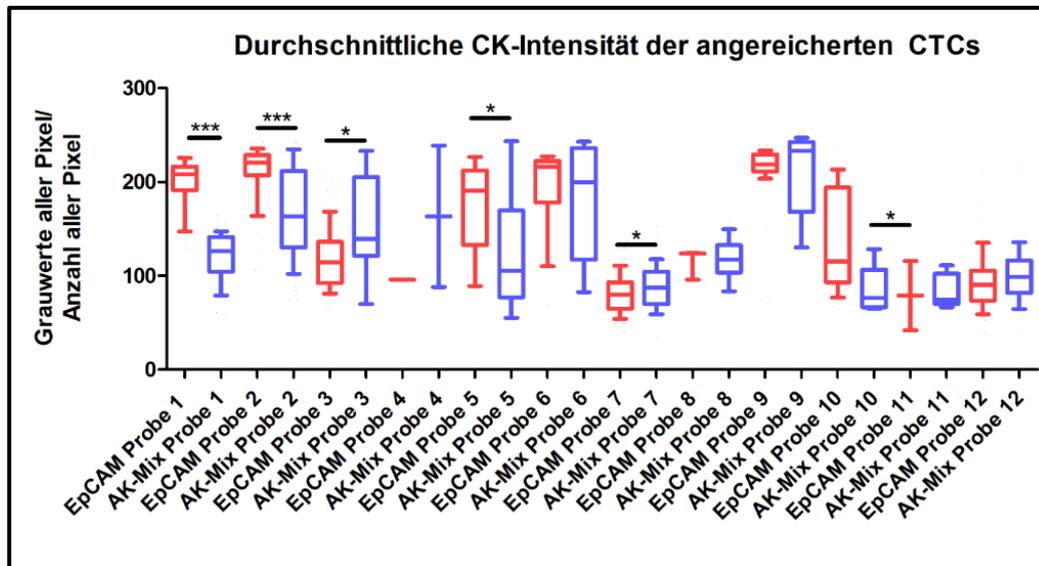


Abbildung 29: Vergleich der durchschnittlichen CK-Intensität der angereicherten CTCs, EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patientin wurden vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die durchschnittliche CK-Intensität der CTCs beider Proben wurde mittels ImageJ gemessen und verglichen.

Statistik: ungepaarter t-Test

- EpCAM Probe 1 vs. AK Mix Probe 1: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 2 vs. AK Mix Probe 2: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 3 vs. AK Mix Probe 3: p-Wert 0,0210
- EpCAM Probe 4 vs. AK Mix Probe 4: zu geringe Datenmenge zur t-Test-Analyse
- EpCAM Probe 5 vs. AK Mix Probe 5: p-Wert 0,0293
- EpCAM Probe 6 vs. AK Mix Probe 6: p-Wert 0,4357
- EpCAM Probe 7 vs. AK Mix Probe 7: p-Wert 0,0290
- EpCAM Probe 8 vs. AK Mix Probe 8: p-Wert 0,7817
- EpCAM Probe 9 vs. AK Mix Probe 9: p-Wert 0,4198
- EpCAM Probe 10 vs. AK Mix Probe 10: p-Wert 0,0476
- EpCAM Probe 11 vs. AK Mix Probe 11: p-Wert 0,8030
- EpCAM Probe 12 vs. AK Mix Probe 12: p-Wert 0,1083

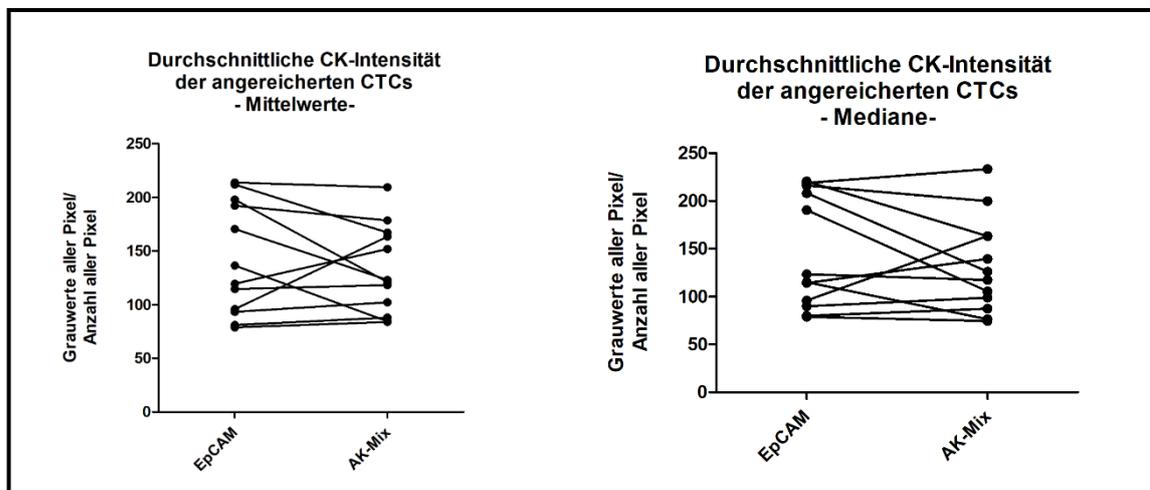


Abbildung 30: Vergleich Gesamtsignifikanzen durchschnittliche CK-Intensität EpCAM-anhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherte CTCs, links: Mittelwerte, rechts: Median

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patienten wurden vergleichend EpCAM-unabhängig im CellSearch-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die durchschnittliche CK-Intensität der CTCs beider Proben wurde mittels ImageJ gemessen. Zum einen wurden die Mittelwerte der durchschnittlichen CK-Intensität in den jeweiligen Proben verglichen, zum anderen die Mediane.

Statistik: ungepaarter T-Test: p-Wert Mittelwerte 0,4272, p-Wert Mediane 0,3100

In Bezug auf die durchschnittliche CK-Intensität der angereicherten CTCs zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen, die EpCAM-abhängig und den Zellen, die Trop2-/CD49f-abhängig mit dem CellSearch-System angereichert wurden, weder zwischen den einzelnen Proben noch in der Gesamtschau der Proben. Beim Vergleich der Mittelwerte zwischen den EpCAM-abhängig und –unabhängig angereicherten Zellen ergab sich ein p-Wert von 0,4272, beim Vergleich der Mediane von 0,3100.

4.9.1.4. Korrelation der Diskrepanzen in Größe und Zirkularität – EpCAM-abhängig vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung

Die EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig angereicherten CTCs scheinen sich also vor allem in ihrer Größe und Zirkularität voneinander zu unterscheiden. Abbildung 33 zeigt die Verteilung der einzelnen Zellen bei der Korrelation beider Vergleichsgrößen.

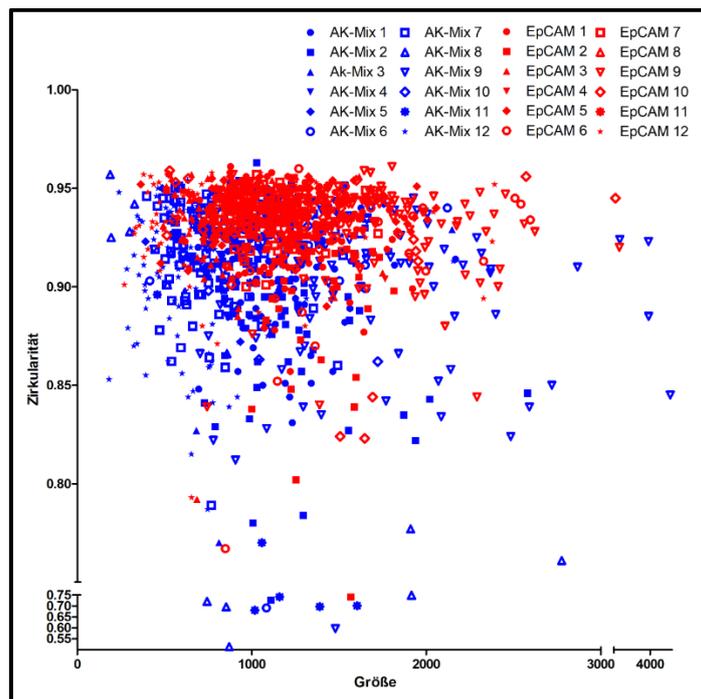


Abbildung 31: Korrelation der Vergleichsgrößen Zirkularität und Größe bei EpCAM-abhängiger und Trop2-/CD49f-abhängiger Anreicherung

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Proben derselben Patientin wurden vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch im CellSearc-System angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die Größe und Zirkularität der CTCs aller Proben wurde mittels ImageJ gemessen und gegeneinander aufgetragen.

Die in Rot dargestellten Zellen der nach Herstellerprotokoll angereicherten Proben liegen schwerpunktmäßig im Zirkularitätsbereich von über $0,9 \cdot 4\pi \times \text{Fläche}/\text{Umfang}^2$ und bei einer Größe zwischen 1000 und 2000 Pixel². Die Trop2-/CD49f-abhängig angereicherten Zellen hingegen streuen über einen deutlich breiteren Bereich und scheinen somit heterogener zu sein. Sie erreichen auch Zirkularitäts- und Größenwerte im niedrigeren Bereich.

Um eine prozessierungsbedingte Veränderung der Morphologie bei EpCAM-unabhängiger Anreicherung auszuschließen, wurden Zellen der Linie MDA-MB-231 hinsichtlich ihrer Größe und Zirkularität nach EpCAM-abhängigem und Trop2-/CD49f-abhängigen CellSearch-Lauf verglichen.

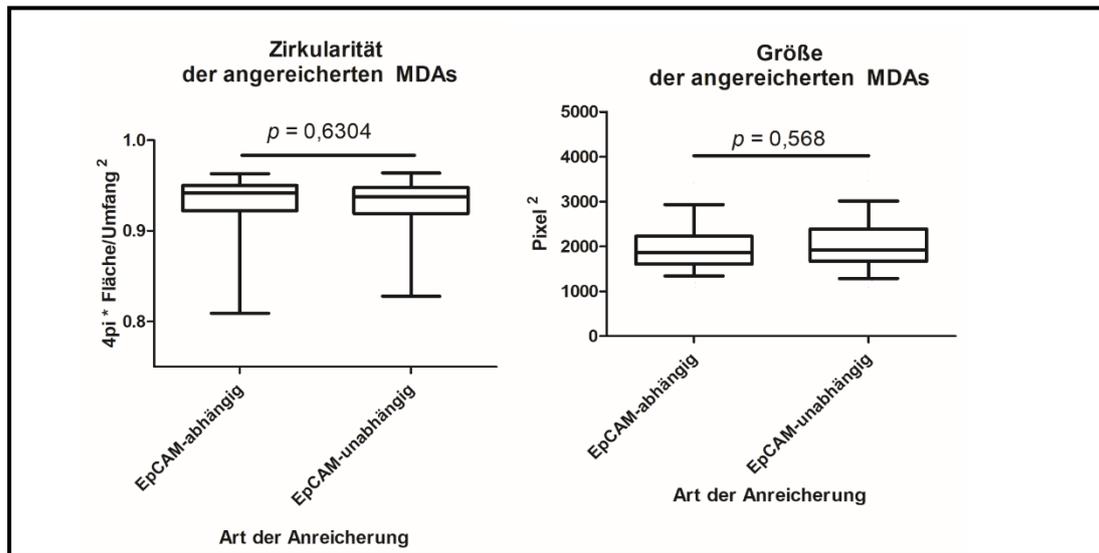


Abbildung 32: Vergleich EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherte MDA-MB-231-Zellen hinsichtlich Größe und Zirkularität

Blutproben von gesunden Probandinnen wurden mit MDA-MB-231-Zellen versetzt und nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Zusätzlich wurden die mit Zelllinienzellen versetzten Proben vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Die Größe und Zirkularität der MDA-MB-231-Zellen wurde mittels ImageJ gemessen und gegeneinander aufgetragen. Statistik: ungepaarter t-Test

Bei der Auswertung mittels ImageJ konnten keine signifikanten Unterschiede der Zellmorphologie der MDA-MB-231-Zellen festgestellt werden. Sowohl die Diskrepanzen in der Größe, als auch in der Zirkularität, sind somit nicht durch Einflüsse auf die Zellenform durch die andere Anreicherungsmethode zu begründen, sondern durch tatsächliche Unterschiede in der angereicherten CTC-Population.

