Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Prof. Dr. Tanja Fehm

EpCAM-unabhängige Anreicherung und Charakterisierung von CTCs in metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annika Conrads

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Georg Flügen

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jan Dominik Kuhlmann

Für meine Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Franken, A., **Kraemer, A.**, Sicking, 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 128, 1742–1752 (2023) DOI: 10.1038/s41416-023-02179-0 (1)

Zusammenfassung

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) werden als Vorläuferzellen von metastasierenden Krebserkrankungen angesehen und können als prognostische und prädiktive Biomarker eingesetzt werden. Die Anreicherung basiert aktuell hauptsächlich auf immunomagnetischen Technologien, welche abhängig von Antikörpern gegen EpCAM sind. Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass dadurch eine EpCAM gering-exprimierende Subpopulation nicht angereicht wird, fehlt hinreichendes Wissen über die klinische Relevanz und die Verwandtschaft zu EpCAM-positiven CTCs.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein immunomagnetisches Verfahren entwickelt, welches erlaubt, CTCs EpCAM-unabhängig anzureichern. Dadurch lassen sich EpCAM hoch- und gering-exprimierende CTCs durch dieselbe Methode direkt vergleichen.

Aus 23 Blutproben von metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen wurden CTCs angereichert. Dazu wurden Antikörper gegen die Zelloberflächenproteine Trop-2 sowie CD49f, welche an magnetische Beads gekoppelt wurden, verwendet. Die EpCAM-Expression der CTCs wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. EpCAM hoch- und gering-exprimierende CTCs wurden isoliert. Anschließend konnten deren chromosomale Aberrationen und prädiktive Mutationen durch *Low Pass Sequencing* sowie *Next Generation Sequencing* analysiert werden.

Durch die Kombination der Antikörper gegen Trop-2 und CD49f konnte ein synergistischer Effekt bei der Anreicherung der CTCs festgestellt werden. Die Korrelation zwischen EpCAM-Fluoreszenzintensität und Patientenüberleben verdeutlichte, dass Patientinnen mit EpCAM hoch-exprimierenden CTCs sowohl ein schlechteres Gesamtüberleben ($p = 0.046$) als auch progressionsfreies Überleben ($p = 0.026$) verglichen zu Patientinnen mit EpCAM gering-exprimierenden CTCs hatten. EpCAM hoch- und gering-exprimierende CTCs wiesen außerdem gleiche chromosomale Aberrationen und prädiktive Mutation auf, was eine enge evolutionäre Verwandtschaft nahelegt.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass EpCAM hoch-exprimierende CTCs einen höheren prognostischen Nutzen haben. Da EpCAM gering-exprimierende CTCs jedoch den gleichen genomischen Klon des Tumors repräsentieren, könnten diese ebenfalls als Surrogat-Material des Tumors verwendet werden. Vor allem könnten sie eine klinische Relevanz haben, wenn durch EpCAM-abhängige Anreicherungsverfahren keine CTCs isoliert werden können.

Summary

Circulating tumor cells (CTCs) are considered as precursors of metastatic spread and can act as prognostic and predictive biomarkers. Their enrichment is mainly based on immunomagnetic technologies relying on antibodies against EpCAM. Although it was shown that an EpCAM low-expressing fraction is not captured by this, knowledge about its clinical relevance and relation to EpCAM-positive CTCs is still lacking.

In the course of this work, an immunomagnetic assay was developed to enrich CTCs EpCAM-independently to compare EpCAM high- and low-expressing CTCs enriched with the same method.

CTCs were enriched from 23 metastatic breast cancer patients' blood samples using antibodies against the cell surface proteins Trop-2 and CD49f coupled to magnetic particles. The CTCs' EpCAM expression was determined by fluorescence microscopy. EpCAM high-expressing and low-expressing CTCs were isolated. Their chromosomal aberrations and predictive mutations were analyzed by low pass and targeted next generation sequencing.

The application of antibodies against Trop-2 and CD49f showed a synergistic effect in the CTC yield. The correlation of EpCAM-based fluorescence intensities and patients' survival revealed that patients with EpCAM high-expressing CTCs had a worse overall ($p = 0.046$) and progression free survival ($p = 0.026$) compared to patients with EpCAM low-expressing CTCs. EpCAM high- and low-expressing CTCs presented similar chromosomal aberrations and mutations indicating a close evolutionary relationship.

The data of this work indicate that EpCAM high-expressing CTCs are particularly prognostically relevant. However, since EpCAM low-expressing CTCs represent similar genomic clones of the tumor, they could be used as tumor surrogate material and could have relevance if no CTCs are detected EpCAM-dependently.

Abkürzungsverzeichnis

×G	Zentrifugalbeschleunigung
µg, mg, g	(Mikro- / Milli-) Gramm
(m) M	(Milli-) Molar
°C	Grad Celsius
A.	*Arteria*
ADAM8	Metalloproteinase-Disintegrin 8
AF	AlexaFluor
AI	Aromataseinhibitor
AJCC	*American Joint Commission on Cancer*
AK	Antikörper
ATCC	*American Type Culture Collection*
A. U.	Willkürliche Einheit
BB	*Binding Buffer*
BF	Hellfeld
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Karzinom
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CD146	*Cluster of Differentiation 146*
CD44	*Cluster of Differentiation 44*
CD45	*Cluster of Differentiation 45*
CD49f	*Cluster of Differentiation 49f*
CK	Zytokeratin

cMET/HGFR	Tyrosine-Protein Kinase Met / Hepatocyte Growth Factor Receptor
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTC	Zirkulierende Tumorzelle (*Circulating Tumour Cell*)
ctrl	Kontrolle
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4′,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E1/2/3	Epoxy Puffer 1/2/3
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EpCAM	*Epithelial Cell Adhesion Molecule*
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	Rezeptor Tyrosin Kinase 2
ERK 1/2	*Extracellular-Signal Regulated Kinase 1/2*
ESPR1	*Epithelial Splicing Regulatory Protein 1*
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	*U.S. Food and Drug Administration*
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
G	Grading
GnRH	Gonadotropin-*Releasing* Hormon

H_2O	Wasser
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N 2-Ethylsulfonsäure
HER2	HER2/neu, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*
IgG 1/2a	Immunglobulin G 1/2a
ITGA6	Integrin α6 Gen
k. A.	keine Angabe
Ki-67	Kiel-Antigen Nr. 67
l, ml, µl	(Mikro- / Milli-) Liter
M	Metastasen
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	*Messenger* Ribonukleinsäure
MUC1	Mucin 1, Zelloberflächen-assoziiert
MW	Mittelwert
N	Lymphknotenbefall
NF-κB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NGS	*Next Generation Sequencing*
OS	Gesamtüberleben (*Overall survival*)
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin

PFS	Progressionsfreies Überleben (*progression free survival*)
PR	Progesteronrezeptor
Rpm	*Revolutions per Minute*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERD	Selektiver Östrogenrezeptor-Degradierer
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
T	Primärtumor
TGF-β	*Transforming Growth Factor β*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
Trop-2	*Trophoblastic Cell-surface Antigen 2*
UICC	*Union for International Cancer Control*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
WGA	*Whole Genome Amplification*
WNT	*Wingless und Int-1* Signaltransduktionsweg

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Krebs 1

1.2 Brustkrebs 2

1.2.1 Epidemiologie 2

1.2.2 Aufbau der Brust 2

1.2.3 Histologische Klassifikation 3

1.2.4 Tumorbiologische Klassifikation 5

1.2.5 Therapien des Mammakarzinoms 6

1.3 Metastasierung 7

1.3.1 Epithelial-mesenchymale Transition 8

1.4 EpCAM 9

1.5 Trop-2 10

1.6 CD49f 11

1.7 Zirkulierende Tumorzellen 12

1.7.1 Anreicherungsverfahren zirkulierender Tumorzellen 14

1.7.2 Identifikation von zirkulierenden Tumorzellen 16

1.7.3 Prognostischer Nutzen von CTCs 16

1.7.4 Prädiktiver Nutzen von CTCs 17

1.8 Liquid Biopsy 18

1.9 Ziele der Arbeit 19

1.) Etablierung eines EpCAM-unabhängigen *Workflows* zur Anreicherung von Tumorzellen 19

2.) Bestimmung der EpCAM-Expressionen auf CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen 20

3.) Charakterisierung von EpCAM-hoch bzw. -gering exprimierenden CTCs anhand von drei Index-Patientinnen 20

2 Material 21

2.1 Geräte 21

2.2 Chemikalien 22

2.3 Antikörper 23

2.4 Kits und Gebrauchsartikel 24

2.5 Lösungen und Puffer 25

2.6 Zelllinien 26

2.7 Software ... 27

3 Methoden ... 28

3.1 Methoden der Durchflusszytometrie ... 28
3.1.1 Expression von Trop-2 und CD49f auf Zelllinien und PBMCs ... 28
3.1.2 Expression von EpCAM auf Tumorzellen ... 28

3.2 Methoden zur Verifizierung der Antikörper und Beads ... 29
3.2.1 Färbung von Tumorzellen für Trop-2 und CD49f ... 29
3.2.2 Bindung zwischen Tumorzellen und Beads über Antikörper ... 30
3.2.3 Herstellung der Antikörperbindung an DynaBeads M-450 Epoxy ... 30

3.3 Methoden der Zellkultur ... 32
3.3.1 Zelllinien und Kulturbedingungen ... 32
3.3.2 Einfrieren von Zelllinien ... 33
3.3.3 Auftauen von Zelllinien ... 33

3.4 Patienten ... 33

3.5 Methoden zur Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen ... 34
3.5.1 Präparation des Blutes ... 34
3.5.2 Vorbereitung von Tumorzellen für *Spike-in* Experimente ... 35
3.5.3 DynaBeads M-450 Epoxy ... 35
3.5.4 CELLection-Beads Biotin Binder ... 36
3.5.5 Anreicherung von Tumorzellen durch das IsoFlux-System ... 37
3.5.6 Färbung von Tumorzellen nach der Anreicherung ... 38
3.5.7 Ablösung der magnetischen Beads von Tumorzellen ... 39
3.5.8 EpCAM-Quantifizierung ... 39

3.6 Identifikation und Isolation von Tumorzellen ... 40
3.6.1 Identifikation von Tumorzellen ... 40
3.6.2 Isolation von Einzelzellen ... 41

3.7 Methoden der DNA-Analyse von Tumorzellen ... 41
3.7.1 *Whole Genome Amplification* (WGA) ... 41
3.7.2 Low Pass Sequencing ... 42
3.7.3 Mutationsanalyse ... 42

4 Ergebnisse ... 43

4.1 Klinische Patientendaten ... 43

4.2 Kategorisierung der Trop-2- und CD49f-Expression auf Tumorzellen ... 46
4.2.1 Trop-2- und CD49f-Antigen Expressionen auf Tumorzellen ... 46
4.2.2 Fluoreszenzfärbung von Tumorzellen für Trop-2 und CD49f ... 48

4.3 Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen ... 49

4.3.1 Verifizierung der Bindung magnetischer Beads an Tumorzellen ... 49
4.3.2 Anreicherung von Tumorzellen durch magnetische Beads ... 51
4.3.3 Testung unterschiedlicher Antikörper-Konzentrationen ... 53
4.3.4 Kombinierte Anwendung der Antikörper ... 56
4.4 Präzisierung des finalen Workflows ... 57
4.4.1 Färbung der angereicherten Tumorzellen ... 57
4.4.2 Ablösung der magnetischen Beads ... 58
4.4.3 Test des finalen *Workflows* ... 59
4.5 Variablen, die die Anreicherung der Tumorzellen beeinflussen könnten ... 60
4.5.1 Einfluss der Zellfixierung ... 60
4.5.2 Etablierung des *Workflows* anhand von Patientenproben ... 61
4.5.3 EpCAM-Expression im Verlauf von mehreren Tagen ... 62
4.6 Isolation von CTCs aus Patientenproben ... 64
4.6.1 EpCAM-Referenz ... 64
4.6.2 EpCAM-Expression auf zirkulierenden Tumorzellen ... 65
4.7 Charakterisierung von EpCAM-positiven und EpCAM-negativen CTCs ... 67
4.7.1 DNA-Qualität der CTCs ... 68
4.7.2 Chromosomale Aberrationen und Mutationen von CTCs ... 69
4.8 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben abhängig von der EpCAM-Expression ... 72
5 Diskussion ... 74
5.1 Wissenschaftlicher Hintergrund ... 74
5.2 Etablierung eines EpCAM-unabhängigen Workflows zur Anreicherung von Tumorzellen ... 75
5.2.1 Fazit ... 78
5.2.2 Limitationen ... 79
5.3 Bestimmung der EpCAM-Expressionen auf CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen ... 80
5.3.1 Fazit ... 83
5.3.2 Limitationen ... 84
5.4 Charakterisierung von EpCAM-hoch bzw. -gering exprimierenden CTCs anhand von drei Index-Patientinnen ... 85
5.4.1 Fazit ... 87
5.4.2 Limitationen ... 88
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick ... 88
Literaturverzeichnis ... 90
Abbildungsverzeichnis ... 108

Tabellenverzeichnis..... 109

1 Einleitung

1.1 Krebs

Im Jahr 2020 sind weltweit 19,3 Millionen Menschen neu an Krebs erkrankt. Gleichzeitig gab es 10,0 Millionen Krebs-assoziierte Todesfälle. Aktuell erkrankt einer von vier Männern bzw. eine von fünf Frauen im Laufe ihres Lebens an Krebs. Gleichzeitig stirbt einer von acht Männern bzw. eine von elf Frauen an Krebs. Insgesamt ist Brustkrebs derzeit die häufigste Krebsart weltweit (11,7 %), gefolgt von Lungenkrebs (11,4 %), Darmkrebs (10,0 %), Prostatakrebs (7,3 %) sowie Magenkrebs (5,6 %) (2).

Unter dem Begriff „Krebs“ versteht man die Fähigkeit von Zellen abnormal zu wachsen, ihren Ursprungsort zu verlassen und in andere Teile des menschlichen Körpers einzuwandern. Der Begriff „Tumor“ kommt aus dem Lateinischen und lässt sich mit „Geschwulst“ übersetzen. Dies impliziert, dass nicht alle Tumoren maligne sind. Gutartige Tumoren unterscheiden sich darin, dass sie keine Fähigkeit zur Streuung in den Körper besitzen und ihren Ursprungsort daher gewöhnlich nicht verlassen. Es gibt mehr als 200 verschiedene Krebserkrankungen des Menschen. Je nachdem von welchem Gewebetyp der Tumor ausgeht, unterscheiden sich Karzinome, die von epithelialen Zellen abstammen von Sarkomen, die aus Bindegewebe entstehen. Leukämien und Lymphome entstehen aus hämatopoetischen und lymphatischen Zellen. Blastome stammen aus embryonalen Zellen und germinale Tumoren entstehen aus Keimzellen (3).

Hanahan und Weinberg haben Fähigkeiten definiert, die zur Entstehung von Krebs führen und diese als „Hallmarks of Cancer“ bezeichnet (4):

1. Tumorzellen müssen unabhängig von Wachstumsfaktoren proliferieren können. Normale Zellen unterliegen diesen, sodass die Zellteilung von Wachstumssignalen abhängig ist. Krebszellen sind in der Lage, unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren, diese selbst zu synthetisieren.
2. Tumorzellen müssen unempfindlich gegenüber Signalen sein, die ihr Wachstum inhibieren.
3. Tumorzellen müssen Apoptose umgehen. Der programmierte Zelltod von entarteten Zellen verhindert normal die Entstehung von Krebs.

4. Tumorzellen müssen ein unbegrenztes replikatives Potential besitzen.
5. Tumorzellen müssen in der Lage sein, ihre Versorgung mit Blutgefäßen selbst zu gewährleisten. Dies würde sonst die Proliferation der Tumorzellen einschränken. Die Angiogenese wird unter anderem durch die Hochregulation von VEGF gewährleistet.
6. Tumorzellen müssen in umliegendes Gewebe einwandern und metastasieren können.

Diese Charakteristika führen auf der einen Seite zur Entkopplung des Zellwachstums von der Umgebung und auf der anderen Seite zur Deregulation des zellulären Energiestoffwechsels. So sind kontinuierliches Zellwachstum und Proliferation möglich und Tumorzellen können Angriffe des Immunsystems verhindern (4).

Diese Eigenschaften beruhen zum einen auf genomischen Instabilitäten und Mutationen und zum anderen auf Entzündungsreaktionen. Dies bezeichneten Hanahan und Weinberg als „*Enabling Hallmarks*“ (5).

1.2 Brustkrebs

1.2.1 Epidemiologie

Brustkrebs, auch als Mammakarzinom bezeichnet, entwickelt sich aus dem weiblichen als auch männlichen Brustgewebe und ist derzeit insgesamt die häufigste Krebserkrankung weltweit sowie die fünfhäufigste Krebstodesursache. Mit 24,9 % ist Brustkrebs auch das häufigste Karzinom bei Frauen und mit 15,5 % weiterhin die häufigste Krebstodesursache der Frau (2). Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken, beträgt etwa 12%, das entspricht jeder achten Frau in Deutschland (6). Wichtige Risikofaktoren sind dabei neben einem erhöhten Lebensalter und ungesunden Lebensstil, endokrine Faktoren, wie ein langer hormonell aktiver Zeitraum, Kinderlosigkeit oder eine späte erste Schwangerschaft (7). Fünf bis 10 % aller Mammakarzinome sind durch bestimmte genetische Prädispositionen bedingt, am häufigsten einer BRCA1/2-Mutation, die das Lebenszeitrisiko auf 45 – 80 % erhöht (6).

1.2.2 Aufbau der Brust

Die weibliche Brust besteht aus zehn bis zwanzig Drüsenlappen (*Lobi glandulae mammariae*), die jeweils wiederum aus zahlreichen Drüsenläppchen (*Lobuli glandulae mammariae*) bestehen. Die Milchgangsysteme der Lobuli vereinigen sich zu einem

Hauptmilchgang (*Ductus lactifer colligens*) pro Lobus, der jeweils in die Mamille mündet. Zwischen den einzelnen Lobi liegen Binde- und Fettgewebe. Die Drüsenendstücke der *Lobuli glandulae mammariae* dienen der Milchproduktion und bestehen aus apokrinen Drüsenepithelzellen und darum liegenden Myoepithelzellen. Das Milchgangsystem transportiert die Muttermilch von ihrem Produktionsort bis zur Mündung in der Mamille. Vor dieser Einmündung erweitern sich die Hauptmilchgänge zum *Sinus lactifer*. Histologisch ist das Lumen des Milchgangsystems von prismatischen Epithelzellen ausgekleidet. Myoepithelzellen gewährleisten den Transport des Sekrets. 70 % des Lymphabflusses der Mamma erfolgt über die axillären Lymphknoten. Deshalb haben die Lymphknoten der Axilla eine wichtige klinische Relevanz bezogen auf die Prognose und Metastasierung des Mammakarzinoms (8,9).

1.2.3 Histologische Klassifikation

Histologisch unterscheidet man verschiedene Typen von Brustkrebs, je nachdem aus welchem Gewebe der Brust die entarteten Zellen hervorgehen. Insgesamt wird zwischen duktalen, lobulären, medullären, muzinösen, adenoid zystischen, inflammatorischen und tubulären Karzinomen unterschieden (10). Am häufigsten mit 70-80 % ist das invasive Adenokarzinom ohne speziellen Typ (ehemals *invasiv duktales Karzinom nicht anders spezifiziert*), das vom Milchgangsepithel ausgeht. Das invasive Karzinom mit speziellem Typ (ehemals *invasiv-lobuläres Karzinom*) liegt in etwa 10 % der Brustkrebsdiagnosen vor und entsteht in den Milchdrüsenläppchen (11). Für beide Formen ist als Vorläuferläsion ein intraepithelial wachsendes *in-situ*-Karzinom bekannt (DCIS: duktales Karzinom *in situ*; LCIS: lobuläres Karzinom *in situ*). Tumore in der Brust treten in über der Hälfte der Fälle im oberen äußeren Quadranten auf (10,12).

Das histopathologische *Grading* nach Elston und Ellis legt Dignitätskriterien fest, durch die unterschiedliche Differenzierungen und Malignitätsgrade der Brusttumoren kategorisiert werden. Die Klassifizierung erfolgt durch bestimmte Kriterien: das Ausmaß der Kernpolymorphien sowie der Anteil tubulärer Strukturen und Mitosen. Invasive Mammakarzinome können so von G1: gut differenziert mit geringem Malignitätsgrad, bis G3: schlecht differenziert mit hohem Malignitätsgrad kategorisiert werden. Das ist wichtig für die Therapieentscheidungen, insbesondere darüber, ob eine neoadjuvante Therapie in Form von Radio- und/oder Chemotherapie erfolgen soll (13,14).

Im Rahmen der TNM-Klassifikation von Mammakarzinomen erfolgt die Beurteilung anhand der Größe des Primärtumors (T) und der Ausbreitung im Sinne des Lymphknotenbefalls (N) und der Metastasierung (M) (15).

Tabelle 1 TNM-Klassifikation nach Brierley et al. 2016.

TNM	Tumorausbreitung
T	Tis: *Carcinoma in situ* T1: Tumorgröße < 2 cm T2: Tumorgröße > 2 cm und < 5 cm T3: Tumorgröße > 5 cm T4: Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut oder Brustwand
N	N0: kein Lymphknotenbefall N1: Befall beweglicher axillärer Lymphknoten Level I-II N2: Befall fixierter axillärer Lymphknoten Level I-II oder isolierter Befall ipsilateraler Lymphknoten der *A. mammaria interna* N3: Befall supra- oder infraklavikulärer Lymphknoten Level III, Befall von axillären und Mammaria-interna-Lymphknoten
M	M0: keine Fernmetastasen M1: Fernmetastasen, auch nicht regionale Lymphknoten

Zusammengefasst wird dies in der Klassifikation nach UICC (*Union for International Cancer Control*) und AJCC (*American Joint Commission on Cancer*), anhand derer sich die Therapieempfehlungen ausrichten (15,16).

Tabelle 2 Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC und AJCC.

UICC/AJCC-Stadium		TNM-Klassifikation
0		Tis, N0, M0
I	IA	T1, N0, M0

UICC/AJCC-Stadium		TNM-Klassifikation
	IB	T0-T1, N1, M0
II	IIA	T0-T1, N1, M0 T2, N0, M0
	IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
III	IIIA	T0-T2, N2, M0 T3, N1-N2, M0
	IIIB	T4, N0-N2, M0
	IIIC	Jedes T, N3, M0
IV		Jedes T, jedes N, M1

1.2.4 Tumorbiologische Klassifikation

Mammakarzinome können tumorbiologisch auf das Vorhandensein verschiedener Rezeptoren untersucht und so in molekulare Subtypen unterteilt werden. Man unterscheidet dabei zwischen Östrogen- (ER-) / Progesteron- (PR-) rezeptor-positiven, HER2/neu-amplifizierten sowie basalartigen (triple-negativen) Tumoren.

Tabelle 3 Tumorbiologische Klassifikation des Mammakarzinoms

Subtyp	ER/PR-Status	HER2-Status	Ki-67-Index
Luminal A	Positiv	Nicht amplifiziert	Niedrig
Luminal B	Positiv	Nicht amplifiziert	Hoch
HER2-amplifiziert	Negativ	Amplifiziert	Jeder Wert
Basalartig	Negativ	Nicht amplifiziert	Jeder Wert

Der ER- und PR-Status wird immunhistochemisch bestimmt. Tumore mit mehr als 1 % ER- bzw. PR-positiven Zellen gelten als Hormonrezeptor-positive Karzinome. Diese kommen in bis zu 80 % aller Mammakarzinom-Patientinnen vor und sind assoziiert mit einem guten

Ansprechen auf endokrine Therapien. Hormonrezeptor-positive Karzinome werden anhand des Ki-67-Proliferationsindex in Luminal A (niedriger Index) und Luminal B (hoher Index) weiter unterteilt. Ein hoher Ki-67-Proliferationsindex spricht für ein schnelles Tumorwachstum und somit fortschreitende Progression des Tumors (17,18).

Darüber hinaus wird regelhaft der HER2/neu-Status eines Tumors bestimmt. HER2/neu gehört zu den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor). Er fördert somit die Zellproliferation und hemmt die Apoptose der Zelle. Diese Mammakarzinome weisen eine Überexpression von HER2 oder eine Amplifikation des entsprechenden *ERBB2*-Gens auf. Therapeutisch ist ein amplifizierter HER2/neu-Status mit gutem Ansprechen auf eine Antikörpertherapie und auf Chemotherapeutika wie Anthracycline und Taxane assoziiert. Endokrine Therapien sind hierbei allerdings wenig erfolgsversprechend (17,18).

Das basalartige Mammakarzinom ist definiert als ER-negativ, PR-negativ sowie HER2/neu-negativ und wir daher auch als triple-negativ bezeichnet. Das Fehlen aller tumorbiologischen Marker ist mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert. Darüber hinaus lässt es sich nur eingeschränkt therapieren, da kein gezielter Angriffspunkt vorliegt und als systemische Therapie hauptsächlich eine Chemotherapie eingesetzt werden kann (17,18).

1.2.5 Therapien des Mammakarzinoms

Die operative Entfernung des Tumors spielt in der primären Therapie des Mammakarzinoms die bedeutendste Rolle. Hier kann bei einem begrenzten Befund brusterhaltend operiert werden. Daneben sind je nach Befund die Strahlen- und/oder systemische Therapie mit Chemotherapie, Antihormon- und Antikörpertherapie von hoher Wichtigkeit. Das gewählte Therapieprinzip ist hier von der Tumorbiologie und individuellen Risikofaktoren der Patientin abhängig (16).

1.2.5.1 Endokrine Therapie

Bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Hormonrezeptor-positiven Karzinomen kommt eine endokrine Therapie zum Einsatz. Ist aufgrund starker Risikofaktoren zusätzlich eine Chemotherapie erforderlich, erfolgt die Antihormontherapie im Anschluss daran. Die Therapiedauer beträgt in der Regel mindestens fünf Jahre. Zur Supprimierung des Hormonspiegels existieren verschiedene Therapeutika, darunter selektive Östrogenrezeptor-

Modulatoren (SERMs), selektive Östrogenrezeptor-Degradierer (SERDs) sowie Aromatase-Inhibitoren (AI) und GnRH-Analoga.

Bei prämenopausalen Patientinnen ist der SERM Tamoxifen das Mittel der ersten Wahl, alternativ kann der SERD Fulvestrant eingesetzt werden. Beide wirken antagonistisch an Östrogenrezeptoren des Brustgewebes. Zusätzlich zur Blockade der ER ist eine Blockade der Östrogenproduktion in den Ovarien möglich. Dafür werden GnRH-Analoga wie Buserelin oder Goserelin eingesetzt, die zur Ovarsuppression führen. Alternativ kann auch eine operative bilaterale Adnexektomie erfolgen.

In der Postmenopause muss die Suppression der Hormonproduktion extraovariell erfolgen oder gegebenenfalls zusätzlich ER blockiert werden. Dazu werden primär AIs wie Anastrozol, Letrozol oder Exemestan eingesetzt, die die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen blockieren. Zusätzlich ist eine Kombination mit dem SERM Tamoxifen möglich (16–18).

1.2.5.2 Antikörpertherapie

Eine Antikörpertherapie wird bei HER2/neu-amplifizierten Karzinomen, außer bei sehr kleinen Tumoren, in Kombination mit einer Chemotherapie angewendet. Am häufigsten wird Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper gegen HER2 eingesetzt. So gelingt eine spezifische Blockade der überexprimierten Rezeptoren. Auch Pertuzumab ist ein solcher monoklonaler Antikörper, der beim metastasierten Mammakarzinom in Kombination mit Trastuzumab eingesetzt wird. Bei progredientem, fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom trotz vorangegangener Chemo- und Trastuzumab-Therapie ist außerdem der EGFR/HER2-Rezeptorinhibitor Lapatinib zugelassen (16–18).