4.9.2. DNA-Mutationsvergleich EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängiger CTCs

CTCs aus einzelnen Patientinnenproben (4.8.2) mit besonders guter DNA-Qualität wurden nach der Einzelzellisolierung mittels CellCelector sowie erfolgter WGA wurden durch *Low Pass Sequencing* analysiert. Es wurden sowohl EpCAM-

abhängig als auch Trop2-/CD49f-abhängig mit dem CellSearch angereicherte CTCs derselben Patientinnen sequenziert.

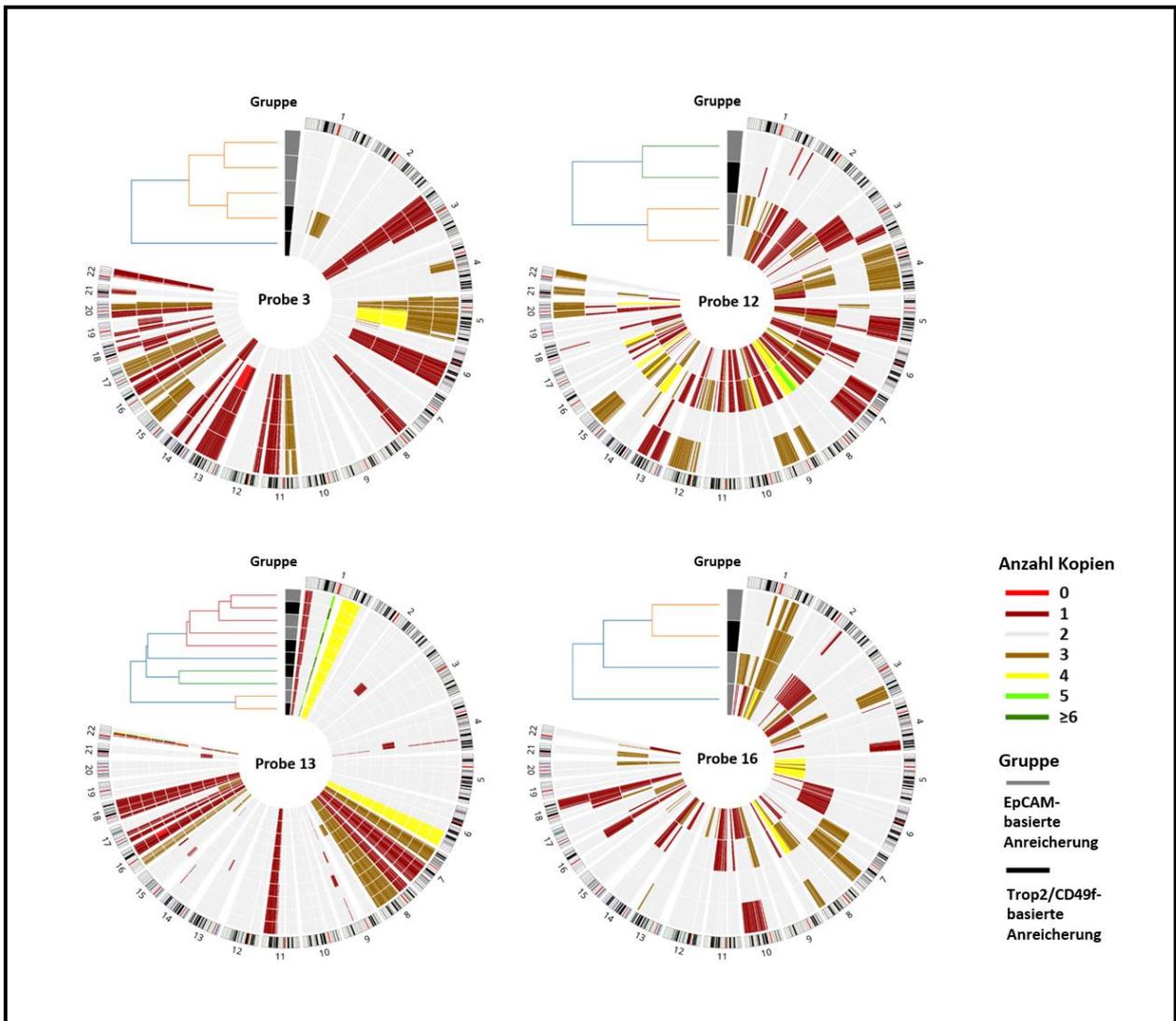


Abbildung 33: Vergleichende DNA-Analyse EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig angereicherter CTCs

CTCs derselben Mammakarzinompatientin wurden EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig im CellSearch angereichert und nach erfolgter WGA mittels Low-Pass-Sequenzierung analysiert.

Wie in der Legende erläutert, bildet die farbliche Markierung bestimmter Areale bezogen auf ein bestimmtes Chromosom die numerische Veränderung des regionalen Genoms ab. Jede Zeile des Kreises zeigt das Genom einer einzelnen CTC. In der Abbildung als grauer Balken dargestellte CTCs wurden mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch angereichert, als schwarz dargestellte CTCs mittels EpCAM-abhängigem CellSearch-Lauf.

Für jede Patientin wurde ein phylogenetischer Stammbaum der analysierten CTCs erarbeitet, der die klonale Zusammengehörigkeit der CTCs überprüfen soll. In nahezu allen Proben konnte kein anderer ursprünglicher Klon für die EpCAM-abhängig als für die EpCAM-unabhängig angereicherte Population definiert werden. Die CTCs scheinen unabhängig von der Anreicherungsmethode ähnlicher Abstammung zu sein. Bei Probe 3 hingegen könnte die unterste CTC als Vertreter der Trop2-/CD49f-angereicherten Population einen anderen Subklon darstellen, der durch die EpCAM-abhängige Zellfraktion nicht abgebildet wird.

4.9.3. Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger CTC-Anreicherung im CellSearch

Tabelle 17 zeigt die klinischen Daten der Patientinnen, bei denen EpCAM-abhängig sowie EpCAM-unabhängig CTCs mittels CellSearch angereichert wurden (4.8.2).

Tabelle 18 gibt das Tumorstadium bei Erstdiagnose derselben Patientinnen sowie den Krankheitsprogress im Sinne einer (späteren) Metastasierung an.

Tabelle 17: Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger und -unabhängiger Anreicherung CTC-Anreicherung

Probe	Alter bei ED	Alter bei CTC-Anreicherung	Subtyp	Histologie	Grading
1	58 Jahre	60 Jahre	Luminal HER2 -	NST	G2
2	44 Jahre	71 Jahre	ER-, PR-, Her2 n.a.	Invasiv muzinös	n.a.
3	43 Jahre	52 Jahre	Luminal HER2 -	NST	G3
4	60 Jahre	60 Jahre	Luminal HER2 +	Sonstige	G2
5	65 Jahre	78 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	G2
6	61 Jahre	61 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	n.a.

7	50 Jahre	53 Jahre	Luminal HER2 -	NST	G2
8	59 Jahre	61 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	G2
9	58 Jahre	61 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	G3
10	64 Jahre	64 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	n.a.
11	57 Jahre	68 Jahre	Triple negativ	n.a.	G3
12	56 Jahre	58 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	n.a.
13	66 Jahre	72 Jahre	Luminal HER2 -	NST	G2
14	41 Jahre	71 Jahre	Luminal B HER2 +	n.a.	n.a.
15	36 Jahre	37 Jahre	Triple negativ	n.a.	G2
16	72 Jahre	73 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	G2
17	64 Jahre	64 Jahre	Luminal HER2 +	n.a.	G2
18	53 Jahre	55 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	G2
19	51 Jahre	54 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	G2

Legende: n.a. = nicht angegeben, NST = invasives Karzinom ohne speziellen Typ

Tabelle 18: Tumorprogression der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger und EpCAM-unabhängiger Anreicherung

Probe	T bei ED	N bei ED	M bei ED	Metastasierung (im Verlauf)
1	T2	N0	M0	ossär

2	T1	N0	M0	lymphogen
3	T2	N0	M0	ossär
4	T2	N3b	M1	n.a.
5	T2	N0	M0	ossär, hepatisch, vesikal
6	cT2	cN+	M1	ossär, peritoneal, uterin
7	T2	N2	M0	lymphogen, ossär, hepatisch
8	T3	N2a	M1	lymphogen, ossär, pulmonal
9	pT2	pN0 (0/6)	M1	ossär, hepatisch
10	cT4c	cN+	M1	lymphogen, ossär
11	pT2	pN0	M0	pulmonal, hepatisch
12	n.a.	N+	n.a.	ossär
13	pT2	pN2a (4/5)	M0	ossär
14	T1b	N0	M0	n.a.
15	cT2 ypT2 (2,5 cm)	cN0 ypN0 (0/2)	M0	lymphogen, V.a.pulmonal
16	cT4d	cN0	M1	hepatisch, ossär
17	pT2	pN0 (0/5)	M1	ossär
18	cT3 ypT2	ypN3a (11/15)	M0	ossär, hepatisch
19	cT4d	cN0	M1	ossär, lymphogen

Legende: n.a. = nicht angegeben, c= klinisches Stadium, p= pathologisches Stadium, y= neoadjuvante Vorbehandlung
T= Tumorstadium nach TNM-Klassifikation, N= Nodalstadium nach TNM-Klassifikation, M= Metastasierung nach TNM-Stadium

4.10. Analyse des PFS sowie OS bezogen auf die nachgewiesene CTC-Anzahl

Die klinischen Verlaufsdaten der Patientinnen, bei denen EpCAM-abhängig und – unabhängig CTCs angereichert wurden, wurden auf Kaplan-Meier-Kurven aufgetragen. Ziel war es, zu eruieren, ob der Nachweis von einer oder fünf CTCs mit dem jeweiligen Anreicherungsverfahren mit dem PFS oder des OS assoziiert ist.