1.3 Metastasierung

Fortgeschrittene Krebserkrankungen in metastasierten Stadien sind für ca. 90 % der Krebs-assoziierten Todesfälle verantwortlich (19). Die Metastasierung verläuft in einem Prozess, bestehend aus Invasion, Intra- sowie Extravasation und wird daher auch als Metastasierungskaskade bezeichnet. Zunächst gelangen Zellen des Primärtumors in das umliegende Gewebe (Invasion). Sie erreichen das zirkulatorische System, indem sie Gefäßwände durchbrechen (Intravasation) und können nun an anderen Stellen im Körper die

Blutgefäße verlassen und dort ins Gewebe eindringen (Extravasation). Dort können sie Mikrometastasen bis hin zu klinisch detektierbaren Metastasen ausbilden (19–21).

Tumorzellen können direkt oder über das Lymphsystem in Blutgefäße einwandern (22) und werden dann als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet. CTCs gelangen als einzelne Zellen oder in Form von zusammenhängenden Clustern an Primarius-ferne Stellen des Körpers (23,24). Da CTCs in den meisten Fällen nur für einen sehr kurzen Zeitraum im Blutgefäßsystem überleben, ist die Wahrscheinlichkeit minimal, dass eine einzelne CTC für die Bildung einer Metastase verantwortlich ist (25). CTCs sind diversen Faktoren ausgesetzt, die ihre Überlebenszeit beeinflussen. So führt der Verlust der Zell-Matrix-Interaktion zum programmierten Zelltod, was als Anoikis bezeichnet wird. In Blutgefäßen herrschen sowohl hydrodynamische Kräfte als auch Scherkräfte und das Immunsystem versucht die CTCs zu bekämpfen (26). Aus diesen Gründen interagieren die Tumorzellen mit anderen Zellen des Blutgefäßsystems, wie Neutrophilen und Monozyten aber auch Thrombozyten und endothelialen Zellen. Insgesamt sorgt diese Interaktion vor allem dafür, dass CTCs nicht vom Immunsystem erkannt und vernichtet werden (27–31). Außerdem können Thrombozyten, Neutrophile und Monozyten die Fähigkeit der Tumorzellen zur Bildung von Metastasen positiv beeinflussen, indem sie die EMT stabilisieren und zur Extravasation der CTCs beitragen (32,33).

Die Metastasierung bei Mammakarzinomen erfolgt sowohl lymphogen als auch hämatogen. Dabei betreffen lymphogene Metastasen vor allem die Lymphknoten der Axilla und diese entlang der *A. mammaria interna*. Typische Orte für eine hämatogene Metastasierung sind vor allem Knochen, Lunge, Gehirn und Leber (9). Ein erhöhtes Risiko zur Metastasierung liegt dann vor, wenn Lymphknoten bereits befallen sind, die Größe des Primärtumors fortgeschritten ist, eine aggressive Tumorbiologie (HER2-amplifiziert oder triple-negativ) vorliegt oder wenn klinische Symptome darauf hindeuten (34).

1.3.1 Epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) spielt eine wichtige Rolle beim Prozess der Metastasierung. EMT ist ein Vorgang, bei dem Zellen ihre epithelialen Eigenschaften teilweise verlieren und im Verlauf mesenchymale Charakteristiken aufweisen. So entstehen Zellen, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Eigenschaften besitzen, die sich in einem dynamischen Übergang befinden (35–37). Statt EpCAM, E-Cadherin und Keratinen, die für epithelialen Ursprung typisch sind, lassen sich stattdessen mesenchymale Marker auf

den Oberflächen der Zellen nachweisen (38–40). Auslöser und Induktoren für EMT können parakrine Signale von TGF-β, WNT, Interleukin-6 oder dem *Platelet-derived Growth Factor*, aber auch Nikotin, Alkohol sowie ultraviolettes Licht sein (41). Im Zielgewebe nehmen Zellen wieder ihren epithelialen Phänotyp an, um dort einen stabilen Zellverband zu bilden. Dieser Prozess wird als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet (41).

CTCs sind Beispiele für Zellen, die durch EMT häufig sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker aufweisen (42). EMT scheint aber ein dynamischer Prozess zu sein, der reversibel ist und durch epigenetische Mechanismen reguliert wird (43). Durch EMT erlangen Tumorzellen bestimmte Fähigkeiten: der Verlust der Adhäsion, eine gesteigerte Motilität und Invasivität, die Möglichkeit zur Degradierung von Komponenten der EZM (38,44,45) sowie eine gesteigerte Fähigkeit zur Tumorinitiation, -progression und Metastasierung (46–48). Karzinomzellen, die nun einen eher mesenchymalen Charakter besitzen, zeigen außerdem eine gesteigerte Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapien (49,50).

1.4 EpCAM

Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül (EpCAM) wurde 1979 entdeckt und wird von epithelialen Zellen, so auch Karzinomzellen, exprimiert (51,52). Das Protein ist unter verschiedenen Synonymen bekannt: VU1D9, Trop-1, HEA125, 17-1A, ESA, KSA oder GA733-2 (52).

EpCAM ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, das als Epithel-spezifisches Zelladhäsionsmolekül fungiert und dabei mit Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakten interferiert (53,54). Es besteht aus einer großen extrazellulären Domäne mit einer epidermalen Wachstumsfaktor- sowie einer Thyreoglobulin-Domäne. Die Transmembran- und intrazellulären Domänen bestehen aus weitaus weniger Aminosäuren (52,55). Auf den Oberflächen von Zellen spielen zwei Mechanismen eine Rolle: EpCAM als Zelladhäsionsmolekül sowie als Rezeptor, der an zellulären Prozessen wie der Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen beteiligt ist (56,57). Die Aktivierung von EpCAM erfolgt durch Zell-Zell-Kontakte (56,58).

In menschlichen Zellen wird EpCAM regelhaft von Zellen epithelialen Gewebes oder Krebszellen mit epithelialem Ursprung exprimiert, nicht aber von Zellen des peripheren Blutes (53,55). Bei normalen epithelialen Zellen wird EpCAM in interzellulären Lücken exprimiert. Bei Karzinomzellen lässt sich eine deutlich homogenere Verteilung von EpCAM auf den Zelloberflächen feststellen, sodass es zugänglicher für die Bindung von Antikörpern ist (58,59). Außerdem zeigen epitheliale Krebszellen eine starke Überexpression von EpCAM, verglichen zu normalen Zellen, so zum Bespiel auf Brustkrebs-Zellen (53). In verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien wurde festgestellt, dass eine Herunterregulierung von EpCAM mit einer verminderten Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen einherging. EpCAM könnte also ein wichtiger Mediator dieser Tumor-fördernden Prozesse sein (58). Daher hat es sich als primäres Antigen zur Anreicherung von CTCs etabliert (60).

Es wurde beschrieben, dass Krebszellen mit einem mesenchymalen Phänotyp, die durch EMT getriggert wurden, durch EpCAM-abhängige Methoden nicht angereichert werden können (61,62). Es gibt verschiedene Mechanismen, die zur Herunterregulierung von EpCAM in Tumorzellen führen: durch TNF-α (63) oder Zytokine (64) sowie durch die Hypermethylierung des EpCAM-Promotorgens (65) und EMT (66). Diese Gründe machen die Notwendigkeit deutlich, Tumorzellen unabhängig ihrer EpCAM-Expression anzureichern, um effizient und spezifisch auch EpCAM-negative bzw. -gering exprimierende Subpopulationen analysieren zu können.

1.5 Trop-2

Trop-2 (*Trophoblast cell surface antigen 2*), auch als TACSTD2, GA733-1 oder EPG-1 bezeichnet, ist ebenso wie EpCAM ein glykosyliertes Transmembranprotein. Der Name stammt daher, dass es als erstes auf normalen und malignen Trophoblasten entdeckt wurde (67–70). Im Menschen wird es durch das *TACSTD2*-Gen kodiert (71). Trop-2 wird von der gleichen Genfamilie kodiert wie EpCAM, sodass die Gen-Sequenzen zu 49 % miteinander übereinstimmen (72). Es besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne sowie einem kurzen intrazellulären bzw. zytoplasmatischen Ende (69,73,74). Es fungiert dadurch als Calcium-Signaltransduktor (70,73). Über die Aktivierung verschiedener Signalwege, wie NF-κB, MAPK oder ERK1/2, erfolgt eine Progression des Zellzyklus (75,76). Darüber werden wiederum Tumor-fördernde Prozesse initiiert. Außerdem konnte Trop-2 auch auf Stammzellen diverser Gewebe sowie auf

Basalzellen nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass Trop-2 an der Regeneration und Selbsterneuerung von Stammzellen und Geweben beteiligt ist und eine Rolle in der Zellproliferation spielt (77,78).

Eine Überexpression von Trop-2 in diversen epithelialen Tumoren wurde bereits in mehreren Studien belegt (79,80). Auf normalen Zellen ist Trop-2 lediglich zu sehr geringen Anteilen zu finden. Trop-2 ist an der Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt (76,81,82). Shvartsur *et al.* zeigten, dass eine Trop-2-Überexpression mit einer schlechteren Prognose sowie höherem Risiko der Metastasierung bei Brustkrebs und anderen Karzinomen asssoziiert ist (80). Deshalb könnte Trop-2 als prognostischer Marker für das *Outcome* der Patienten und als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt in der Behandlung solider Tumoren in Frage kommen (79). Das Vorhandensein einer extra- als auch intrazellulären Domäne würde eine Immun- oder Antikörpertherapie mit zytotoxischen Therapeutika möglich machen. Dies ist für verschiedene Tumoren, so auch für das metastasierte Mammakarzinom (83), Gegenstand der aktuellen Forschung. Sacituzumab Govetecan ist eine gegen Trop-2 zielgerichtete Immuntherapie, die kürzlich zur Behandlung bei triple negativem Mammakarzinom zugelassen wurde (84). Durch die Behandlung konnte bereits eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien sowie Gesamtüberleben der Patienten, verglichen mit der alleinigen Chemotherapie, nachgewiesen werden (85).

Ebenso konnte aufgezeigt werden, dass CTCs Trop-2 exprimieren können, auch wenn kein Nachweis von EpCAM möglich ist (86). Ebenso scheint das Ansprechen auf eine Tumortherapie mit der Quantität von Trop-2 auf den Tumorzelloberflächen in Verbindung zu stehen (87). So könnte es möglich sein, über die Trop-2-Bestimmung auf CTCs, den Erfolg der etablierten Therapie zu überwachen.

1.6 CD49f

Integrine sind Transmembranrezeptoren und dienen der Signalübertragung zwischen Zellen und der Kommunikation mit der EZM (88,89). Sie sind Heterodimere und bestehen aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit, die unterschiedlich miteinander interagieren und so eine Signalweiterleitung intra- und interzellulär herbeiführen. Die unterschiedliche Kombination der Untereinheiten ermöglicht eine spezifische Affinität zu bestimmten Bestandteilen der

extrazellulären Matrix, wie Lamininen oder Kollagenen (90). Die Aktivierung von Integrinen führt zur Initiation von Signaltransduktionen, die wiederum Prozesse wie die Zelldifferenzierung, Genexpression, Proliferation, Zellmigration oder Apoptose der Zellen zur Folge haben (90,91).

Das Oberflächenprotein CD49f, auch als Integrin α6 bezeichnet, zählt zu den Integrinen und ist somit ein Zelladhäsionsmolekül. Im Menschen wird es durch das *ITGA6*-Gen kodiert. Integrin α6 kann in den Isoformen α6A oder α6B vorliegen, die durch alternatives *Splicen* entstehen (92,93). Das Signal, das von der CD49f-Aktivierung ausgeht, ist abhängig von der jeweiligen Beta-Kette, die als Heterodimer bindet und dem Liganden, der die Aktivierung induziert (94,95).

CD49f ist der einzige Biomarker, der in mehr als 30 verschiedenen Populationen von pluripotenten und multipotenten Stammzellen, ebenso wie Tumorstammzellen und verschieden somatischen Zellen gefunden wurde (96,97). Dies impliziert, dass CD49f eine wichtige Rolle im Rahmen der Selbsterneuerung von Tumorstammzellen spielen könnte (98). Es konnte bereits belegt werden, dass CD49f von Brustkrebs-Stammzellen exprimiert wird, wobei festgestellt wurde, dass die α6B-Isoform dafür spezifischer ist (94,99–101). Solche Tumorzellen zeigen eine höhere Kapazität, Mammosphären zu bilden und zur Tumorentstehung beizutragen (98). Antikörper gegen CD49f könnten also zur Detektion von Brustkrebszellen mit mesenchymalem Phänotyp eingesetzt werden (102)

Die Überexpression von CD49f ist beim Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert (103). Der ESPR1-Splicingfaktor ist der Schlüsselregulator für die Produktion der α6A-Isoform und unterdrückt gleichzeitig die Bildung von α6B. Interessant ist nun, dass die VEGF-Signalübertragung die Entstehung von triple-negativem Brustkrebs durch die Unterdrückung von ESPR1 initiiert und folglich gleichzeitig auch zur Induktion der α6B-Expression führt (94,101).

1.7 Zirkulierende Tumorzellen

Thomas Ashworth beschrieb bereits im Jahr 1869 das Auftreten von CTCs. Während einer Autopsie fand er Tumor-ähnliche Zellen im Blut an verschiedenen Stellen des Körpers (104). Obwohl täglich 3-4x10^6 Tumorzellen von einem Gramm Tumorgewebe in die periphere

Blutbahn abgegeben werden, ist der Nachweis von CTCs ein sehr seltenes Ereignis (105). Es scheint nur möglich zu sein, einen sehr geringen Anteil der Tumorzellen nachzuweisen, sodass man davon ausgeht, dass die meisten Tumorzellen in Apoptose gehen, sobald sie den Primarius verlassen. Selbst in metastasierten Patientinnen finden sich meist nur wenige CTCs; in nicht-metastasierten Patientinnen sind CTCs noch weitaus seltener (106,107). Außerdem liegen Tumorzellen im peripheren Blut vor einem Hintergrund einer sehr großen Anzahl mononukleärer Zellen (1 CTC pro 10^6–10^7 PBMCs) vor, was die Suche nach CTCs zusätzlich deutlich erschwert (60,108,109).
Die geringe Frequenz und Heterogenität der CTCs machen es heutzutage weiterhin schwierig, diese zu detektieren um sie im Anschluss analysieren zu können. Deshalb sind sensitive und spezifische Methoden zur Detektion, Isolation und molekularen Charakterisierung notwendig (60,108–111).

Anhand ihrer EpCAM-Expression werden CTCs in EpCAM-positive sowie EpCAM-gering exprimierende bzw. -negative Tumorzellen unterschieden. Da der Goldstandard zur Anreicherung von CTCs über die EpCAM-Expression verläuft, sind über die EpCAM-positive Subpopulation bereits deutlich mehr Informationen bekannt. Der Nachweis dieser Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Brust-, Kolorektal- und Prostatakarzinomen ist mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert (112–114).

Es gibt Krebstypen, die EpCAM nur gering oder gar nicht exprimieren (115). Mego *et al.* beschrieben, dass der CellSearch in 36% der metastasierten Brustkrebspatientinnen keine CTCs detektieren konnte. Diese Patientinnen zeigten allerdings ein gehäuftes Auftreten von Knochen- und Hirnmetastasen und eine schlechtere Gesamtprognose (116). Ebenso ist es nicht möglich, mit dem CellSearch EpCAM-negative Brustkrebszelllinien effizient anzureichern. Deshalb sind hoch sensitive und spezifische Anreicherungsverfahren notwendig, die nicht zwischen einzelnen Subpopulation von CTCs diskriminieren. Nur so ist es möglich, die wahre Anzahl an CTCs in einer Probe zu bestimmen (117). Dazu muss von der standardisierten Methode basierend auf der Expression von EpCAM abgewichen werden und eine unabhängige Methode etabliert werden (60,118–120).

Die Eigenschaften und prognostische Relevanz EpCAM-negativer CTCs ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Trotzdem wurde in einigen Studien bereits beschrieben, dass CTCs durch EMT ihre epithelialen Marker verlieren und so eine geringe bis keine Expression von EpCAM aufweisen. In diesen Zellen liegen eine Vielzahl von Genen vor, die mit der

Induktion von EMT assoziiert sind, wodurch sie eher mesenchymale Eigenschaften annehmen (55). Dies könnte mit einer Krankheitsprogression und Metastasierung beim Mammakarzinom korreliert sein (112). In mehreren Studien konnten bereits hoch aggressive und invasive Eigenschaften der EpCAM-negativen CTCs belegt werden. Studien deuten darauf hin, dass sie mit einem vermehrten Auftreten von Hirnmetastasen (116), einer schnell fortschreitenden Krankheitsprogression (121) sowie einer schlechten Prognose (42) assoziiert sind und möglicherweise einen Zugewinn an Informationen über die Evolution der Erkrankung erlauben (122).

Die weitere Erforschung aller Subtypen von CTCs, unabhängig ihrer EpCAM-Expression, ist von entscheidender Wichtigkeit, da die oben genannten Studien ein erhöhtes invasives Potential zeigten und so Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf ermöglicht werden könnten (42,123).

1.7.1 Anreicherungsverfahren zirkulierender Tumorzellen

CTCs werden in einem zweistufigen Prozess, bestehend aus Anreicherung und Identifikation, detektiert. Die verwendeten Methoden sollten eine möglichst hohe Zahl an CTCs finden und die Anzahl der falsch positiven Ereignisse auf einem Minimum halten (124). Außerdem müssen die Anreicherungsstrategien verlässlich und reproduzierbar sein (125). CTCs können grundsätzlich durch drei verschiedene Methoden angereichert werden: anhand der Expression bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche, anhand physikalischer Eigenschaften oder anhand ihrer Funktionalität (126).

1.7.1.1 Anreicherungsverfahren EpCAM-positiver CTCs

Die meisten Anreicherungsverfahren verwenden Antikörper, die gegen EpCAM gerichtet sind. Das bekannteste und in der Mehrzahl verwendete Produkt ist das CellSearch-System, welches lange Zeit als einziges Anreicherungsverfahren für CTCs von der FDA anerkannt war und daher als Goldstandard bezeichnet werden kann. Dabei werden EpCAM-Antikörper verwendet, die an Ferrofluid-Partikeln gekoppelt sind und an epitheliale Zellen in einem Standardvolumen von 7,5 ml Blut binden. Die gebundenen Zellen werden anschließend mit Hilfe eines Magneten angereichert (108,112,127). Auch andere Technologien setzen EpCAM-spezifische Antikörper zur Anreicherung von CTCs ein, wie beispielsweise der AdnaTest oder der IsoFlux, die beide mit magnetischen Beads arbeiten (128,129).

1.7.1.2 EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs

Methoden zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von CTCs können in zwei große Kategorien unterteilt werden. Marker-abgängige Methoden setzen Antikörper gegen Proteine ein, die auf den Oberflächen der CTCs exprimiert werden (86,119,130,131). Auf der anderen Seite gibt es Marker-unabhängige Techniken, die CTCs aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften oder Funktionalitäten anreichern (39,126). Alternative Anreicherungsverfahren befinden sich teilweise noch in experimentellen Stadien oder klinischer Erprobung.

Im Rahmen der Marker-abhängigen Anreicherungsmethoden wird zwischen einer positiven und negativen Selektion unterschieden. Die negative Selektion basiert auf der Abreicherung der mononukleären Zellen im Blut. Das RosetteSep nutzt gegen CD45 gerichtete Antikörper, um Leukozyten abzureichern (125). Die positive Selektion versteht die gezielte Anreicherung der Tumorzellen mit spezifischen Markern. Ebenso wie bei der Anreicherung mittels EpCAM, müssen Antigene auf den Oberflächen der CTCs definiert werden, die eine Anreicherung der Zellen über spezifische Antikörper erlaubt (125). Die Kombination von verschiedenen Antikörpern kann die Wiederfindungsrate von Tumorzellen erhöhen (132). Die gewählten Proteine sollten dabei in der Lage sein, die gesamte CTC-Population anzureichern (86,133). Schneck *et al.* konnten EpCAM-negative und CK-positive CTCs durch Hyal, CD44, CD49f, CD146, CK8, ADAM8, c-MET/HGFR und Trop-2 aus Mammakarzinom-Patientinnen anreichern. Dabei konnten erfolgsversprechende Ergebnisse für Trop-2 und CD49f gezeigt werden. Hier zeigten sich Wiederfindungsraten von 80 % und es konnten durchschnittlich mehr als zwei CTCs pro Probe isoliert werden (86).

Die Anreicherung anhand physikalischer Eigenschaften basiert auf einem größeren Durchmesser und einer geringeren Verformbarkeit von Tumorzellen verglichen mit Zellen im Blut. Die durchschnittliche Größe von Brustkrebs-CTCs liegt bei 13,1 µm, die Größe der üblichen Blutzellen liegt deutlich darunter (134,135). Die größenbasierte Anreicherung kann allerdings durch die unterschiedlichen Deformierbarkeiten der Zellen beeinflusst werden (134). Systeme wie ISET- oder ScreenCell-System basieren auf einer Membran (136,137), bei dem Parsortix System, das mittlerweile ebenfalls zur Anreicherung von CTCs von der FDA zugelassen wurde, handelt es sich um mikrofluidische Chips oder Kassetten (138,139). Franken *et al.* konnten das Parsortix System auch zur Anreicherung EpCAM-negativer

Subpopulationen erfolgreich etablieren. Verglichen mit dem CellSearch-System wurden teilweise sogar höhere Wiederfindungsraten erzielt (0,2-fach bis 4-fach) (140).

Bei der Anreicherung anhand der Funktionalität der CTCs werden Matrix beschichtete Oberflächen eingesetzt, wobei im Blut enthaltene CTCs an Matrixproteine binden. Dabei wird auf Mechanismen zurückgegriffen, die es Tumorzellen auch ermöglichen in umgebendes Gewebe einzuwandern (141).

1.7.2 Identifikation von zirkulierenden Tumorzellen

Die Identifikation von CTCs erfolgt zumeist anhand einer Kombination aus morphologischen Kriterien und Immunfluoreszenz-Färbung. Das CellSearch-System klassifiziert Zellen als CTCs, die mindestens 4 µm groß sind, CK-positiv sind (Färbung für Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 und 19) und einen Nukleus zeigen, der sich mit DAPI anfärben lässt. Außerdem müssen die Zellen CD45-negativ sein und mindestens 50 % des Nukleus muss von Zytokeratin umschlossen sein (108,127). Auf mRNA-Ebene kann die Indentifikation von CTCs durch tumorassoziierte Transkripte wie *EpCAM* oder *ERBB2*, sowie Stammzell- oder EMT-assoziierten Markern erfolgen (142,143).

1.7.3 Prognostischer Nutzen von CTCs

In zahlreichen Studien konnte der prognostische Nutzen der CTC-Bestimmung herausgestellt werden. Diese basierten allerdings zumeist auf der Analyse EpCAM-positiver CTCs, sodass deren prognostische Relevanz bereits belegt wurde. Auch wenn sich für EpCAM-negative CTCs ähnliche Tendenzen zeigen, konnte dies noch nicht abschließend geklärt werden. Bulfoni *et al.* konnten allerdings die signifikante Korrelation von CTCs mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Markern hinsichtlich eines geringeren progressionsfreien Überlebens (p=0,016) und Gesamtüberlebens (p=0,022/0,0016) zeigen. Das Vorliegen von ausschließlich mesenchymalen Zellen war jedoch mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert (144).

Zhang *et al.* beschrieben, dass CTCs im frühen Stadium des Mammakarzinoms einen prognostischen Nutzen bezüglich des Gesamtüberlebens sowie des krankheitsfreien Überlebens besitzen (145). In 10 bis 60 % der Erstdiagnosen eines nicht-metastasierten Mammakarzinoms konnten bereits CTCs nachgewiesen werden (146–148). Diese sind möglicherweise in der Lage, die Krebstherapie zu überleben und so auch Monate bis Jahre nach der Diagnose Metastasen zu bilden (20 – 30 % dieser Patientinnen entwickelten ein

metastasiertes Stadium) (149). Das Vorliegen von CTCs scheint dabei unabhängig von Tumorstadium, Histopathologie, Lymphknotenstatus und Ki-67 Proliferationsindex zu sein (150,151).

In der neoadjuvanten Situation des nicht-metastasierten Mammakarzinoms korrelierte die Detektion von CTCs mit einem reduzierten Gesamtüberleben und einem verringerten metastasenfreien Überleben (152). In der adjuvanten Situation war bereits die Detektion einer einzelnen CTC mittels CellSearch mit einem reduzierten progressions- und metastasenfreien Überleben sowie einem reduzierten Gesamt- und Brustkrebs-spezifischen Überleben assoziiert (153). Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigten in 40 bis 80 % der Fälle CTCs im peripheren Blut (154). Dabei korrelierte ein hoher Wert an CTCs mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben sowie einem reduzierten Gesamtüberleben. Der Cutoff lag dabei bei 5 CTCs pro 7,5 ml Blut in der Anreicherung im CellSearch (155). Ebenso hatten Patientinnen mit einer hohen Ausgangs-CTC-Zahl und gesunkener Anzahl nach Chemotherapie eine signifikant bessere Prognose als Patientinnen, deren CTC-Zahl konstant blieb; sie hatten sogar eine vergleichbare Prognose wie Patientinnen mit geringer Ausgangs-CTC-Zahl (112).

Andererseits stellten De Wit *et al.* in einer Studie von metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen heraus, dass die Anzahl an EpCAM-gering exprimierenden CTCs nicht mit dem Gesamtüberleben assoziiert ist. (156).

1.7.4 Prädiktiver Nutzen von CTCs

Aktuell wird in verschiedenen klinischen Studien der prädiktive Nutzen von CTCs untersucht. Der prädiktive Nutzen bezeichnet dabei die Anpassung von Therapieoptionen aufgrund bestimmter Charakteristiken der CTCs. Das wäre vor allem interessant, wenn die Eigenschaften der CTCs von denen des Primärtumors abweichen. Eine solche Entwicklung kann besonders in einer metastasierten Situation entstehen, wenn es zu dynamischen phänotypischen Veränderungen der systemischen Erkrankung kommt (157–160). Eine abschließende Beurteilung bezüglich des prädiktiven Wertes von CTCs konnte bisher noch nicht erfolgen. Ergebnisse mehrere Phase III-Studien bei Brustkrebs deuten jedoch darauf hin, dass CTCs einen klinischen Nutzen aufweisen.

In der STIC CTC Studie (NCT01710605) wurde der klinische Nutzen der Ausgangs-CTC-Zahl in der Erstlinientherapie bei Patientinnen mit metastasiertem ER-positiven

Mammakarzinom untersucht. Der Entscheid über eine endokrine Therapie oder Chemotherapie wurde entweder vom Arzt oder durch die Anzahl der CTCs bestimmt. Bei niedrigen CTC-Zahlen erhielten die Patientinnen eine endokrine Therapie; bei hoher CTC-Zahl wurden sie mit Chemotherapie behandelt. Patentinnen, welche aufgrund der CTC-Zahl eine Chemotherapie erhielten, wiesen ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben auf. Beim Wechsel auf eine endokrine Therapie aufgrund der CTC-Zahl lag kein signifikant kürzeres progressionsfreies und Gesamtüberleben vor verglichen mit denen, die eine Chemotherapie durch den Arzt erhielten, trotz niedrigen CTC-Zahlen (161).