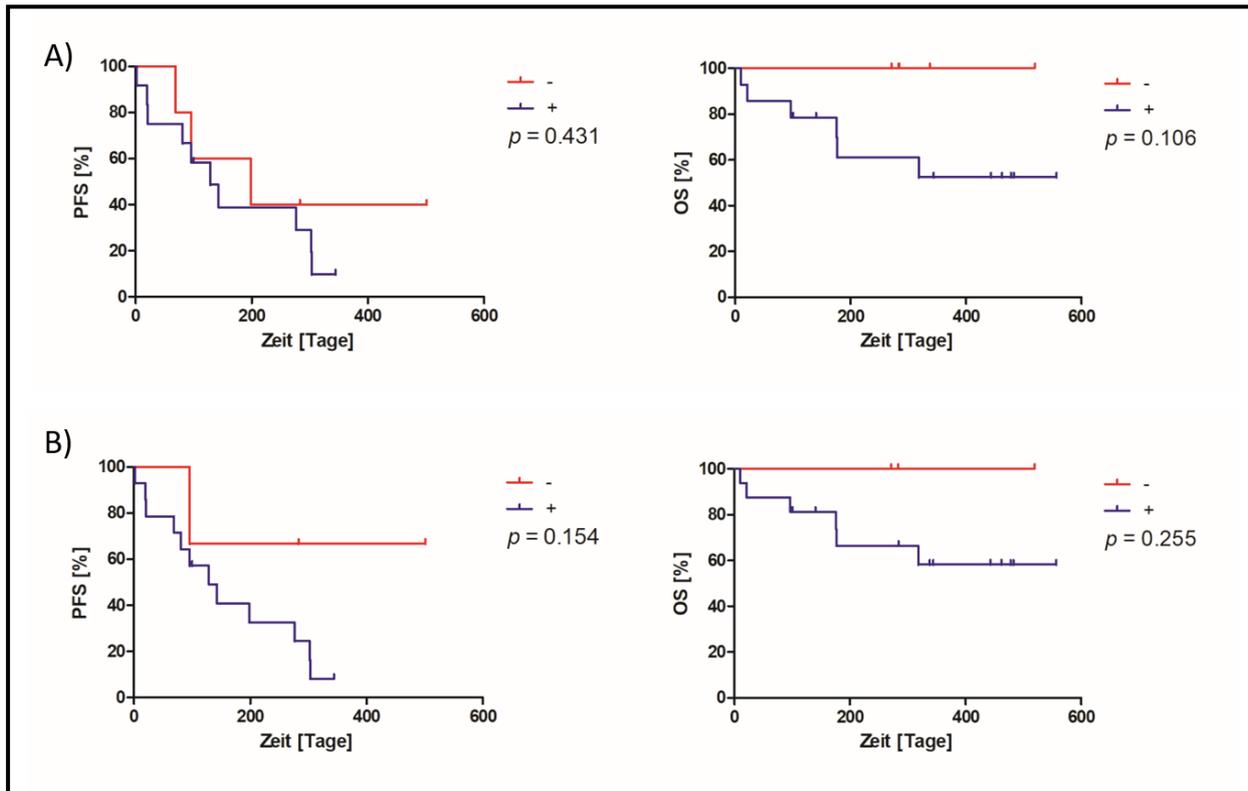


Abbildung 34: PFS und OS von Mammakarzinompatientinnen abhängig von der CTC-Positivität

A) EpCAM-abhängige Anreicherung im CellSearch

B) Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung im CellSearch

Rote Kurven: kein CTC-Nachweis

Blaue Kurven: CTC-Nachweis erfolgreich, *Cutoff* = 1 CTC

Statistik: ungepaarter t-Test

Zunächst wurde ein *Cutoff* von einer CTC gewählt. Sowohl für das PFS, als auch für das OS konnte keine signifikante Verminderung durch einen positiven CTC-Nachweis mittels des EpCAM-abhängigen CellSearch-Verfahrens festgestellt werden. Auch der Nachweis von mittels Trop2-/ und CD49f-AK-Gemisch angereicherten CTCs führte zu keiner signifikanten Verschlechterung des PFS und des OS. Zur weiteren Analyse wurde das *Cutoff* auf 5 nachgewiesene CTCs erhöht.

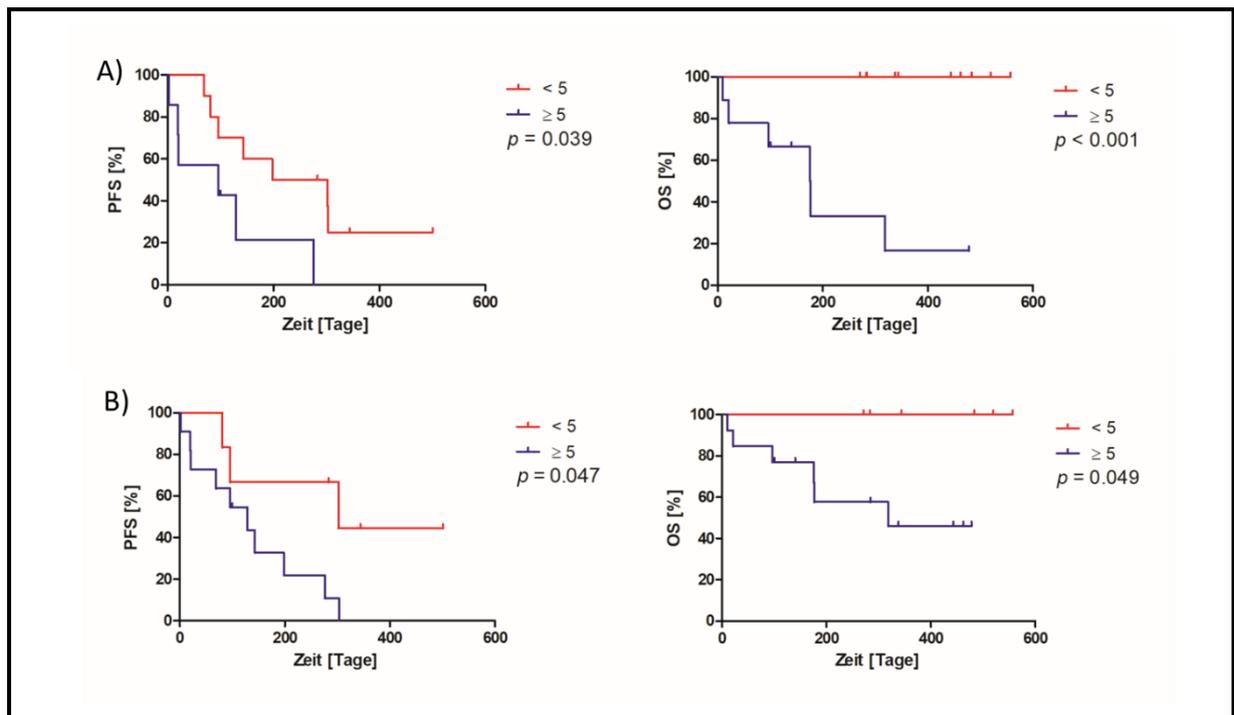


Abbildung 35: PFS und OS von Mammakarzinompatientinnen abhängig von einer CTC-Anzahl >5

A) EpCAM-abhängige Anreicherung im CellSearch

B) Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung im CellSearch

Rote Kurven: CTC-Anzahl <5

Blaue Kurven: CTC-Anzahl >5

Statistik: ungepaarter T-Test

Erhöht man den *Cutoff* auf 5 nachgewiesene CTCs so zeigt sich bei der EpCAM-abhängigen Anreicherungsform eine signifikante Verminderung des PFS ($p = 0,039$) sowie des OS ($p < 0,001$).

Bei der *Cutoff*-Erhöhung ergibt sich auch bei der Anreicherung mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch eine Senkung des PFS ($p = 0,047$) sowie des OS ($p = 0,049$) in den statistisch signifikanten Bereich.

4.11. CTC-Anreicherung aus EDFs

Auch in Proben, bei denen im Standard-CellSearch-Lauf keine CTCs nachgewiesen werden konnten, war eine Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung von CTCs möglich. Deshalb stellte sich die Frage, ob CTCs, die nicht durch den EpCAM-AK im CellSearch detektiert werden, im Anschluss EpCAM-unabhängig aus der gesammelten EDF gefiltert werden können.

Um dies zu testen, wurden 13 Blutproben à 7,5 ml von Patientinnen mit Mammakarzinom nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert und die EDFs währenddessen gesammelt. Diese wurden dann zunächst durch Dichtezentrifugation und Ficoll separiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde dann mit biotinylierten Trop2- und CD49f-AK inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben entweder mittels Ferrofluiden und einem modifizierten CTC-Kit im CellSearch-System erneut angereichert und gefärbt oder über die Inkubation mittels immunomagnetischen *Beads* der Anreicherung im IsoFlux-System zugänglich gemacht. Im Anschluss wurden die Proben auf Objektträgern oder - bei Prozessierung im CellSearch -direkt im CellTracks Autoprep System. Die Analyse erfolgte dementsprechend entweder im CellCelector oder im CellTracks Analyzer II. DAPI und CK positive Zellen mit fehlendem CD45-Signal wurden als CTCs gewertet.

Tabelle 19: EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs aus EDFs

Probe	Anzahl CTCs EpCAM-abhängige Anreicherung	Anzahl CTCs aus der EDF
1	460	1*
2	Ca. 8500	0*
3	5	3*
4	0	3*
5	0	0*
6	121	0*
7	0	0*
8	23	0*
9	2	1*
10	0	5

11	0	2
12	2	14
13	9620	Ca. 2150

*** Prozessierung mittels IsoFlux statt CellSearch**

In sieben der 13 Blutproben konnten CTCs in der EDF nachgewiesen werden.

Insgesamt konnten bei der Anreicherung mittels des IsoFlux-Systems deutlich weniger eindeutig als CTCs zu identifizierende Zellen in den EDFs gefunden werden, da die Einschätzung mittels Oberflächenmarkerexpression im CellSelector subjektiv ist und keinen klaren Richtlinien unterliegt.

Aus diesem Grund wurde die Methode bei den EDFs ebenso wie bei den zuvor unverarbeiteten Patientinnenproben auf das automatisierte CellSearch-System umgestellt, das standardisiert und anhand fester Vorgaben die automatische Selektion von CTCs innerhalb der angereicherten Zellen im CellTracks Analyzer II durchführt.

4.11.1. Morphologie angereicherter CTCs aus EDFs

Da gezeigt werden konnte, dass aus EDFs weitere Zellen mittels eines EpCAM-unabhängigen Anreicherungsverfahrens gewonnen werden können, stellte sich die Frage, ob sich die zusätzlich angereicherten CTCs, die nach Prozessierung im Standard-CellSearch mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch gefunden werden konnten, morphologisch von den durch den EpCAM-AK gebundenen Zellen unterscheiden.

Als Kontrolle, ob die Morphologie der aus der EDF angereicherten Tumorzellen mit der der nur einfach EpCAM-abhängig angereicherten Tumorzellen verglichen werden kann, wurden MDA-Zellen nach standardisierter Anreicherung mit einem CellSearch-Lauf und nach einem zweiten Lauf hinsichtlich ihrer Größe und Zirkularität.