Die DETECT-III Studie (NCT01619111) ist eine Phase III-Studie, welche die Wirksamkeit einer anti-HER2-Therapie bei HER2-positiven CTCs jedoch metastasiertem HER2-negativen Primärtumor untersucht. Solche Patientinnen, bei denen HER2-positive CTCs mittels CellSearch nachgewiesen wurden, erhielten zusätzlich zur Standardtherapie den Tyrosinkinaseinhibitor Lapitinib (162). Ein signifikant besseres Gesamtüberleben bei frühzeitigem CTC-Abfall in der ersten Kontrolluntersuchung (42,4 vs. 14,1 Monate; $p = 0,002$) wurde beschrieben, jedoch ohne signifikante Unterschiede in beiden Behandlungsgruppen. Patientinnen, die zusätzlich mit Lapitinib behandelt wurden, hatten ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben (20,5 vs. 9,1 Monate, $p = 0,009$) verglichen mit den Patientinnen, die eine Standardbehandlung erhielten (163).

1.8 Liquid Biopsy

Zielgerichtete Therapien sind mittlerweile die bevorzugten Methoden in der Krebstherapie. Dafür werden allerdings Biopsien von Tumoren und Metastasen benötigt, die invasiv, komplikationsreich und weder häufig noch leicht durchführbar sind (164). Eine Biopsie der Metastase ist zwar in den aktuellen Leitlinien empfohlen, allerdings häufig nicht realisierbar (16). Außerdem ist eine solche Biopsie immer nur eine Momentaufnahme und spiegelt nie die Heterogenität der verschiedenen Subklone eines Tumors wider (165). Das wird besonders relevant, wenn sich das genetische Profil des Tumors aufgrund von erworbenen Resistenzen durch verschiedene Therapien verändert (166).

Der Begriff der *Liquid Biopsy* beschreibt eine Methode, durch die es möglich ist, Informationen über einen Tumor oder Metastasen zu gewinnen, ohne diese direkt biopsieren zu müssen. Damit ließen sich die Schwierigkeiten einer Biospie umgehen (60,111). CTCs

stellen hierbei einen möglichen Marker dar, da sie vom Tumor ins periphere Blut ausgeschwemmt werden und somit schnell und einfach zugänglich sind (39). So könnten Behandlungsschemata auf ihre Wirksamkeit überprüft werden und Therapien anhand der geno- und phänotypsichen Charakteristika der CTCs individuell auf die Patienten angepasst werden. Dies würde einen enormen Vorteil für die Therapien von Krebspatienten bedeuten (111).

Ein solcher Test sollte jedoch zuverlässig und reproduzierbar sein und in der Lage sein, anhand des definierten Markers in zwei Gruppen zu diskriminieren. Außerdem sollte dadurch ein besseres Behandlungsergebnis erreicht werden, was als klinischer Nutzen bezeichnet wird (167). Das CellSearch-System zur Detektion von CTCs bei metastasiertem Brust-, Prostata- oder Kolorektalkarzinom ist ein solches Anreicherungsverfahren (112). So könnte die CTC-Analyse in verschiedenen klinischen Bereichen zum Einsatz kommen: Neben Aussagen über mögliche Metastasierung und damit einem Einfluss auf die Prognose, könnte das Ansprechen auf eine Therapie und die Identifikation möglicher Therapeutika sowie Resistenzmechanismen beurteilt werden und möglicherweise eine Krebsfrüherkennung etabliert werden (117,168).

1.9 Ziele der Arbeit

1.) Etablierung eines EpCAM-unabhängigen *Workflows* zur Anreicherung von Tumorzellen

Einige Subpopulationen der CTCs weisen eine phänotypische Plastizität auf, die unter anderem auf EMT zurückzuführen ist, sodass sie sich durch konventionelle EpCAM-abhängigen Isolationsverfahren nur eingeschränkt detektieren lassen (86). Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf den Ergebnissen von Schneck *et al.* (86), einen *Workflow* zu etablieren, der die EpCAM-unabhängige Anreicherung EpCAM-positiver und -gering exprimierender Tumorzellen erlaubt und die Isolation aller CTC-Subpopulationen ermöglicht. Dazu sollte ein Marker-abhängiges Anreicherungsverfahren, basierend auf Antikörpern gegen Trop-2 und CD49f, entwickelt werden.

2.) Bestimmung der EpCAM-Expressionen auf CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen

Ziel des zweiten Teiles dieser Arbeit war die Untersuchung von CTCs aus metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen, die mit dem im ersten Teil etablierten *Workflow* angereichert wurden. Es sollten die EpCAM-Expressionen der CTCs aus verschiedenen Patientinnen bestimmt und in EpCAM-hoch bzw. -gering exprimierende Tumorzellen klassifiziert werden. Die Analyse der Überlebensdaten sollte Rückschlüsse auf die Zusammenhänge zwischen den EpCAM-Expressionen der CTCs und dem Überleben der jeweiligen Patientin ziehen. Abschließend sollten dadurch weitere Erkenntnisse bezüglich des prognostischen und klinischen Nutzens EpCAM-negativer CTCs ermöglicht werden.

3.) Charakterisierung von EpCAM-hoch bzw. -gering exprimierenden CTCs anhand von drei Index-Patientinnen

Über die Biologie und Evolution EpCAM-negativer CTCs ist bisher wenig bekannt. Eine genetische Charakterisierung könnte Rückschlüsse auf ihre klonale Verwandtschaft zu EpCAM-positiven CTCs erlauben. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte daher die Analyse chromosomaler Aberrationen und Mutationen von EpCAM-hoch und -gering exprimierenden CTCs aus drei Index-Patientinnen sein. Hier sollte die Verwandschaft von EpCAM-negativen und EpCAM-positiven CTCs näher untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 4 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller	Ort
CellCelector	ALS	Jena, Deutschland
Durchflusszytometer Cyan	DAKO	Saint Clara, CA, USA
Inkubator Kelvitron	Heraeus	Hanau, Deutschland
Inkubator GFL 1083	GFL	Burgweel, Deutschland
Ion Torrent Sequenziersystem	k. A.	k. A.
IsoFlux	Fluxion Biosciences	Alameda, USA
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus	Tokyo, Japan
Fluoreszenzmikroskop HAL100	Zeiss	Jena, Deutschland
Mikroskop Leica DM IRB	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
MiSeq-System	Illumina	San Diego, USA
Rotator SB3 Stuart	Thermo Fusher Scientific	Waltham, USA
Schüttler Köttermann 4010	Köttermann	Uetze, Deutschland
Vortexer Reax 2000	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 16R	Thermo Fusher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge Rotofix 32A	Hettich AG	Bäch, Schweiz
Zentrifuge Sprout	Biozym Scienfitic	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2 Chemikalien

Die Lagerung und Anwendung der verwendeten Chemikalien erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 5 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Ort
Biocoll Separating Solution	Merck	Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, USA
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Cell Dissociation Buffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Cell Tracker Green	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, USA
DNAse	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
EDTA	Merck	Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Fluorescence Mounting Medium	DAKO	Saint Clara, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat($MgCl_2$)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natrium Phosphat Puffer	Sigma-Aldrich	Saint Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SigmaAldrich	Saint Louis, USA
NucBlue Live Cell Stain	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Saponin	Sigma-Aldrich	Saint Louis, USA

2.3 Antikörper

Die Lagerung und Anwendung der aufgelisteten primären sowie sekundären Antikörper erfolgte stets nach Herstellerangaben.

Tabelle 6 Verwendete primäre Antikörper

Name	Hersteller	Ort
Anti-Integrin alpha 6 antibody Biotin	Abcam	Cambridge, England
Trop-2 Antibody, anti-human, Biotin	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD45 (35-Z6) AlexaFluor 647	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
CK ALL: Pan Cytokeratin Antikörper Cocktail TRITC	Aczon SRL	Monte San Pietro, Italien
DAPI	Hoffmann-La Roche	Basel, Schweiz
EpCAM (VU1D9) Mouse mAb Alexa Fluor 488	Cell Signalling Technology	Danvers, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control, AlexaFluor 488	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Mouse IgG1, kappa Isotype control	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Normal Mouse IgG1	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Purified Mouse Anti-Human Trop-2	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Rat IgG2a, kappa monoclonal	Abcam	Cambridge, England
Rat IgG2a, kappa monoclonal (Biotin)	Abcam	Cambridge, England
Rat mAb to Integrin alpha 6	Abcam	Cambridge, England

Tabelle 7 Verwendete sekundäre Antikörper

Name	Hersteller	Ort
AlexaFluor 488 anti-mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
AlexaFluor 546 anti-rat IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
AlexaFluor 594 anti-rat IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.4 Kits und Gebrauchsartikel

Alle verwendeten Kits und Gebrauchsartikel wurden nach Herstellerangaben gelagert und angewendet.

Magnetische Beads können über unterschiedliche Strukturen an Proteine, wie Antikörper binden. Epoxy-Beads binden dabei an Amino- und Sulfhydrylgruppen in Proteinen, die auf Antikörpern vorhanden sind. CELLection-Beads hingegen sind mit Streptavidin gekoppelt, was über einen DNA-Linker die Bindung an Biotin-Moleküle auf Antikörpern ermöglicht. Über diese DNA-Verbindung ist außerdem das Ablösen der Beads möglich.

Tabelle 8 Verwendete Kits

Name	Hersteller	Ort
Ampli1 LowPass Kit	Menarini	Florenz, Italien
Ampli1 QC Kit	Menarini	Florenz, Italien
Ampli1 WGA Kit	Menarini	Florenz, Italien
AMPure XP Beads	Beckmann Coulter	Brea, USA
CELLection Biotin Binder Kit	Thermo Fisher Scientific n	Waltham, USA
DynaBeads M-450 Epoxy	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Multiplicom MID Dx Primer	Agilent technologies	Santa Clara, USA

Tabelle 9 Verwendete Gebrauchsartikel

Verbrauchsartikel	Hersteller	Ort
CellSave Tubes	Janssen Diagnostics	Neuss, Deutschland
EDTA Tubes	BD Biosciences	Franklin Lakes,, USA
IsoFlux Cartridges	Fluxion Biosciences	Alameda, USA
Protein LoBind Tubes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
SepMate Tubes	Stemcell Technologies	Vancouver, Kanada

2.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 10 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Binding Buffer (BB)	0,5% BSA 20 mM EDTA PBS
Epoxy Puffer 1 (E1)	Natrium Phosphat Puffer Verdünnung 10% Steriles H_2O
Epoxy Puffer 2 (E2)	0,1% BSA 20 mM EDTA PBS pH 7,4
Epoxy Puffer 3 (E3)	0,6% BSA E1
Puffer 1	0,1 % BSA PBS pH 7,4
Puffer 2	0,1 % BSA 20 mM EDTA PBS pH 7,4
Puffer 3	RPMI 1640 (ohne Phenolrot) MgCl2

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
	CaCl2 1 % FCS pH 7,4

2.6 Zelllinien

Die verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen und regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Die Zelllinie MCF7 wurde aufgrund des epithelialen Charakters in dieser Arbeit als Referenz für epitheliale Tumorzellen gewählt. Die Zelllinie MDA-MB-231 hat die EMT durchlaufen und weist daher mesenchymale Merkmale auf ihrer Oberfläche auf. Sie diente daher als Referenz für Tumorzellen mit mesenchymalen Eigenschaften.

Tabelle 11 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Merkmale
MCF7	Adenokarzinom einer 69-jährigen, kaukasischen Frau ATCC Nummer: HTB-22	ER positiv
MDA-MB-231	Adenokarzinom einer 51-jährigen, kaukasischen Frau ATCC Nummer: HTB-26	EGF positiv TGF-α positiv
SK-BR-3	Adenokarzinom einer 43-jährigen, kaukasischen Frau ATCC Nummer: HTB-30	HER2-amplifiziert
T-47D	Duktales Karzinom einer 54-jährigen Frau ATCC Nummer: HTB-133	ER positiv PR positiv

2.7 Software

Tabelle 12 Verwendete Softwares

Software	Hersteller	Ort
CellCelector Software 3.0	ALS	Jena, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software	San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband	USA
Summit 4.3	DAKO	Saint Clara, USA

3 Methoden

3.1 Methoden der Durchflusszytometrie

3.1.1 Expression von Trop-2 und CD49f auf Zelllinien und PBMCs

Unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie lassen sich die Expressionslevel der Antigene Trop-2 und CD49f auf den Oberflächen von Tumorzellen und auf PBMCs bestimmen. Dabei wird durch quantitative Bestimmung der Oberflächenmoleküle der Anteil der fluoreszenzgefärbten Zellen an der Gesamtzahl der vorhandenen Zellen bestimmt. Die Zellen werden an einem Laser vorbeigeleitet, der die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes anregt. Die Emissionsstärke wird detektiert und unterscheidet sich je nach Menge des gebundenen Antikörpers.

Es werden 50.000 Tumorzellen oder PBMCs, die zuvor mittels Ficoll aufgearbeitet wurden, mit 200 µl PBS + 0,2% BSA für eine Stunde geblockt, um unspezifische Proteininteraktionen auszuschließen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit Primärantikörpern, die gegen Trop-2 bzw. CD49f gerichtet sind. Als Isotypkontrolle für anti-Trop-2 dient ein Maus-IgG1 Antikörper, für anti-CD49f wird ein Ratte-IgG2a Antikörper eingesetzt. Da die Primärantikörper nicht bereits an Sekundärantikörper gebunden sind, erfolgt diese Kopplung in einem weiteren Schritt. Erst dies erlaubt die Detektion und Analyse der Zellen über Fluoreszenzmessungen durch das Durchflusszytometer. Dazu werden Proben, die mit anti-Trop-2 und der Maus-IgG1-Kontrolle gekoppelt sind, mit AlexaFluor488 Schaf anti-Maus gefärbt. Proben, die mit anti-CD49f oder der Ratte-IgG2a-Kontrolle inkubiert wurden, werden mit AlexaFluor546 Schaf anti-Ratte gekoppelt.

Im Anschluss dessen erfolgt die Fluoreszenzmessung der Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers und die anschließende Analyse der Ergebnisse durch die entsprechende Analyse-Software Summit 4.3.

3.1.2 Expression von EpCAM auf Tumorzellen

Auch die Expressionslevel von EpCAM auf den Oberflächen von Tumorzellen lassen sich durchflusszytometrisch bestimmen. Dazu werden 150.000 Tumorzellen entweder unfixiert aufgearbeitet und analysiert oder sie werden mit *CellSave* für ein bis vier Tage fixiert und

anschließend prozessiert. Dies erlaubt eine Aussage darüber, ob die EpCAM-Expression auf Tumorzellen durch die Fixierung mit *CellSave* verändert wird.

Die Tumorzellen werden zunächst mit 200 µl PBS + 0,2% BSA geblockt und im nächsten Schritt mit anti-EpCAM AlexaFluor488 inkubiert. Da dieser Primärantikörper bereits mit einem Sekundärantikörper gekoppelt ist, entfällt dieser Arbeitsschritt. Als Isotypkontrolle dient ein Maus IgG1 kappa-Antikörper, der ebenfalls mit AlexaFluor488 gekoppelt ist.

3.2 Methoden zur Verifizierung der Antikörper und Beads

3.2.1 Färbung von Tumorzellen für Trop-2 und CD49f

Die Herstellung von Zytospins dient dazu, Tumorzellen auf der Oberfläche eines Objektträgers zu fixieren, um diese anschließend färben zu können. Dazu werden die Zelllinien nach dem Waschen mit PBS durch Trypsin abgelöst. Nach der Pelletierung mit 1100 rpm für fünf Minuten und Resuspension in PBS, können die Tumorzellen mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden.

Die Vorrichtungen zur Erstellung von Zytospins werden nach Herstellerangaben aufgebaut und 200 µl PBS auf dem Objektträger vorgelegt. Anschließend werden 20.000 Tumorzellen zugefügt. Durch Zentrifugation werden die Tumorzellen auf die Oberfläche des Objektträgers gebracht, sodass der Überstand entfernt werden kann und letzte Flüssigkeitsreste eintrocknen können. Zytospins mit fixierten Tumorzellen von Zelllinien können anschließend für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

Die Tumorzellen werden zunächst für 30 Minuten mit 100 µl PBS + 0,2 % BSA pro Zytospin geblockt. Dies verhindert unspezifische Bindungen von Proteinen durch die Blockade mit BSA. Die Primärantikörper anti-Trop-2 und anti-CD49f werden in einer Verdünnung von 1:100 auf die jeweiligen Zytospins gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur (RT) werden ungebundene Antikörper von den Tumorzellen entfernt. Dazu werden die Zytospins dreimal in PBS gewaschen.

Um die Bindungen der Primärantikörper auf den Tumorzellen an einem Fluoreszenz-Mikroskop beurteilen zu können, müssen diese mit entsprechenden Sekundärantikörpern sichtbar gemacht werden. Zur Anfärbung des Zellkerns wird DAPI (*NucBlue*) in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Proben, die mit anti-Trop-2 gekoppelt sind, werden mit

AlexaFluor488 Ziege anti-Maus (1:200) gefärbt. Der Sekundärantikörper AlexaFluor594 Ziege anti-Ratte (1:200) dient der Sichtbarmachung des gebundenen CD49f-Antikörpers. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT, wobei die Proben vor Licht geschützt werden müssen, werden die Zytospins erneut dreimal gewaschen. Anschließend können sie mit *Fluorescence Mounting Medium* und einem Deckgläschen versehen werden und bei 4 °C vor Licht geschützt gelagert werden.

3.2.2 Bindung zwischen Tumorzellen und Beads über Antikörper

Um die spezifische Bindung der magnetischen Beads über den jeweiligen Antikörper an die Zelle zu zeigen, werden Tumorzellen verschiedener Brustkrebs-Zelllinien verwendet. Diese werden, wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt, kultiviert. Die entsprechenden Zellen werden mittels *Cell Dissociation* Puffer gelöst und nach dem Waschen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, um stets gleiche Mengen von Tumorzellen zu verwenden. Die Zellen werden anschließend in jeweils eine 12-Well-Platte überführt und dort über Nacht kultiviert, damit sie am Boden des Wells anwachsen können.

3.2.3 Herstellung der Antikörperbindung an DynaBeads M-450 Epoxy

Die DynaBeads Epoxy (Epoxy-Beads) werden in gleicher Weise gereinigt und mit anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f versehen, wie in Abschnitt 3.5.3 dargestellt. Hierbei werden zusätzlich Epoxy-Beads verwendet, die nicht an einen Antikörper gekoppelt sind und so als Negativkontrolle dienen. Dies soll die spezifische Bindung der Epoxy-Beads an die Tumorzellen über anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f aufzeigen und eine unspezifische Bindung zwischen Epoxy-Beads und Tumorzelle ausschließen.

3.2.3.1 Herstellung der Antikörperbindung an CELLection-Beads

Bei CELLection-Beads Biotin Binder (CELLection-Beads) kann, gemäß Herstellerangaben, zwischen zwei unterschiedlichen Anwendungsmethoden unterschieden werden. In der „direkten Methode“ werden zunächst die CELLection-Beads an die jeweiligen biotinylierten Antikörper gekoppelt. Die verwendeten Antikörper sind dabei mit einem Biotin-Molekül gekoppelt, worüber die magnetischen Beads binden. Dazu werden die Beads zunächst in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und gewaschen. Anschließend wird entweder der biotinylierte Trop-2-Antikörper oder CD49f-Antikörper in gleicher Konzentration hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, werden ungebundene Antikörper herausgewaschen. Als Negativkontrolle, um eine unspezifische Bindung an die Tumorzellen

auszuschließen, dienen CELLection-Beads, die ungekoppelt vorliegen, also nicht mit einem biotinylierten Antikörper inkubiert wurden.

Im Gegensatz dazu wird bei der „indirekten Methode“ der biotinylierte Antikörper zunächst an die Tumorzellen gebunden, bevor die CELLection-Beads hinzugefügt werden. Die biotinylierten Antikörper werden in identischer Konzentration wie in der direkten Methode in Kulturmedium gelöst. Anschließend wird jedes Well mit 100 µl der Antikörper-Lösung versehen. Dabei enthält jedes Well entweder anti-Trop-2 oder anti-CD49f; als Negativ-Kontrolle dient Kulturmedium ohne Antikörper-Zusatz. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten werden die Zellen gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend kann die Beladung der Tumorzellen mit CELLection-Beads erfolgen.

3.2.3.2 Beladung der Tumorzellen mit magnetischen Beads

Tumorzellen, die bereits in einer 12-Well-Platte vorbereitet wurden, werden von ihrem Kulturmedium befreit. Pro Well werden nun insgesamt 1 ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben sowie 4,5 µl der Bead-Suspension hinzugefügt und anschließend resuspendiert, damit sich die Beads gleichmäßig verteilen.

Dabei werden die Tumorzellen jeweils mit anti-Trop-2- bzw. anti-CD49f-gekopplten Epoxy-Beads sowie einer Negativ-Kontrolle versehen. Gleiches gilt für die Verwendung der CELLection-Beads in der direkten Methode, wobei die entsprechenden Antikörper-gekoppelten Beads auf die Tumorzellen gegeben werden. Da in der indirekten Anwendungsmethode bereits eine Verbindung zwischen Antikörper und Tumorzelle vorliegt, werden in diesem Fall zu jeder Probe ausschließlich aufgereinigte CELLection-Beads gegeben.

Die 12-Well-Platten werden für 30 Minuten auf einem Horizontal-Schüttler inkubiert, um die Bindung der magnetischen Beads an die Zellen zu erreichen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen, um ungebundene Beads zu entfernen. Die Zellen werden schlussendlich mit 500 µl *NucBlue*-enthaltendem Medium pro Well versehen, um die Zellkerne der Tumorzellen anzufärben.

3.2.3.3 Analyse mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops

Da die Tumorzellen in den 12-Well-Platten lebendig sind, muss die Auswertung unmittelbar im Anschluss der Aufarbeitung erfolgen. Die Platten werden dazu an einem CellCelector gescannt. Dieser ist ein Fluoreszenzmikroskop, was automatisierte Aufnahmen der 12-Well-

Platten ermöglicht. So wird von jedem Well eine Übersichtsaufnahme erstellt, die es erlaubt, die Anzahl der Tumorzellen und Menge der gebundenen magnetischen Beads zu bestimmen. Der Scan erfolgt im DAPI-Kanal, um die Zellkerne der Tumorzellen sichtbar zu machen. Außerdem wird ein Scan im Hellfeld (BF) erstellt; dies ist eine Darstellung in Weißlicht ohne Verwendung von Fluoreszenz. So ist die Bestimmung der Menge an vorhandenen Beads am deutlichsten.

3.2.3.4 Bildauswertung mittels ImageJ

Die Bildanalysesoftware ImageJ erlaubt es, die gebundene Menge magnetischer Beads pro Tumorzelle zu bestimmen. Dafür werden die Übersichtsbilder der Scans des CellCelectors verwendet. Die Bildausschnitte der zusammengehörigen Aufnahmen aus dem DAPI-Kanal und BF-Kanal, müssen genau angepasst werden, um identische Ausschnitte zu analysieren. Anhand der DAPI-Aufnahmen lässt sich die jeweilige Zellzahl pro Well bestimmen. Da die Beads sehr klein sind und häufig in großen Mengen an eine Zelle gebunden sind, ist es nicht möglich, hier die genaue Anzahl der Beads zu bestimmen. Deshalb wird die anteilige Fläche der Epoxy bzw. CELLection-Beads bestimmt. Je mehr Beads an die Tumorzellen gebunden sind, desto größer wird auch ihre Fläche. Diese Auswertung lässt sich anschließend als Fläche der gebundenen Beads pro Tumorzelle darstellen.

3.3 Methoden der Zellkultur

3.3.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit werden die Brustkrebs-Zelllinien MCF7, SK-BR-3, T-47D und MDA-MB-231 verwendet. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO_2. Die Zellen werden in Kulturflaschen kultiviert. Alle Zelllinien werden in RPMI 1640 kultiviert, welches 10% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin enthält.

Die Zelllinien SK-BR-3 und MDA-MB-231 werden dabei ohne weitere Zusätze kultiviert. Für die Zelllinien MCF7 und T-47D wird dem Medium 1 M Hepes zugefügt.

3.3.2 Einfrieren von Zelllinien

Eine längere Aufbewahrung der Zelllinien ist bei -152 °C und in DMSO-haltigen Medium möglich. Das Einfrieren erfolgt dabei in Einfriermedium, das aus 50% Medium, 40% FCS und 10% DMSO besteht.

Nach dem Waschen der Zellen mit PBS werden diese mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe von Medium für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Anschließend werden etwa $2x10^6$ Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. Zunächst werden die Zellen über Nacht in einem Isopropanol gefüllten Einfriergefäß bei -80 °C gelagert. Dadurch kommt es zu einem langsamen Absinken der Temperatur um circa 1 °C pro Stunde. Anschließend können die Kryo-Röhrchen in einen Stickstofftankmit einer Temperatur von -152 °C überführt werden.

3.3.3 Auftauen von Zelllinien

Eingefrorene Zelllinien werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend muss das DMSO, welches im Einfriermedium enthalten ist, schrittweise entfernt werden. Die Zellsuspension wird in ein Falcon-Röhrchen überführt und unter Schwenken erst tropfenweise und zuletzt in 1 ml-Schritten Medium hinzugefügt, bis ein Gesamtvolumen von 10 ml erreicht ist. Die Zellen werden nun gewaschen, indem sie für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert werden. Anschließend können sie zur weiteren Kultivierung in Kulturflaschen überführt werden.

3.4 Patienten

Die verwendeten Blutproben werden im Rahmen der Augusta-Studie und den DETECT III/IV/V-Studien entnommen. Alle Patientinnen sind an metastasiertem Mammakarzinom erkrankt und haben sich freiwillig zur Teilnahme an einer der Studien bereit erklärt. Die Genehmigungen durch eine Ethikkommission sind unter den jeweiligen Aktenzeichen freigegeben. Die Anonymität der Patientinnen wird zu jedem Zeitpunkt der Arbeit gewahrt.

Die Augusta-Studie (Aktenzeichen 3430) dient der „Identifikation neuer Biomarker zur Verbesserung der Genauigkeit üblicher Diagnoseverfahren sowie prognostischer und prädiktiver Faktoren bei Brustkrebs“.

In die DETECT-Studien werden Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und HER2-negativem Primärtumor (DETECT-III und -IV) eingeschlossen. Im Rahmen der DETECT-III Studie (NCT01619111) wird die Behandlung eines HER2-negativen Primärtumors bei HER2-positiven CTCs untersucht. Anders als bei DETECT-III sind in der DETECT-IV Studie (NCT02035813) Patientinnen eingeschlossen, die sowohl einen HER2-negativen Primärtumor als auch HER2-negative CTCs aufweisen. Die Unterteilung erfolgt hier anhand des Hormonrezeptorstatus des Primärtumors. Patientinnen mit HER2-amplifiziertem und Hormonrezeptor-positiven Primärtumor werden in die DETECT-V Studie (NCT02344472) eingeschlossen.

Die Blutproben der Patientinnen stammen aus peripherem venösem Blut, welche entweder in EDTA-Röhrchen oder in *CellSave-Tubes* abgenommen wurden. Die Blutentnahmen werden von geschultem Personal in den jeweiligen Kliniken und Zentren durchgeführt. Der Vorteil von einer Fixierung der Zellen durch *CellSave* liegt darin, dass die Probe nicht zwingend am Abnahmetag aufgearbeitet werden muss, sondern für mehrere Tage gelagert werden kann, ohne dass die DNA-Qualitäten der Tumorzellen reduziert sind.

3.5 Methoden zur Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen

3.5.1 Präparation des Blutes

Für die Aufarbeitung einer Blutprobe ist es notwendig, Erythrozyten und Plasma aus der Probe zu entfernen, sodass lediglich PBMCs und eventuell darin befindliche Tumorzellen vorhanden bleiben. Für Vortestungen werden dazu Blutproben von gesunden Spenderinnen verwendet, die in einem weiteren Schritt mit Tumorzellen versetzt werden.