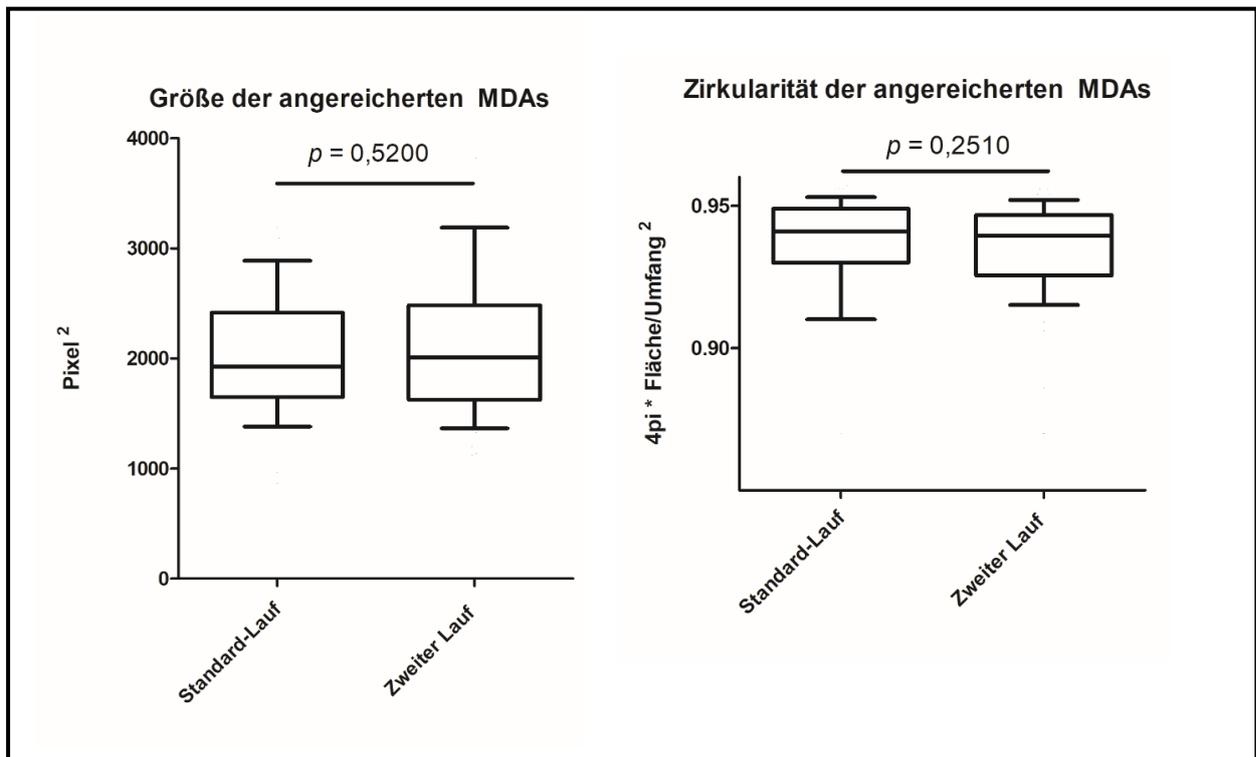


Abbildung 36: Kontrolle Größe, und Zirkularität von MDA-MB-231-Zellen nach 1. und 2. CellSearch-Lauf
 Zellen der Linie MDA-MB-231 wurden in 7,5 ml gesundes Spenderblut gegeben. Die Probe wurde zunächst nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System prozessiert und dabei die EDF gesammelt. Diese wurde dann durch Dichtezentrifugation und Ficoll separiert, um im Anschluss lediglich die mononukleäre Zellfraktion mit einem Gemisch aus einem Trop2- und einem CD49f-AK inkubieren zu können. Diese mit AK versetzte Probe wurde dann erneut EpCAM-unabhängig mit einem modifizierten CTC-Kit und Ferrofluiden im CellSearch angereichert. Die Größe und Zirkularität wurde dann vergleichend nach dem ersten und dem zweiten CellSearch-Lauf mit ImageJ gemessen. Statistik: ungepaarter t-Test

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Größe und Zirkularität zwischen Zellen der Linie MDA-MB-231, die nur einen CellSearch-Lauf durchlaufen haben und MDAs, die einen zweiten Durchlauf nach Auffangen als depletierte Fraktion des ersten Laufes durchlaufen haben. Somit kann die Morphologie der CTCs, die mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf aus der EDF angereichert wurden, mit der Morphologie der originalen Patientinnenprobe, die EpCAM-abhängig angereichert wurde, verglichen werden.

Bei zwei Patientinnenproben konnten sowohl im EpCAM-abhängigen CellSearch-Lauf als auch bei der Prozessierung der EDF mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch Zellen gefunden werden. Diese wurden bezüglich ihrer Größe, Zirkularität und durchschnittlichen CK-Intensität verglichen.

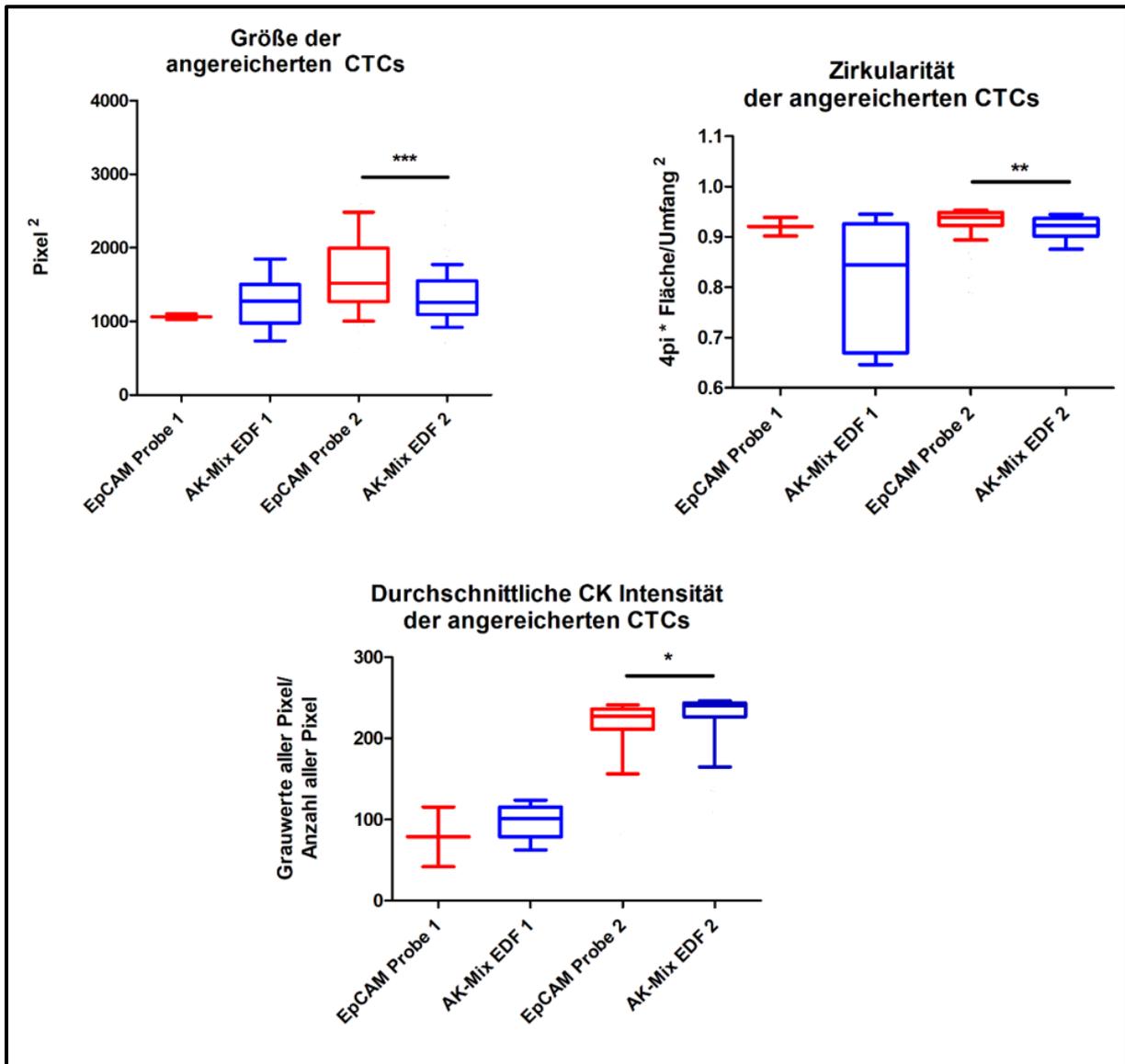


Abbildung 37: Vergleich von CTCs, die mittels CellSearch und CTCs, die EpCAM-unabhängig aus der entstandenen EDF angereichert wurden

Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert und die EDFs wurden gesammelt. Diese wurden dann mit biotinylierten Trop2- und CD49f-AK und einem modifizierten CTC-Kit mit Ferrofluiden EpCAM-unabhängig im CellSearch-System erneut angereichert. Zellen, die den Kriterien, die für den CellTracks Analyzer II entwickelt wurden, entsprachen, wurden als CTCs gewertet. Die Größe, Zirkularität und durchschnittliche CK-Intensität der CTCs aller Proben wurde mittels ImageJ gemessen und hinsichtlich signifikanter Unterschiede verglichen.

Statistik: ungepaarte t-Tests:

- EpCAM Probe 1 vs. AK-Mix EDF 1 Größenvergleich: p-Wert 0,4732
- EpCAM Probe 1 vs. AK-Mix EDF 1 Größenvergleich: p-Wert <0,0001
- EpCAM Probe 1 vs. AK-Mix EDF 1 Zirkularitätsvergleich: p-Wert 0,2216
- EpCAM Probe 1 vs. AK-Mix EDF 1 Zirkularitätsvergleich: p-Wert 0,0056
- EpCAM Probe 1 vs. AK-Mix EDF 1 CK-Intensitätsvergleich: p-Wert 0,3351
- EpCAM Probe 1 vs. AK-Mix EDF 1 CK-Intensitätsvergleich: p-Wert 0,0445

Sowie bei den EpCAM-unabhängig angereicherten CTCs aus Patientinnenproben (4.9.1) zeigten sich auch hier Diskrepanzen zwischen den unterschiedlich angereicherten Populationen. Die zusätzlich nachgewiesenen CTCs aus den EDFs waren in Probe 2 signifikant kleiner und weniger zirkulär. Es zeigte sich außerdem eine gering signifikante Erhöhung der durchschnittlichen CK-Intensität. Probe 1 zeigte keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der Morphologie der CTCs, dies kann aber durch die geringe Zellanzahl (2 CTCs EpCAM-abhängig, 14 CTCs EpCAM-unabhängig) begründet sein.

Die Population der mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch aus der EDF angereicherten CTCs weist in Bezug auf die Zirkularität und Größe eine breitere Streuung und damit größere Heterogenität als die EpCAM-abhängig angereicherte Population auf.

4.11.2. Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-unabhängiger CTC-Anreicherung aus der EDF

Tabelle 20: Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-unabhängiger CTC-Anreicherung aus EpCAM-depletierten Fraktionen

Pro- be	Alter bei ED	Alter bei CTC- Anreicheru ng	Subtyp	Histologie	Grading	Mx
1	66 Jahre	72 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	2	ossär
2	65 Jahre	77 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, vesical
3	38 Jahre	43 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	n.a.	n.a.
4	62 Jahre	75 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv duktal	3	lymphogen
5	66 Jahre	68 Jahre	Luminal	n.a.	3	hepatisch

			HER2 -			
6	43 Jahre	52 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv duktal	3	ossär
7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
8	53 Jahre	62 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch, Magen
9	44 Jahre	71 Jahre	Luminal HER2 n.a.	n.a.	n.a.	ossär, lymphogen, hepatisch
10	n.a.	n.a.	Triple negativ	n.a.	n.a.	n.a.
11	36 Jahre	38 Jahre	n.a.	n.a.	2	lymphogen, pulmonal
12	54 Jahre	56 Jahre	Luminal HER2 -	Invasiv lobulär	2	ossär, hepatisch
13	66 Jahre	73 Jahre	Luminal HER2 -	n.a.	2	ossär

Legende: n.a. = nicht angegeben

5. Diskussion

5.1. Vorbemerkung

Ziel dieser Arbeit war es, CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom EpCAM-abhängig sowie -unabhängig anzureichern, um diese in Bezug auf ihre Morphologie und auf DNA-Ebene zu vergleichen. Dafür sollte die Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung optimiert und zur besseren Vergleichbarkeit sowie Automatisierung auf das CellSearch-System übertragen werden. Zudem sollte die Methode auf die Anreicherung von CTCs aus EDFs übertragen werden.