Die in EDTA-Röhrchen oder *CellSave*-Röhrchen vorliegenden Blutproben werden durch die Ficoll-Methode von Erythrozyten und Plasma befreit. In ein *SepMate*-Röhrchen werden 15 ml Biocoll-Separationslösung gegeben und anschließend 5 ml Blut vorsichtig darauf pipettiert. Nach einer Zentrifugation mit 1200 ×G für 10 Minuten bei 4 °C kann das Plasma und Zellpellet bestehend aus PBMCs in ein Falcon-Röhrchen überführt werden. Nach einer Verdünnung mit PBS wird erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird abgetragen, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Die

PBMCs werden in 500 µl E2-Puffer bzw. Puffer 2 gelöst und in ein Protein-*LoBind*-Reaktionsgefäß überführt. Das Falcon-Röhrchen und die Pipettenspitze werden anschließend mit weiteren 100 µl E2-Puffer bzw. Puffer 2 gewaschen und zu der Suspension hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 600 µl zu erreichen.

3.5.2 Vorbereitung von Tumorzellen für *Spike-in* Experimente

Spike-in Experimente erlauben eine systematische Etablierung und Validierung eines neuen *Workflows*. So ist es möglich einzelne Komponenten und Faktoren des gesamten Protokolls unabhängig voneinander zu testen und anzupassen. Durch die Nutzung von Tumorzellen aus Zelllinien kann die spätere Anreicherung von CTCs aus Patientenproben optimiert werden, denn hier lässt sich durch die Verwendung einer bekannten Zellanzahl die jeweilige Wiederfindungsrate der Tumorzellen bestimmen.

Die Zellen werden nach dem Waschen mit PBS durch einen *Cell Dissociation* Puffer gelöst. Nach der Pelletierung bei 1100 rpm für fünf Minuten, erfolgt eine Verdünnung mit PBS. 1 ml dieser Suspension wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl *Cell Tracker Green* versehen. Nach erfolgter Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C, wird der überschüssige Farbstoff entfernt. Dazu werden die Zellen fünf Minuten bei 200 ×G zentrifugiert. Anschließend wird das Volumen der Zellsuspension für 500 Zellen durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer errechnet. So lässt sich ein Kontroll-Objektträger anfertigen, worauf in jeweils 100 µl PBS die errechnete Suspensionsmenge für 500 Zellen gegeben wird. Eine Dreifach-Kontrolle ermöglicht es, die genaue Wiederfindungsrate der Tumorzellen nach erfolgter Anreicherung zu bestimmen.

3.5.3 DynaBeads M-450 Epoxy

Es werden 25 µl der Epoxy-Beads in ein Protein-*LoBind*-Reaktionsgefäß überführt und zunächst gewaschen. Um den Überstand zu entfernen, wird ein Magnet verwendet, der für eine Minute an den Rand des Reaktionsgefäßes gehalten wird. Anschließend werden die Epoxy-Beads zweimal mit jeweils 1 ml E1 gewaschen, erneut unter der Verwendung des Magneten. Nun kann die Inkubation der Beads mit den entsprechenden Antikörpern erfolgen. Dazu werden 3 µg anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f mit E1-Puffer zu den Epoxy-Beads gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 5 µl E3 erfolgt eine weitere Inkubation für eine Stunde bei RT und regelmäßiger Durchmischung der Suspension. Anschließend wird der Antikörper-Überstand mit E2-Puffer herausgewaschen.

Nachdem die Epoxy-Beads im Originalvolumen von 25 µl resuspendiert wurden, werden sie bei RT bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die aufgearbeitete Blutprobe, die aus Tumorzellen und PBMCs besteht, wird mit 4,5 µl der Bead-Suspension versehen. Die Probe wird durch Invertieren gemischt und für 45 Minuten bei 4 °C auf dem 360°-Rotator inkubiert, sodass über den jeweiligen Antikörper eine Bindung zwischen Tumorzellen und Epoxy-Beads entsteht.

3.5.4 CELLection-Beads Biotin Binder

Es werden 10 µl der CELLection-Beads pro anzureichernde Blutprobe in ein Protein-*LoBind*-Reaktionsgefäß überführt. Nach Entfernung des Überstandes unter Zuhilfenahme eines Magneten, werden die CELLection-Beads zweimal in jeweils 1 ml Puffer 1 gewaschen. Anschließend wird das Originalvolumen von 10 µl pro Probe in Puffer 1 wiederhergestellt. Die gereinigten CELLection-Beads werden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.5.4.1 Direkte Anreicherungsmethode

Es erfolgt die Inkubation der Beads mit den entsprechenden Antikörpern. Die CELLection-Beads befinden sich in ihrem Originalvolumen von 10 µl Puffer 1 pro Probe und es werden 2,25 µg des biotinylierten Trop-2-Antikörpers bzw. 1,8 µg des biotinylierten CD49f-Antikörpers hinzugegeben. Durch Streptavidin, dem Biotinanker der CELLection-Beads, kann über das gebundene Biotin-Molekül der Antikörper eine spezifische Bindung hergestellt werden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT müssen ungebundene Antikörper entfernt werden. Dazu werden die CELLection-Beads dreimal in jeweils 1 ml Puffer 1 gewaschen und anschließend in ihrem Originalvolumen von 10 µl Puffer 1 pro Probe resuspendiert.

Die aufgearbeitete Blutprobe wird mit jeweils 10 µl der Bead-Suspension versehen. Die Probe wird durch Invertieren gemischt und für 20 Minuten bei 4 °C auf dem 360°-Rotator inkubiert, sodass über den Antikörper eine Bindung zwischen Tumorzellen und CELLection-Beads entstehen.

3.5.4.2 Indirekte Anreicherungsmethode

Der entscheidende Unterschied der indirekten Methode im Vergleich zur direkten Methode liegt darin, dass hier der Antikörper zuerst an die Tumorzellen gekoppelt wird. Anschließend erfolgt erst die Inkubation mit den CELLection-Beads. In der direkten Methode hingegen wird zunächst die Bindung zwischen Antikörper und CELLection-Beads hergestellt und daran die Inkubation mit den Tumorzellen angeschlossen.

Zu der aufgearbeiteten Blutprobe werden 2,25 µg des biotinylierten anti-Trop-2 bzw. 1,8 µg des biotinylierten anti-CD49f zugefügt und für 10 Minuten bei 4 °C auf dem 360°-Rotator inkubiert. Nach erfolgter Inkubation muss ein möglicher Antikörper-Überschuss herausgewaschen werden. Dazu wird die Probe für 8 Minuten bei 350 ×G und 8 °C zentrifugiert und anschließend in 1 ml Puffer 2 gewaschen. Es erfolgt erneut eine Pelletierung bei 350 ×G, 8 Minuten und das Zellpellet wird in 600 µl Puffer 2 resuspendiert. Es werden 10 µl der bereits gewaschenen CELLection-Beads zur Antikörper-gekoppelten Probe gegeben und durch Invertieren gemischt. In einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4 °C auf dem 360°-Rotator binden die CELLection-Beads an die biotinylierten Antikörper, die bereits an die Tumorzellen gebunden sind.

3.5.5 Anreicherung von Tumorzellen durch das IsoFlux-System

3.5.5.1 Funktionsprinzip des IsoFlux-Systems

Das IsoFlux-System arbeitet über einen Magneten und macht die Verwendung spezifischer *Cartridges* notwendig. Aus diesem Grund müssen die Tumorzellen zuvor an magnetische Beads gekoppelt werden. Die *Cartridges* des IsoFlux enthalten verschiedene Wells mit unterschiedlichen Funktionen; außerdem befinden sich auf dem Boden mikrofluide Kanäle. Wird nun eine Probe in ein *Cartridge* geladen, durchfließt diese die Mikrokanäle, die in einer Isolationszone enden, in der die Tumorzellen aufgefangen werden. In den Mikrokanälen reihen sich die Zellen hintereinander auf. Lediglich die Bead-gekoppelten Tumorzellen werden von dem Magneten angezogen und akkumulieren auf der Oberfläche des so genannten *Coupons.* PBMCs, die nicht an magnetische Beads gebunden sind, werden nicht vom Magneten gefangen und fließen weiter in einen Abfallbehälter. Der *Coupon*, der mit Bead-gekoppelten Tumorzellen beladen ist, wird schlussendlich mithilfe des Magneten aus der Isolationszone aufgenommen und in eine Halterung gesteckt. Von dort können die Tumorzellen abgenommen und weiterverarbeitet werden.

3.5.5.2 Ablauf der Anreicherung

Die *Cartridges* des IsoFlux werden nach Herstellervorgaben zusammengebaut. In das Well 1 wird jeweils 1 ml FCS gegeben. Dies soll die Bindung von magnetischen Beads an die Wände der *Cartridge* verhindern. Der IsoFlux wird gestartet und das *Standard Isolationsprotokoll Rev2* ausgewählt. Zum *Priming* des Systems werden jeweils 3 ml E2-Puffer (Epoxy-Beads) bzw. Puffer 2 (CELLection-Beads) in das Well 2 gegeben und der Deckel der *Cartridge* geschlossen. Nach Abschluss des *Priming*-Vorgangs, können nun die Proben geladen werden. Dazu wird das FCS aus Well 1 entfernt und eine Probe hineingegeben. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß der Probe wird anschließend mit weiteren 100 µl E2-Puffer bzw. Puffer 2 gespült, um einen Zellverlust auszuschließen. Der Isolierungsvorgang des IsoFlux kann nun gestartet werden. Nach Beendigung des Protokolls sind die Bead-gekoppelten Tumorzellen an dem *Coupon* gesammelt, welcher im *Coupon*-Halter steckt. Darauf werden je 50 µl E2-Puffer bzw. Puffer 2 gegeben und das Zellpellet resuspendiert, um die Suspension anschließend in ein Protein-*LoBind*-Reaktionsgefäß zu überführen. Um einen Zellverlust zu vermeiden, wird der *Coupon* ein weiteres Mal mit 50 µl E2-Puffer bzw. Puffer 2 gespült und zur Suspension hinzugefügt.

3.5.6 Färbung von Tumorzellen nach der Anreicherung

Tumorzellen aus Patientenproben, die durch den IsoFlux angereichert wurden, werden mit einem *Mastermix* zur Färbung versehen. Dieser enthält Zytokeratin CK TRITC (1:100), EpCAM VUD1D9 AlexaFluor 488 (1:25), CD45 AlexaFluor 647 (1:12,5) und *NucBlue* (1:10). Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wird Saponin 0,2 % in einer 1:5-Verdünnung verwendet. Als Basissuspension dient Puffer 2.

Die angereicherten Tumorzellen befinden sich in einer Suspension von 100 µl Puffer 2, wozu 100 µl des *Mastermixes* gegeben werden. Die Färbung erfolgt auf einem 360°-Rotator bei RT für eine Stunde und vor Licht geschützt. Anschließend werden die Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1300 rpm und 8 °C für 8 Minuten gewaschen. Als Waschpuffer dient Puffer 1, da für die Ablösung der Beads in Puffer 2 enthaltenes EDTA entfernt werden muss.

3.5.7 Ablösung der magnetischen Beads von Tumorzellen

Nach der Anreicherung der Tumorzellen durch das IsoFlux-System und deren Färbung, sind die magnetischen CELLection-Beads weiterhin an den Zellen gebunden. Da die Tumorzellen einzeln isoliert werden sollen, ist es sinnvoll, die Beads von den Zellen zu lösen. Dies ist ausschließlich bei CELLection-Beads möglich, da sich bei diesen Beads zwischen Bead und Biotin ein DNA-Linker befindet, der mit einer DNase geschnitten werden kann.

Die im CELLection Biotin Binder Kit enthaltene DNase I, wird nach Herstellerangaben aus den *Releasing Buffer* Komponenten I und II hergestellt. Die gefärbten Tumorzellen werden mit 200 µl Puffer 3 und 4 µl DNase I versetzt. Die Inkubation erfolgt für 15 Minuten auf dem 360°-Rotator bei RT vor Licht geschützt. Um die Beads zu lösen, wird die Probe vorsichtig resuspendiert und somit die Verbindungen aufgebrochen. Anschließend können die gelösten Beads durch einen Magneten gesammelt und die Suspension mit darin enthaltenen Tumorzellen, in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Der Vorgang zum Auflösen der Bindungen wird wiederholt, um alle Zellen von den Beads zu lösen.

3.5.8 EpCAM-Quantifizierung

Da die EpCAM-Expression von Tumorzellen heterogen ist, können in einer Patientenprobe sowohl EpCAM-hoch als auch -gering exprimierende Zellen gefunden werden. Daher ist es notwendig, die EpCAM-Expression jeder einzelnen Tumorzelle separat voneinander zu bestimmen.

Durch die Färbung der Tumorzellen mit EpCAM Alexa Fluor 488, wie in Abschnitt 3.5.6 dargestellt, lässt sich die Expressionsstärke im Fluorescein-Isothiocyanat-Kanal (FITC) eines Fluoreszenzmikroskops bestimmen. Dabei werden die Proben als Zytospins auf einem Objektträger mit dem 40x-Objektiv mit achtfacher Belichtung und einer Belichtungszeit von 300 ms getrachtet. Mit der Bildanalysesoftware ImageJ lässt sich anschließend die mittlere Fluoreszenzstärke der einzelnen Tumorzelle auswerten und berechnen. Dabei wird die Hintergrundfluoreszenz vom Wert der Fluoreszenz der Zelloberfläche subtrahiert, um die EpCAM-Expression der Zelle unabhängig von ihrer Umgebung zu bestimmen.

In Abb. 1 ist eine Übersicht über den Ablauf des etablierten *Workflows* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen dargestellt.