Die Anreicherung von CTCs aus Patientinnenblutproben im Sinne einer *Liquid Biopsy* und damit einer minimal-invasiven und dynamischen Echtzeitdiagnostik mit Wiederholbarkeit ist in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. [18, 83]

Zum einen hat die CTC-Anzahl, die mittels des aktuellen Goldstandards – dem EpCAM-abhängigen CellSearch-System - aus einer 7,5 ml Blutprobe nachgewiesen werden kann, prognostischen Wert für das PFS sowie OS der Patientin [20, 21]. Zum anderen kann die Anzahl an detektierten CTCs Hinweise auf die richtige Therapiestrategie geben [29].

Außerdem können weitergehende Analysen der CTCs zum Beispiel hinsichtlich vorhandener Mutationen ebenfalls therapiebeeinflussend sein. Eine in isolierten CTCs nachgewiesene ESR1-Mutation kann zum Beispiel Hinweise auf eine Resistenz gegen eine Aromataseinhibitor-basierte endokrine Therapie beim hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom geben. [84]

5.2. Gewährleistung hoher *Recovery*-Zahlen bei guter DNA-Qualität durch Optimierung des Färbevorgangs

Um DNA-Schäden durch die DNase (zur Ablösung der *Beads*) nach erfolgter Zellpermeabilisierung mittels Saponin (zur Färbung) zu minimieren, wurde die *Bead*-Ablösung zeitlich vor die Färbung der Zellen gesetzt. Es sollten dennoch Zellverluste durch die Waschschrte des durch die fehlenden *Beads* instabilen Zellpellets vermieden werden. Es erfolgte die Umstellung auf die Färbung auf Sievewell *Multiwell Slides* mit resultierenden Anstiegen der Wiederfindungsraten auf nahezu

doppelt so hohe Werte im Vergleich zur Färbung in Suspension. Auch in anderen Publikationen konnte die Überlegenheit der Sievewell *Multiwell Slides* hinsichtlich des geringen Zellverlustes im Färbeprozess gezeigt werden mit Wiederfindungsraten von 93,73% [85].

5.3. Umstellung der Trop2-/CD49f-abhängigen Anreicherung vom IsoFlux-auf das CellSearch-System

Wie unter 5.2 aufgeführt konnte bei der Trop2-/CD49f-abhängigen Anreicherung mittels des IsoFlux-Systems eine geringere zusätzliche Zellanzahl detektiert werden als mittels des CellSearch-Systems (IsoFlux: 20,96%; CellSearch: 33,96%). Diese Diskrepanz zeigte sich trotz der bei dem CellSearch-Lauf bereits durchgeführten Färbung, die bei den IsoFlux-Experimenten noch angeschlossen werden müsste – beziehungsweise bei den Zelllinienzellen durch Vorfärbung entfiel- und durch die folgenden Waschschrte vermutlich einen weiteren Zellverlust verursacht hätte.

Auch bei der Prozessierung der Patientinnenproben zeigte sich eine deutliche Steigerung der prozentuellen Probenanzahl mit erfolgreichem CTC-Nachweis. Vergleicht man den Anteil der Patientinnenproben, bei denen eine Anreicherung von CTCs mittels des AK-Gemisches möglich war, so lag diese beim IsoFlux bei 46,67% und beim EpCAM-unabhängigen CellSearch bei 89,47%.

Neben der Steigerung der Wiederfindungsrate ermöglicht die Anreicherung im CellSearch-System außerdem eine bessere Vergleichbarkeit mit dem aktuellen Goldstandard und eine automatisiertere und standardisiertere Analyse der Proben mit genauen Kriterien zur CTC-Selektion innerhalb der angereicherten Zellen sowie automatisierter Mikroskopie. Zudem müssen die deutlich kleineren Ferrofluide im Unterschied zu den größeren immunomagnetischen Beads nicht vor der mikroskopischen Analyse entfernt werden, sodass auch hier der Zellverlust minimiert werden kann. Aus diesem Grund wurden die CTCs, die zum morphologischen Vergleich wie auch zur vergleichenden DNA-Analyse verwendet wurden, alle im CellSearch-System angereichert.

5.4. Zusätzliche Anreicherung von CTCs in Patientinnenproben mittels Trop2- und CD49f-AK-Gemisch

Wie unter 4.8.2 aufgezeigt, konnten in einigen Patientinnenproben CTCs mittels des EpCAM-unabhängigen Gemisches aus Trop2- und CD49f-AK nachgewiesen werden, ohne dass im Standard-CellSearch-Verfahren eine CTC-Anreicherung gelang.

Eine Erweiterung der Anreicherungsverfahren von CTCs, um auch andere Subpopulationen wie die EpCAM-negative CTC-Fraktion einzuschließen, kann also die Anzahl von Blutproben mit positivem CTC-Nachweis erhöhen und somit Analysen wie unter anderem die der DNA-Mutationen ermöglichen, die mit rein EpCAM-abhängigen Verfahren nicht möglich gewesen wären.

Außerdem konnten erfolgreich auch Tumorzell-Cluster sowohl von Zelllinienzellen als auch von Patientinnenproben mittels des Trop2-/CD49f-AK-Gemisches angereichert werden (s. 4.7.2 und 4.9).

5.5. Analyse angereicherter CTCs unterschiedlicher EMT-Stadien gemessen an ihrem E-Cadherin-/Vimentinfluoreszenzquotienten

Durch eine nach der Trop2-/CD49f-abhängigen Anreicherung erfolgte Färbung für E-Cadherin sowie Vimentin, mit anschließender Analyse mittels ImageJ, sollte eine Vergleichbarkeit der CTCs im Hinblick auf ihren EMT-Status erreicht werden.

Es zeigte sich ein heterogenes Bild des Fluoreszenzverhältnisses von E-Cadherin zu Vimentin innerhalb der angereicherten CTCs. Dennoch war die Gesamtheit der CTCs eher in Richtung der epithelialen Referenz von MCF-7 Zellen orientiert als in Richtung der mesenchymalen Referenz von MDA-MB-231-Zellen.

Da CTCs mit einer hohen mesenchymalen Markerdichte eher eine niedrige Expression für CK aufweisen [43], könnten diese eventuell trotz erfolgter Anreicherung nicht identifiziert und damit analysiert worden sein.

Auffällig war das unter 4.9 demonstrierte Cluster, das hauptsächlich aus eher epithelialen Zellen bestand, aber eine randständige mesenchymale CTC mit hoher Vimentinexpression enthielt. Dieses könnte auf die Hypothese zurückzuführen sein,

dass mesenchymale Tumorzellen epitheliale Zellen rekrutieren, die Zellmotilität begünstigen und so den Ursprung einer Metastasierung darstellen [43, 86, 87].

Ursächlich für die EMT könnten unter anderem Veränderungen auf der Genomebene sein [88]. Aus diesem Grund führten wir vergleichende Sequenzierungen von angereicherten CTCs mit besonders hohem und besonders niedrigem E-Cadherin-/Vimentinfluoreszenzquotienten durch. Erfolgreiche Sequenzierungen konnten bei CTCs mit Expressionsquotienten von 2,04 bis 40,19 durchgeführt werden. Diese zeigten ein identisches DNA-Mutationsprofil, sodass die Hauptursache für die phänotypischen Unterschiede durch die EMT nicht auf Genomebene begründet zu liegen scheinen. Weitere CTCs mit Expressionsquotienten von 7,77 bis 86,50 konnten sequenziert werden, zeigten jedoch vermutlich Verunreinigungen durch Normalzell-DNA. Soweit beurteilbar wiesen aber auch diese CTCs ein ähnliches DNA-Mutationsprofil auf.

Sollte die EMT sowie ihre phänotypischen Auswirkungen also nicht in der genomischen Ebene begründet sein, so kommen Veränderungen auf epigenetischer Ebene wie DNA-Methylierungen [89-91] oder auch extrazelluläre Prozesse [92] als Ursache in Frage.

5.6. Morphologischer Vergleich EpCAM-abhängig und –unabhängig angereicherter CTCs

Bei der morphologischen Vergleichsanalyse zeigte sich im Hinblick auf die Größe sowie die Zirkularität ein signifikanter Unterschied zwischen der EpCAM-abhängig und der Trop2-/CD49f-abhängig angereicherten Zellfraktion. Die EpCAM-unabhängig angereicherte Zellpopulation wies eine geringere Größe sowie eine weniger zirkuläre Form auf. Dies könnten Hinweise darauf sein, dass mittels des Trop2-/CD49f-AK-Gemisches auch CTCs des mesenchymalen Spektrums angereichert werden können.

Außerdem erstreckt sich die 10.-90. Perzentile über einen breiteren Bereich, sodass von einem heterogener abgebildeten Zellspektrum durch die entwickelte Prozessierungsmethode auszugehen ist.

Da CTCs, die zum mesenchymalen Pol tendieren, eher kleiner, weniger rund und außerdem verformbarer sind [43], könnten sie möglicherweise größenbasierten Anreicherungsverfahren [93] entgehen, während sie mit der Trop2-/CD49f-basierten Methode im CellSearch angereichert werden können.

Auch die durchschnittliche CK-Intensität der CTCs wurde verglichen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der EpCAM-abhängigen und – unabhängigen Anreicherung. Dies könnte allerdings auch darin begründet sein, dass nur CTCs, die eine bestimmte CK-Fluoreszenzgrenze überschreiten, überhaupt vom CellTracks Analyzer II als CTC identifiziert werden.

5.7. Vergleichende Sequenzierung EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherter CTCs

Um Unterschiede auf DNA-Ebene zwischen EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherten CTCs aufzudecken, wurden nach der Einzelzellisolierung sowie WGA das *Low Pass Sequencing* durchgeführt.

Bereits Lampignano *et al.* [94] konnten Unterschiede im DNA-Mutationsprofil zwischen EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig isolierten CTCs aus EDFs derselben Patientin nachweisen.

Bei unseren vergleichenden Sequenzierungen konnten zwar genomische Unterschiede zwischen einzelnen CTCs dargestellt werden, diese korrelierten aber nicht mit der Anreicherungs-methode.

Betrachtet man die phylogenetischen Stammbäume so scheinen unterschiedliche Klone zu existieren, bei denen die Zuordnung von einzelnen CTCs zu diesen Ursprungszellen nicht mit der EpCAM-Expression assoziiert ist, sodass die Klone durch beide Anreicherungsformen abgebildet werden.

Eine Ausnahme bildet Probe 3: Hier findet sich eine mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisches angereicherte CTC, die eine geringere phylogenetische Verwandtschaft mit den anderen CTCs aufzuweisen und somit einem eigenen Klon aus einer möglichen anderen Subpopulation zu entsprechen scheint. Dieser Klon wird nicht durch die EpCAM-basierte Anreicherung repräsentiert.

Eine EpCAM-unabhängige Anreicherung und anschließende Analyse von CTCs kann also zusätzliche CTC-Subklone darstellen, die gegebenenfalls Aussagen über die therapeutischen Möglichkeiten der Patientin enthalten, die bei einer rein EpCAM-basierten Prozessierung nicht detektiert worden wären.

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig angereicherte CTCs derselben Patientinnen hinsichtlich ihrer prädiktiven Mutationen mittels gezieltem *Next-Generation-Sequencing* verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit beiden Anreicherungsformen die gleichen Mutationen abgebildet werden konnten, sodass die Trop2-/CD49f-abhängige Prozessierung dieselben Informationen liefern kann wie das Standard-Verfahren einer EpCAM-basierten Anreicherung mit dem CellSearch und gerade in Proben, in den EpCAM-abhängig keine CTCs angereichert werden können, eine klinische Relevanz besitzt. [70]

5.8. Anreicherung von CTCs aus EDFs

Durch Anreicherungsversuche von Zelllinienzellen aus EDFs konnte ein Zugewinn durch die Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung aufgezeigt werden.

Mittels EpCAM-unabhängiger Anreicherung im IsoFlux konnten zusätzliche 20,96% der zugegebenen MDA-MB-231-Zellen nach vorheriger Extraktion von 28,91% durch einen CellSearch-Lauf nach Herstellerprotokoll nachgewiesen werden. In vergleichbaren Experimenten bei denen die EDFs rein durch größenabhängige Filtrationsprozesse erneut prozessiert wurden, ergaben sich deutlich niedrigere Wiederfindungsrate von durchschnittlich weiteren 13%- der zugegebenen MDA-MB-231-Zellen. [55]

Bei Trop2-/CD49f-abhängiger, zweiter Prozessierung mittels CellSearch konnte die mittleren Wiederfindungsrate der initial hereingegebenen Zellen von sogar 30,55% im ersten, EpCAM-abhängigen CellSearch-Lauf auf 64,51% nach beiden Anreicherungsschritten gesteigert werden.

Es ist also anzunehmen, dass bei der EpCAM-abhängigen CellSearch-Prozessierung CTCs mit niedriger EpCAM-Expression nicht detektiert werden können, die mittels des AK-Gemisches nachweisbar sind.

Da eine Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung von CTCs auch in Patientinnenproben ohne CTC-Nachweis im herkömmlichen CellSearch möglich war, wurden Anreicherungsversuche aus den EDFs einer EpCAM-abhängig prozessierten Probe gestartet, mit der Prämisse entgangene CTCs durch die zusätzliche Prozessierungsform nachzuweisen. Der Nachweis einer möglichen EpCAM-unabhängigen Anreicherung von CTCs aus EDFs wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bereits erbracht [56]. Auch im Rahmen dieser Arbeit war eine Anreicherung von CTCs aus der EDF möglich, auch wenn im EpCAM-abhängigen CellSearch keine CTCs detektiert wurden. Es gehen bei der EpCAM-basierten Prozessierung also CTCs, die unter anderem auch wichtige Informationen wie Mutationen tragen können, unter [42, 45].

Zudem wurde untersucht, ob diese nicht erfassten CTCs sich morphologisch von den EpCAM-abhängig detektierten CTCs unterscheiden. In einer der zwei untersuchten Proben konnten signifikante Unterschiede in der Größe und Zirkularität der Zellen nachgewiesen werden. Die mittels EpCAM-AK nicht erfassten CTCs scheinen kleiner und weniger rund zu sein, charakteristische Zeichen eines eher mesenchymaleren Phänotyps. Um dies zu bestätigen, sollten weitere EDFs mittels des Trop2-/CD49f-abhängigen Verfahrens prozessiert werden.

Weitere Experimente der Forschungsgruppe an EpCAM-unabhängig angereicherten CTCs aus der EDF konnten zeigen, dass neben Kernmutationen des Primärtumors in diesen CTCs zudem zusätzliche Mutationen mit folgender Resistenz gegen Östrogen-deprivierende Medikamente, die während einer Aromataseinhibitor-basierten Therapie entwickelt wurden, nachgewiesen werden konnten. [70]

5.9. Prognostische Relevanz der EpCAM-unabhängigen CTC-Anreicherung

Die prognostische Relevanz der EpCAM-abhängig im CellSearch detektierten CTC-Anzahl für das PFS sowie OS wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen aufgezeigt [20, 21].

Daten von De Wit et al. haben keinen Hinweis auf Auswirkungen auf das OS durch den Nachweis von CTCs mit niedriger EpCAM-Expression erbracht [55]. Die

Detektion von CTCs mittels einer EpCAM-unabhängigen Methode könnte also eventuell weniger relevant für die Prognose der Patientinnen sein.

Die Auswertung des klinischen Verlaufes unserer Patientinnen bei Nachweis von mindestens einer CTC mittels der Trop2-/CD49f-basierter Methode ergab - passend zu oben genannter Hypothese - keine signifikante Verschlechterung bezogen auf das PFS und OS. Wurde der *Cutoff* allerdings auf fünf CTCs erhöht, so ergab sich sowohl für das PFS ($p = 0,047$) als auch das OS ($p = 0,049$) eine signifikante Veränderung im Sinne einer Prognoseverschlechterung. Dieser Unterschied im Vergleich zu den Daten von De Wit et al. [55] könnte in der Betrachtung eines größeren Zellpools liegen, der eine breiteres Spektrum der EpCAM-Expression abdeckt, da im Gegensatz zu den Experimenten des o.g. Forschungsteams keine vorherige Minimierung der CTC-Anzahl der Proben mittels EpCAM-abhängigem CellSearch-Lauf erfolgt ist.

Die Trop2-/CD49f-basiert detektierbare CTC-Anzahl könnte somit als prognostischer Marker genutzt werden. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigte sich der Nachweis EpCAM-hochexprimierender CTCs als prognostisch relevanter als der Nachweis EpCAM-niedrigexprimierender CTCs. Der Zusammenhang der angereicherten CTC-Anzahl mit dem OS beruht somit eher auf der Fraktion der EpCAM-hochexprimierenden Zellen in den EpCAM-unabhängig angereicherten CTCs. [69, 70]

Diese Ergebnisse bestätigen den Zugewinn der etablierten Anreicherungs-methode auf die prognostische Aussagekraft im Vergleich zur Anreicherungsverfahren von anderen Arbeitsgruppen wie de Wit et al, bei denen die Fraktion der EpCAM-hochexprimierenden Zellen ausgespart bleibt. [54, 55]

Die sequenzielle Analyse mit zunächst EpCAM-basierter Anreicherung im CellSearch und folgender EpCAM-unabhängiger Analyse der EDF könnte somit eine Möglichkeit darstellen, um die maximale prognostische und prädiktive Aussagekraft aus der untersuchten Blutprobe zu erhalten. Einerseits erhält man die prognostische wichtige CTC-Anzahl des Standard-Verfahrens, andererseits ein Maximum an CTCs für weitergehende Analysen, die prädiktive Informationen liefern können, wie zum

Beispiel Mutationsanalysen. Die Aufarbeitung der EDF stellt besonders in Patientinnenproben ohne oder bei nur geringem CTC-Nachweis im EpCAM-abhängigen Anreicherungsverfahren eine Chance zum Informationsgewinn mit klinischer Relevanz dar.

Außerdem konnte bereits nachgewiesen werden, dass CTCs mit niedriger EpCAM-Expression, die EpCAM-unabhängig angereichert werden konnten, durch eine spezifische Proteinsignatur ein höheres Risiko für eine Hirnmetastasierung bei Mammakarzinompatientinnen begründen und somit eine klare klinische Relevanz haben. Gerade diese CTCs könnten Krebsstammzellen sein, die mittels des CD49f als Stammzellmarker besser anreicherbar sind als mittels EpCAM-Antikörpern. [95, 96]

5.10. Limitationen

Die morphologischen und genomischen Vergleiche zwischen CTCs verschiedener EMT-Stadien und EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherter CTCs sind bisher nur an einer eher geringen Zellanzahl durchgeführt worden. Um die Validität der hier aufgeführten Ergebnisse weiter zu festigen, wären Analysen weiterer Patientinnenproben und CTC notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit war es auch, besonders mesenchymale CTCs zu detektieren, die EpCAM-abhängig nicht angereichert und damit analysiert werden können. Da zur Identifizierung einer Zelle als CTC –sowohl im CellCelector als auch im CellTracks Analyzer II- aber eine gewisse CK-Fluoreszenzgrenze überschritten werden muss, könnten potentielle mesenchymale CTCs mit niedriger CK-Expression gegebenenfalls in der Auswertung nicht aufgezählt werden. Hier sollten zusätzliche Identifikationsmarker zur besseren Detektion der CK-niedrigexprimierenden CTCs untersucht werden. Unter anderem wurde von anderen Forschungsgruppen CD49f als möglicher Detektionsangriffspunkt untersucht [57]. Aufgrund der Nutzung als Anreicherungsziel mittels Antikörpern in dem hier beschriebenen etablierten Verfahren, käme diese Möglichkeit nicht infrage, es sind aber auch bereits andere potentielle Identifikationsmarker für CTCs wie beispielsweise Vimentin oder rVAR2 im Fokus der Forschung, sodass diese Limitation in Zukunft möglicherweise potentiell umgangen werden könnte. [97, 98]

Die bisher bestehende Einschränkung erklärt auch die deutlich niedrigere Wiederfindungsrate von MDA-MB-231 Zellen mittels der Trop2-/CD49f-abhängigen CellSearch-Prozessierung, wenn diese eher niedrig CK exprimierenden Zelllinienzellen nicht mittels Cell Tracker Green vorgefärbt wurden. Auch die eher epitheliale Ausrichtung der angereicherten CTCs zum EMT-Vergleich kann dadurch begründet werden.

Des Weiteren können bei der Einzelzellisolierung mittels CellCelector ungewollt zusätzliche Zellen –vorwiegend PBMCs- mitextrahiert werden, die dann zu einer Verunreinigung der Sequenzierungsergebnisse führen.

Zum Zeitpunkt meiner Projektarbeit war zudem nicht sicher, ob nicht auch eine erneute EpCAM-abhängige Anreicherung der EDF zu einem vergleichbaren Zugewinn des CTC-Nachweises führt. In weiterführenden Experimenten der Forschungsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass mittels Trop2-/CD49f-abhängiger Prozessierung signifikant mehr CTCs aus der EDF von Patientinnenproben nachgewiesen werden können als mit einem erneuten EpCAM-abhängigen CellSearch-Lauf. [70]

5.11. Schlussbetrachtung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen die Trop2-/CD49f-abhängige CTC-Anreicherung aus Blutproben bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zu optimieren – auch durch die Umstellung auf das standardisierte und automatisierte CellSearch-System - um anschließende vergleichende Analysen der detektierten CTCs zu ermöglichen.

Die klinische Relevanz der beiden verwendeten Antikörper ist bereits durch verschiedene Publikationen bestätigt worden. CD49f kann als Stammzellmarker die Anreicherung und Identifikation von Krebsstammzellen ermöglichen, die eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess spielen [95, 96]. Trop2 gerät neben seiner Funktion als negativer prognostischer Biomarker zudem in der aktuellen Forschung auch als möglicher therapeutischer Angriffspunkt vermehrt in den Fokus. Sacituzumab-Govitecan wird als Immunkonjugat mit einem monoklonalen Antikörper, der sich gegen das Trop2-Glykoprotein richtet, als zugelassener Arzneistoff in der Therapie von triple negativen Mammakarzinomen eingesetzt [66, 67].

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Anreicherung von CTCs mit unterschiedlichem EMT-Status, um eine mögliche genomische Ursache der phänotypischen Transition der Zellen zu ergründen.

EMT erlaubt den Tumorzellen eine erhöhte Motilität, die wiederum eine Metastasierung begünstigt, sodass das Verständnis des Prozesses der EMT zu einer verbesserten Erkenntnis über die Entstehung von Metastasen führen kann [99]. Somit könnten Möglichkeiten zu therapeutischen Ansatzpunkten geliefert werden – auch da die EMT Resistenzen gegen die konventionelle Therapie hervorrufen kann [100, 101].

Es konnten variable Expressionen der EMT-Marker von CTCs innerhalb einer Patientinnenprobe nachgewiesen werden. Bei den folgenden Sequenzierungen konnten keine spezifischen Diskrepanzen zwischen den DNA-Mutationsprofilen von eher epithelial zu mesenchymal geprägten CTCs aufgezeigt werden.

Eine andere mögliche Ursache für die EMT-typische Umwandlung von Zellen könnten Veränderungen im Methylohm sein. Um dies weiter zu eruieren, sollten weitere CTCs

mittels Trop2- und CD49f-basierter Methode isoliert werden und Analysen der Methylierungsmuster durchgeführt werden [90, 102].

Ein weiteres Bestreben dieser Promotionsarbeit war die vergleichende Analyse von CTCs, die durch unterschiedliche Methoden zugänglich gemacht wurden. Verglichen werden sollten CTCs, die mittels des aktuellen Goldstandards – der EpCAM-abhängigen CellSearch-Prozessierung - angereichert wurden, mit denen, die durch die entwickelte Trop2-/ CD49f-basierte Anreicherungsmethode detektiert werden konnten.

Zum einen wurden die morphologischen Eigenschaften der unterschiedlich angereicherten CTCs gegenübergestellt. Die EpCAM-unabhängig angereicherten CTCs waren – als Hinweis auf eine Tendenz zum mesenchymalen Pol - kleiner und weniger rund.

Um zu schauen, ob die unterschiedlich detektierten Zellen aus unterschiedlichen Klonen entstanden sind, wurden nach erfolgter Sequenzierung phylogenetische Stammbäume der jeweiligen Probe erstellt. In einer von vier verglichenen Proben zeigten sich Hinweise auf einen unabhängigen Klon, der allein mittels Trop2-/CD49f-abhängiger Prozessierung angereichert werden konnte. Es sollten weitere Proben prozessiert und analysiert werden, um diese Hypothese zu verstärken.

Neben der Varianz innerhalb der CTCs ist auch der rein numerische Nachweis von CTCs bedeutend für die Patientin. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, können neben den EpCAM-abhängig angereicherten CTCs auch mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch nachgewiesene CTCs bei einem *Cut Off* von 5 eine prognostische Aussage für das PFS sowie OS der untersuchten Patientinnen treffen. Langfristig betrachtet wäre es interessant, in klinischen Studien - analog zur STIC-CTC oder zur DETECT III-Studie - durch hohe Fallzahlen den prädiktiven Nutzen von EpCAM negativen CTCs weiter zu eruieren, um auch Therapieentscheidungen vermehrt von deren Nachweis abhängig machen zu können. [28, 29]

Eine EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs mittels Trop2-/CD49f-AK-Kombination kann also prognostischen Wert haben und die CTC-Positivitätsrate in

Patientinnenproben erhöhen und somit vor allem in Proben, in denen keine EpCAM-abhängige Anreicherung von CTCs gelungen ist, weitergehende Analysen - zum Beispiel der DNA – ermöglichen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IsoFlux CTC System (Fluxion Biosciences).....	35
Abbildung 2: Sievewell <i>Multiwell Slides</i>	38
Abbildung 3: CellSearch-System.....	39
Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Färbung für epithelialen und mesenchymalen Marker	43
Abbildung 5: MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen als Referenzen der Expression von E-Cadherin und Vimentin	44
Abbildung 6: Wiederfindungsrate von Zellen der Linie Sk-Br-3 und MDA-MB-231, Fluxion CTC Kit vs. Antikörper-Gemisch	46
Abbildung 7: Wiederfindungsrate von Sk-Br-3-Zellen [%] in Abhängigkeit des Alters der EpCAM-depletierten Fraktion	47
Abbildung 8: Anreicherung von MDA-MB-231-Zellen aus Vollblut mittels CellSearch- Lauf und anschließendem IsoFlux-Lauf	48
Abbildung 9: Genome Integrity Index nach Polzer et al. [82] der angereicherten CTCs bei unterschiedlichen Arbeitsabläufen.....	49
Abbildung 10: Relative Wiederfindungsrate von Sk-Br-3-Zellen in Abhängigkeit der Färbungsmethode	51
Abbildung 11: Mittels CellSearch-System EpCAM-unabhängig angereicherte, vorgefärbte Zellen der Linien Sk-Br-3 und MDA-MB-231	53
Abbildung 12: Mittels CellSearch-System EpCAM- unabhängig angereicherte, vorgefärbte Zellen der Linien Sk-Br-3 und MDA-MB-231 aus getrennten Blutproben	54
Abbildung 13: Mittels CellSearch-System EpCAM-unabhängig angereicherte Zellen der Linien Sk-Br-3 und MDA-MB-231 aus getrennten Blutproben und ohne Vorfärbung	55
Abbildung 14: Titration CD49f-Antikörper für die EpCAM-unabhängige Anreicherung mittels CellSearch	56
Abbildung 15: Anreicherung von Einzelzellen und Clustern der Zelllinie MDA-MB-231 mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf und CD49f-Antikörper.....	56
Abbildung 16: Titration Trop 2-Antikörper für die EpCAM-unabhängige Anreicherung mittels CellSearch mittels Sk-Br-3-Zellen	57

Abbildung 17: Anreicherung von Einzelzellen und Clustern der Zelllinie Sk-Br-3 mittels EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf und Trop 2-Antikörper	58
Abbildung 18: Wiederfindungsrate vorgefärbter Zellen der Linie MDA-MB-231 bei EpCAM-unabhängigem CellSearch-Lauf im Vergleich zum EpCAM-abhängigem CellSearch-Lauf	58
Abbildung 19: Prozessierung von mit MDA-MB-231 versetzten Blutproben mittels EpCAM-abhängigem und anschließendem EpCAM-unabhängigen CellSearch-Lauf	60
Abbildung 20: Beispiele epithelialer und mesenchymaler CTCs, Einzelzelle und Cluster.....	67
Abbildung 21: Verhältnis der mittleren Fluoreszenz-Intensität E-Cadherin/Vimentin verschiedener Patientinnenproben im Vergleich zu den Referenzzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231.....	68
Abbildung 22: DNA-Sequenzierung isolierter CTCs nach EpCAM-unabhängiger Anreicherung.....	70
Abbildung 23: Beispiel einer CTC, die mittels EpCAM-Antikörper angereichert wurde	72
Abbildung 24: Beispiel einer CTC, die mittels Trop2-/CD49f-Antikörper-Gemisch angereichert wurde.....	72
Abbildung 25: Vergleich der Größe der angereicherten CTCs, EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung	73
Abbildung 26: Vergleich Gesamtsignifikanzen Größe EpCAM-anhängig und EpCAM-unabhängig angereicherte CTCs, links: Mittelwerte, rechts: Median.....	74
Abbildung 27: Vergleich der Zirkularität der angereicherten CTCs, EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung	75
Abbildung 28: Vergleich Gesamtsignifikanzen Zirkularität EpCAM-anhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherte CTCs, links: Mittelwerte, rechts: Median.....	76
Abbildung 29: Vergleich der durchschnittlichen CK-Intensität der angereicherten CTCs, EpCAM-abhängige vs. Trop2-/CD49f-abhängige Anreicherung	77
Abbildung 30: Vergleich Gesamtsignifikanzen durchschnittliche CK-Intensität EpCAM-anhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherte CTCs, links: Mittelwerte, rechts: Median	78

Abbildung 31: Korrelation der Vergleichsgrößen Zirkularität und Größe bei EpCAM-abhängiger und Trop2-/CD49f-abhängiger Anreicherung	79
Abbildung 32: Vergleich EpCAM-abhängig und Trop2-/CD49f-abhängig angereicherte MDA-MB-231-Zellen hinsichtlich Größe und Zirkularität Blutproben von gesunden Probandinnen wurden mit MDA-MB-231-Zellen versetzt und nach Herstellerprotokoll im CellSearch-System mittels CTC-Kit prozessiert. Zusätzlich wurden die mit Zelllinienzellen versetzten Proben vergleichend EpCAM-unabhängig mittels Trop2-/CD49f-AK-Gemisch im CellSearch-System angereichert. Die Größe und Zirkularität der MDA-MB-231-Zellen wurde mittels ImageJ gemessen und gegeneinander aufgetragen.	80
Abbildung 33: Vergleichende DNA-Analyse EpCAM-abhängig und EpCAM-unabhängig angereicherter CTCs	81
Abbildung 34: PFS und OS von Mammakarzinompatientinnen abhängig von der CTC-Positivität	85
Abbildung 35: PFS und OS von Mammakarzinompatientinnen abhängig von einer CTC-Anzahl >5.....	86
Abbildung 36: Kontrolle Größe, und Zirkularität von MDA-MB-231-Zellen nach 1. und 2. CellSearch-Lauf.....	89
Abbildung 37: Vergleich von CTCs, die mittels CellSearch und CTCs, die EpCAM-unabhängig aus der entstandenen EDF angereichert wurden	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 2: Zusammensetzung der Puffer	25
Tabelle 3: Supplemente des Mediums	25
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	26
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	26
Tabelle 6: Verwendete Kits	27
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 8: Verwendete Geräte	29
Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur Färbung der angereicherten Zellen	36
Tabelle 10: Verwendete Antikörper zur Färbung der Zellen auf Objektträgern nach Anfertigung mittels Cytospin.....	37
Tabelle 11: Färbung der Zelllinien, Antikörper mit jeweiligem Kanal	43
Tabelle 12: Mittelwert Wiederfindungsrate Sk-Br-3- und MDA-MB-231-Zellen, Fluxion Kit vs. Antikörper-Gemisch	46
Tabelle 13: CTC-Anreicherung aus Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom: EpCAM-abhängige Anreicherung mittels CellSearch (Probenvolumen 7,5 ml) vs. EpCAM-unabhängiger Anreicherung (Probenvolumen 5 ml) mittels IsoFlux	61
Tabelle 14: Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger Anreicherung im CellSearch und EpCAM-unabhängiger Anreicherung im IsoFlux	63
Tabelle 15: Vergleich EpCAM-abhängiger (Probenvolumen 7,5 ml und –unabhängiger Anreicherung (Probenvolumen 5 ml) mittels CellSearch von CTCs aus Patientinnenproben	65
Tabelle 16: Klinischen Daten der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit durchgeführter EMT-Vergleichsanalyse nach EpCAM-unabhängiger Anreicherung der CTCs.....	69
Tabelle 17: Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger und - unabhängiger Anreicherung CTC-Anreicherung	82
Tabelle 18: Tumorprogression der Patientinnen mit EpCAM-abhängiger und EpCAM- unabhängiger Anreicherung	83
Tabelle 19: EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs aus EDFs	87

Tabelle 20: Klinische Daten der Patientinnen mit EpCAM-unabhängiger CTC-
Anreicherung aus EpCAM-depletierten Fraktionen 91

Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2015/2016 12. Ausgabe.* 2019, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
: Berlin.
2. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
3. Weinberg, R.A., *The biology of cancer.* 2013.
4. Hunter, T., *Oncoprotein networks.* Cell, 1997. **88**(3): p. 333-46.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
7. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3*
2020, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF; AWMF Registernummer: 032-045OL, .
8. Bertos, N.R. and M. Park, *Breast cancer - one term, many entities?* J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3789-96.
9. Lebeau, A., et al., *[Invasive breast cancer: the current WHO classification].* Pathologie, 2014. **35**(1): p. 7-17.
10. Sims, A.H., et al., *Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications.* Nat Clin Pract Oncol, 2007. **4**(9): p. 516-25.
11. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis.* Science, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
12. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
13. Folkman, J., *How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture.* Cancer Res, 1986. **46**(2): p. 467-73.
14. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
15. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
16. Perakis, S. and M.R. Speicher, *Emerging concepts in liquid biopsies.* BMC Med, 2017. **15**(1): p. 75.
17. McGranahan, N. and C. Swanton, *Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future.* Cell, 2017. **168**(4): p. 613-628.
18. Alix-Panabières, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.* Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 110-8.
19. Joosse, S.A., T.M. Gorges, and K. Pantel, *Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells.* EMBO Mol Med, 2015. **7**(1): p. 1-11.
20. 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.
21. 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.

22. Cohen, S.J., et al., *Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(19): p. 3213-21.
23. Scher, H.I., et al., *Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data*. Lancet Oncol, 2009. **10**(3): p. 233-9.
24. Krebs, M.G., et al., *Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1556-63.
25. Hou, J.M., et al., *Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(5): p. 525-32.
26. 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.
27. Budd, G.T., et al., *Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6403-9.
28. 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.
29. 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.
30. Alix-Panabières, C. and K. Pantel, *Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision*. Lab Chip, 2014. **14**(1): p. 57-62.
31. Coumans, F.A., et al., *Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5711-8.
32. 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.
33. Barradas, A.M. and L.W. Terstappen, *Towards the Biological Understanding of CTC: Capture Technologies, Definitions and Potential to Create Metastasis*. Cancers (Basel), 2013. **5**(4): p. 1619-42.
34. 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.
35. Warkiani, M.E., et al., *An ultra-high-throughput spiral microfluidic biochip for the enrichment of circulating tumor cells*. Analyst, 2014. **139**(13): p. 3245-55.
36. Xu, L., et al., *Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138032.
37. Strati, A., et al., *Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(2): p. R20.
38. 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.
39. 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.
40. Osta, W.A., et al., *EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5818-24.
41. Spizzo, G., et al., *EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis*. J Clin Pathol, 2011. **64**(5): p. 415-20.

42. Königsberg, R., et al., *Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients*. Acta Oncol, 2011. **50**(5): p. 700-10.
43. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science (New York, N.Y.), 2013. **339**(6119): p. 580-584.
44. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
45. 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.
46. Jiang, Z., et al., *RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer*. Cell Cycle, 2011. **10**(10): p. 1563-70.
47. Bonnomet, A., et al., *A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer*. Oncogene, 2012. **31**(33): p. 3741-53.
48. Jeong, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype*. Histopathology, 2012. **60**(6b): p. E87-95.
49. Kokkinos, M.I., et al., *Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 191-203.
50. Gilles, C., et al., *Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 24): p. 4615-25.
51. Gilles, C., et al., *Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2658-64.
52. Kowalski, P.J., M.A. Rubin, and C.G. Kleer, *E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(6): p. R217-22.
53. Gumbiner, B.M., *Regulation of cadherin adhesive activity*. J Cell Biol, 2000. **148**(3): p. 399-404.
54. de Wit, S., et al., *The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12270.
55. de Wit, S., et al., *EpCAM(high) and EpCAM(low) circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients*. Oncotarget, 2018. **9**(86): p. 35705-35716.
56. Schneck, H., et al., *EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144535.
57. Mostert, B., et al., *CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes*. Cancer Lett, 2012. **319**(1): p. 49-55.
58. Wang, Y., et al., *Integrin subunits alpha5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 84.
59. Cariati, M., et al., *Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line*. Int J Cancer, 2008. **122**(2): p. 298-304.
60. Brooks, D.L., et al., *ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models*. Mol Cancer, 2016. **15**: p. 26.
61. Lim, E., et al., *Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 907-13.
62. Vieira, A.F., et al., *P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in basal-like breast cancer*. Stem Cells, 2012. **30**(5): p. 854-64.
63. Fornaro, M., et al., *Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas*. Int J Cancer, 1995. **62**(5): p. 610-8.

64. Guerra, E., et al., *The Trop-2 signalling network in cancer growth*. *Oncogene*, 2013. **32**(12): p. 1594-600.
65. Mikolajczyk, S.D., et al., *Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood*. *J Oncol*, 2011. **2011**: p. 252361.
66. Lenárt, S., et al., *Trop2: Jack of All Trades, Master of None*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(11).
67. Shvartsur, A. and B. Bonavida, *Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications*. *Genes Cancer*, 2015. **6**(3-4): p. 84-105.
68. Remšík, J., et al., *Trop-2 plasticity is controlled by epithelial-to-mesenchymal transition*. *Carcinogenesis*, 2018. **39**(11): p. 1411-1418.
69. Krämer, A., *Dissertation in Vorbereitung*. Universität Düsseldorf
70. Franken, A., et al., *Comparative analysis of EpCAM high-expressing and low-expressing circulating tumour cells with regard to their clonal relationship and clinical value*. *Br J Cancer*, 2023. **128**(9): p. 1742-1752.
71. clinical trials. *DETECT III - A Multicenter, Phase III Study to Compare Standard Therapy +/- Lapatinib in HER2-ve MBC-Patients With HER2+ve CTCs (DETECT III)*. 2012 29.07.2022]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01619111>.
72. Clinical trials. *DETECT IV - A Study in Patients With HER2-negative Metastatic Breast Cancer and Persisting HER2-negative Circulating Tumor Cells (CTCs)*. 2014 28.07.2022]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02035813>.
73. Clinical trials. *Detect V / CHEVENDO (Chemo vs. Endo)*. 2015 28.07.2022]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02344472>.
74. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
75. Fluxion and Biosciences. *Liquid Biopsy- IsoFlux CTC System*. 05.09.2022]; Available from: <https://pages.fluxionbio.com/hubfs/Docs/Product%20Info/IsoFlux%20Brochure.pdf>.
76. Sievewell. *Sievewell Multiwell Slides - Easy to use*. 05.09.2022]; Available from: <https://www.sievewell.com/features/easy-to-use>.
77. Menarini. *How does the CellSearch System work?* 06.09.2022]; Available from: <https://www.cellsearchctc.com/about-cellsearch/how-cellsearch-ctc-test-works>.
78. Menarini. *CellSearch CTC System*. 06.09.2022]; Available from: <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsearch-system-overview>.
79. Silvestri, M., et al., *Detection of Genomically Aberrant Cells within Circulating Tumor Microemboli (CTMs) Isolated from Early-Stage Breast Cancer Patients*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(6).
80. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 515-27.
81. Ross, D.T. and C.M. Perou, *A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines*. *Dis Markers*, 2001. **17**(2): p. 99-109.
82. Polzer, B., et al., *Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention*. *EMBO Mol Med*, 2014. **6**(11): p. 1371-86.
83. Palmirotta, R., et al., *Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology*. *Ther Adv Med Oncol*, 2018. **10**: p. 1758835918794630.
84. Franken, A., et al., *Detection of ESR1 Mutations in Single Circulating Tumor Cells on Estrogen Deprivation Therapy but Not in Primary Tumors from Metastatic Luminal Breast Cancer Patients*. *J Mol Diagn*, 2020. **22**(1): p. 111-121.
85. Yang, L., et al., *Implementing microwell slides for detection and isolation of single circulating tumor cells from complex cell suspensions*. *Cytometry A*, 2022. **101**(12): p. 1057-1067.

86. Costa, M.L., et al., *Distinct interactions between epithelial and mesenchymal cells control cell morphology and collective migration during sponge epithelial to mesenchymal transition*. J Morphol, 2020. **281**(2): p. 183-195.
87. Aceto, N., et al., *En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition*. Trends Cancer, 2015. **1**(1): p. 44-52.
88. Mak, M.P., et al., *A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(3): p. 609-20.
89. Pixberg, C.F., et al., *Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells*. Oncogene, 2017. **36**(23): p. 3223-3231.
90. Carmona, F.J., et al., *A comprehensive DNA methylation profile of epithelial-to-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2014. **74**(19): p. 5608-19.
91. Rajić, J., et al., *DNA methylation of miR-200 clusters promotes epithelial to mesenchymal transition in human conjunctival epithelial cells*. Exp Eye Res, 2020. **197**: p. 108047.
92. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
93. Williams, A., et al., *Size-based enrichment technologies for CTC detection and characterization*. Recent Results Cancer Res, 2012. **195**: p. 87-95.
94. Lampignano, R., et al., *A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAM(high) and EpCAM(low/negative) CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
95. Zhang, L., et al., *The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis*. Sci Transl Med, 2013. **5**(180): p. 180ra48.
96. Vishnoi, M., et al., *The isolation and characterization of CTC subsets related to breast cancer dormancy*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17533.
97. Batth, I.S., et al., *Abstract 1941: Cell surface vimentin is a novel marker for CTC detection in neuroblastoma*. Cancer Research, 2017. **77**(13_Supplement): p. 1941-1941.
98. Bang-Christensen, S.R., et al., *Capture and Detection of Circulating Glioma Cells Using the Recombinant VAR2CSA Malaria Protein*. Cells, 2019. **8**(9).
99. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
100. Zheng, X., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 525-530.
101. Fischer, K.R., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 472-6.
102. Galle, E., et al., *DNA methylation-driven EMT is a common mechanism of resistance to various therapeutic agents in cancer*. Clin Epigenetics, 2020. **12**(1): p. 27.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans Neubauer, dessen Expertise und Anregungen maßgeblich zum Erfolg meiner Forschungsarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Nikolas Stoecklein danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein herzliches Dankeschön geht vor allem auch an Dr. André Franken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine geduldige Anleitung im Labor, die fortwährende Motivation und die stets konstruktiven Denkanstöße hätte meine Doktorarbeit nicht realisiert werden können. Ebenso danke ich Annika Krämer, deren Vorarbeiten den Grundstein für mein Dissertationsthema gelegt haben. Zudem danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Forschungslabor für ihre Unterstützung, insbesondere Liwen Yang und Mahdi Rivandi sowie allen Kooperationspartnern. Ich danke auch meinen Mitpromovierenden für die zahlreichen Kaffeepausen, insbesondere Theresa Bozzetti, die während dieser Zeit eine echte Freundin geworden ist.

Selbstverständlich danke ich auch allen Patientinnen, die ihre Proben für die Forschungsarbeit zur Verfügung gestellt haben.

Ich möchte aber auch meiner Familie und meinen Freunden danken, insbesondere meinen Eltern Inge und Christof Sicking, ohne deren bedingungslose Unterstützung weder der erfolgreiche Abschluss meines Studiums noch dieser Arbeit möglich gewesen wäre. Auch meinem Partner Hendrik Terschluse möchte ich für das Aushalten wiederholter Frustrationen danken, vor allem während der Schreibphase, mit immer dem richtigen Verhältnis zwischen Verständnis und dem nötigen Ansporn.