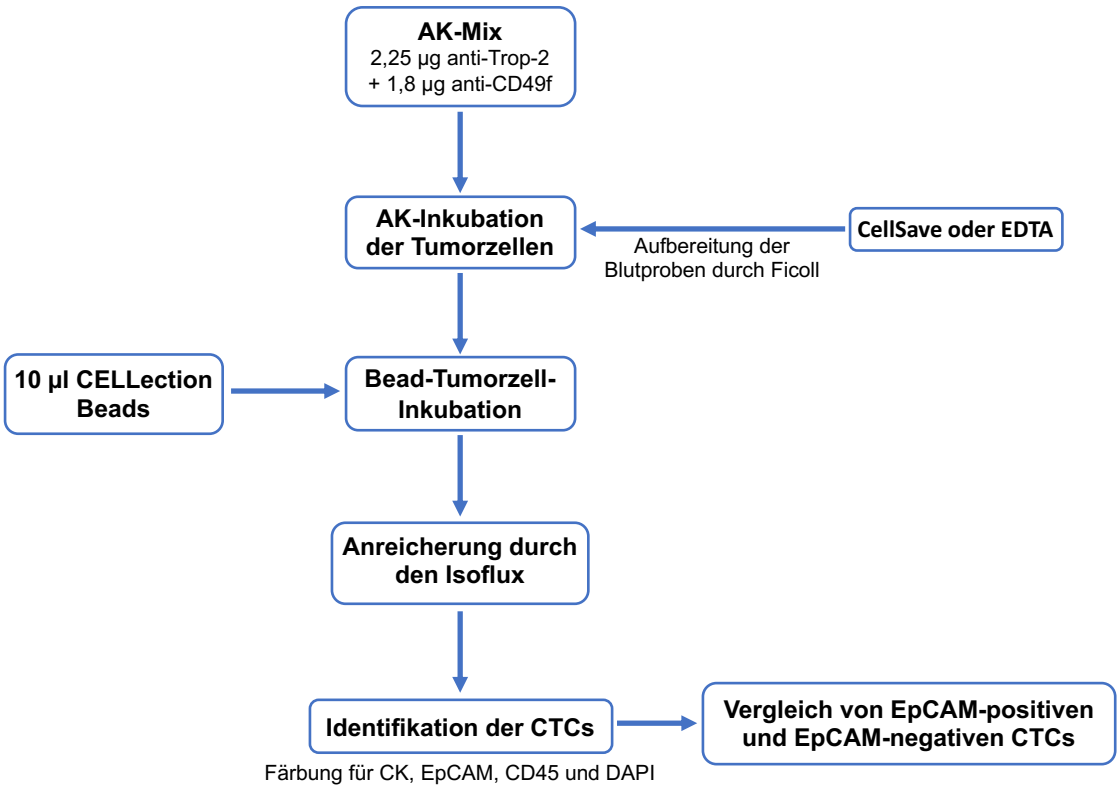

Abb. 1. *Workflow* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen. Eingesetzt wird ein AK-Mix bestehend aus anti-Trop2 und anti-CD49f. Die Anreicherung erfolgt durch magnetische CELLection-Beads durch das IsoFlux-System. Blutproben liegen in EDTA oder CellSave fixiert vor. Die Identifikation der Tumorzellen erfolgt durch eine Fluoreszenzfärbung für DAPI, CK, CD45 und EpCAM.

3.6 Identifikation und Isolation von Tumorzellen

3.6.1 Identifikation von Tumorzellen

Im IsoFlux angereicherte Tumorzellen befinden sich zusammen mit einzelnen PBMCs in einer Suspension, die unter dem Fluoreszenzmikroskop des CellCelectors analysiert werden kann. Die Zellen werden auf einen Glasträger gegeben, der auf einem magnetischen Träger des CellCelectors platziert wird. Die Analyse erfolgt durch die CellCelector-Software 3.0. Folgende Kanäle werden im 40×-Objektiv betrachtet: DAPI für die Detektion des Zellkerns, TRITC für CK, FITC für EpCAM und Cy5 für die Detektion von CD45. Dabei werden folgende Belichtungszeiten und Belichtungsstärken verwendet: 50 ms, 4× für DAPI; 300 ms, 8× für TRITC und Cy5 und 300 ms, 8× für FITC.

Die Selektionskriterien für Tumorzellen sind dabei DAPI-positiv, CK-positiv sowie CD45-negativ und EpCAM-variabel. Im Gegensatz dazu sind PBMCs DAPI-positiv, CD45-positiv

und CK-negativ. Als Tumorzellen identifizierte Ereignisse werden außerdem im Hellfeld (BF) betrachtet, denn nur Zellen mit einer runden Struktur, einer entsprechenden Fluoreszenz und ohne DNA-Fragmentierung im DAPI-Kanal werden nachfolgend isoliert.

3.6.2 Isolation von Einzelzellen

Die Isolation von Einzelzellen mithilfe des CellCelectors wird mittels Mikromanipulation durch eine Glaskapillare durchgeführt, die einen Durchmesser von 30 µm hat. Zur Isolation der Einzelzellen wird die Ansicht im DAPI-Kanal verwendet, um eine mögliche Isolation von umgebenden Zellen zu vermeiden. Zuerst muss die Glaskapillare 15 bis 25 µm oberhalb der Oberfläche des Objektträgers kalibriert werden. Anschließend kann die ausgewählte Tumorzelle in die Kapillare aspiriert und in ein PCR-*Tube* positioniert werden, das bereits mit PBS vorgefüllt wurde. Die PCR-*Tubes* können bei -80 °C gelagert werden, bis die Tumorzellen weiterverarbeitet werden.

3.7 Methoden der DNA-Analyse von Tumorzellen

3.7.1 *Whole Genome Amplification* (WGA)

Die Vervielfältigung der genomischen DNA einzelner Tumorzellen erfolgt mittels *Whole Genome Amplification* (WGA). Dazu wird das Ampli1 WGA Kit weitgehend nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen werden dabei zunächst über Nacht lysiert. Anschließend wird die DNA durch das Restriktionsenzym MseI geschnitten. Der Restriktionsverdau wird auf 3 Stunden verlängert. Anschließend werden Adapter ligiert mit deren Hilfe die DNA schließlich vervielfältigt werden kann.

Die Qualität der generierten WGA-Produkte wird im Anschluss mit Hilfe des Ampli1 QC Kits bestimmt. Die Qualitätskontrolle wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die weitere Analyse werden ausschließlich Zellen verwendet, bei denen mindestens drei der vier Amplikons erfolgreich amplifiziert werden konnten.

3.7.2 Low Pass Sequencing

Die Analyse chromosomaler Aberrationen wird mittels *Low Pass Sequencing* durchgeführt. Dies ermöglicht eine *Whole Genome* Sequenzierung mit sehr geringer Abdeckung zur Detektion der chromosomalen Aberrationen (169). Dazu wird das Ampli1 LowPass Kit nach Herstellerangaben eingesetzt.

Zunächst wird die DNA aus 10 µl WGA-Produkt mittels AMPure XP Beads nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die *Libraries* werden anschließend nach Herstellerangaben präpariert und auf einem Ion Torrent Sequenziersystem sequenziert. Die Analyse der Daten erfolgt entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Parameter.

3.7.3 Mutationsanalyse

Prädiktive Mutationen in den Hotspot-Regionen von *PIK3CA* (Exons 5, 10 und 21), *ESR1* (Exons 5, 7 und 8), *AKT1* (Exon 3) und *ERBB2* (Exons 8, 18, 19 und 20) werden analysiert. Hotspot-Regionen werden mittels Multiplex-PCR amplifiziert, mit Multiplicom MID Dx Primern markiert und auf einem MiSeq System sequenziert (170).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Patientendaten

Es wurden insgesamt 23 Blutproben untersucht, die von Mammakarzinom-Patientinnen aus der Augusta- sowie den DETECT-Studien stammten. Dabei wurden ausschließlich weibliche Probanden eingeschlossen. Ebenso lag zum Zeitpunkt der CTC-Analysen bei allen Patientinnen ein metastasiertes Stadium der Erkrankung vor. Das durchschnittliche Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose lag bei 56,7 Jahren (Median 62), zum Zeitpunkt der CTC-Analyse waren sie durchschnittlich 63 Jahre alt (Median 64,5). Die im CellSearch festgestellte Anzahl der CTCs in 7,5 ml Blut lag im Bereich zwischen null und 6030.

Bei Diagnose lag bei 7/23 (30,4 %) Patientinnen ein invasiv-duktales Karzinom vor, bei 10/23 (43,5 %) ein invasiv-lobuläres Karzinom und in den übrigen 6/23 (26,1 %) Fällen konnten keine Angaben zum Tumorsubtyp gemacht werden. Bei einer Patientin (4,3 %) lag ein *Carcinoma in situ* vor, 4/23 (17,4 %) Patientinnen wiesen ein Tumorstadium T1 sowie 11/23 (47,8 %) ein Stadium T2 auf. Das Stadium T3 lag bei 3/23 (13,0 %) Patientinnen vor. Eine Infiltration der Lymphknoten (≥ N1) lag bei 10/23 (43,5 %) Patientinnen vor, in 9/23 (39,1 %) Fällen wurde kein Lymphknotenbefall nachgewiesen. Ein primär metastasiertes Stadium zeigte sich bei 9/23 (39,1 %) Patientinnen, in 12/23 (52,2 %) Fällen lagen primär keine Fernmetastasen vor. Von 2/23 (8,7 %) Patientinnen lagen bezüglich der TNM-Stadien keine Angaben vor. Bei 2/23 Fällen (8,7 %) fehlten die Angaben teilweise.

Alle Primärtumore der Patientinnen, von denen Informationen bekannt waren, wiesen ein *Grading* ≥ G2 auf. In 12/23 (52,2 %) Fällen wurden die Tumoren als G2 eingestuft, in 5/23 (21,7 %) als G3. Bei 6/23 (26,1 %) Patientinnen lagen keine Angaben zum *Grading* vor. Der Hormonrezeptor- und HER2-Status der Primärtumoren wurde außerdem bestimmt. In 17/23 (73,9 %) lag ein luminaler Subtyp vor, jeweils mit einer ER- und/oder PR-Überexpression. Bei 4/23 Patientinnen (17,4 %) lag eine HER2-Amplifikation vor. In 3/23 (13,0 %) Fällen wurde ein basalartiger Subtyp festgestellt. Für 2/23 (8,7 %) Patientinnen lagen keine Angaben zur Tumorbiologie vor. In Tabelle 13 sind die klinischen Daten der 23 untersuchten Patientinnen detailliert dargestellt.

Tabelle 13. Klinische Daten der 23 untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinom.

Patientin	Alter ED (Jahre)	Alter CTC-Analyse (Jahre)	Subtyp	Tumorgröße (T)	Nodalstatus (N)	Metastasen (M)	Stadium (UICC)	Grading (G)	Hormon-rezeptor	HER2-Status
#1	65	77	Inv.-lobulär	T2	N0	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#2	36	48	Inv.-duktal	Tis	N0	M0	0	G3	ER- PR-	HER2+
#3	75	76	Inv.-lobulär	T1	N1	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#4	65	76	Inv.-lobulär	T2	N0	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#5	43	46	Inv.-duktal	T3	N3	M0	IIIC	G2	ER- PR-	HER2-
#6	68	75	k. A.	T1b	N0	M0	IA	k. A.	ER+ PR+	HER2-
#7	35	50	Inv.-duktal	T1c	N1	M0	IIA	G2	ER+ PR+	k. A.
#8	49	58	Inv.-duktal	T2	N0 / N1	M0	IIA/B	G2 / G3	ER+ PR+	HER2-
#9	59	59	Inv.-lobulär	T2	N1	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#10	33	34	Inv.-lobulär	T3	N2	M0	IIIA	G3	ER- PR-	HER2-
#11	58	61	Inv.-duktal	T2	N0	M0	IIA	G2	ER+ PR+	HER2-
#12	57	58	k. A.	T3	N1	M0	IIIA	G3	ER+ PR-	HER2-

Patientin	Alter ED (Jahre)	Alter CTC-Analyse (Jahre)	Subtyp	Tumorgröße (T)	Nodalstatus (N)	Metastasen (M)	Stadium (UICC)	Grading (G)	Hormon-rezeptor	HER2-Status
#13	k. A.	53	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
#14	k. A.	51	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
#15	65	77	Inv.-lobulär	T2	N0	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#16	66	72	Inv.-lobulär	T2	N2a	M0	IIIA	G2	ER+ PR+	HER2+
#17	k. A.	68	Inv.-duktal	T2	N0	M0	IIA	G3	ER- PR-	HER2-
#18	65	77	Inv.-lobulär	T2	N0	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#19	45	45	k. A.	k. A.	k. A.	M1	IV	k. A.	ER+ PR-	HER2+
#20	74	76	k. A.	k. A.	k. A.	M1	IV	k. A.	ER+ PR+	HER2-
#21	65	77	Inv.-lobulär	T2	N0	M1	IV	G2	ER+ PR+	HER2-
#22	66	72	Inv.-lobulär	T2	N2a	M0	IIIA	G2	ER+ PR+	HER2+
#23	45	k. A.	k. A.	T1c	N1a	M0	II	k. A.	ER+ PR+	HER2-

4.2 Kategorisierung der Trop-2- und CD49f-Expression auf Tumorzellen

4.2.1 Trop-2- und CD49f-Antigen Expressionen auf Tumorzellen

Ein Ziel der Arbeit war es, sowohl EpCAM-positive als auch EpCAM-negative bzw. gering-exprimierende Tumorzellen anzureichern, um möglichst alle Subpopulationen der CTCs isolieren zu können. Die Identifizierung der zur Anreicherung verwendeten Antikörper erfolgte bereits durch Schneck *et al.* Hier wurden verschiedene Antikörper getestet, dabei zeigten sich erfolgsversprechende Ergebnisse für die Antikörper gegen Trop-2 und CD49f (86). Die Wahl zur Verwendung von zwei verschiedenen Antikörpern erfolgte aus dem Grund, dass die entsprechenden Antigene nicht auf allen Tumorzellen gleich stark exprimiert wurden. Für Vortestungen zur Etablierung eines *Workflows* war die Verwendung von Zelllinien notwendig. Dazu wurden unterschiedliche Brustkrebs-Zelllinien durchflusszytometrisch getestet, um geeignete Tumorzellen mit einer hohen Trop-2- bzw. CD49f-Expression verwenden zu können. Die Expressionsstärken von Trop-2 und CD49f wurden auf den Brustkrebs-Zelllinien MCF7, MDA-MB-231, T-47D und SK-BR-3 sowie auf peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) bestimmt und anhand dessen in Trop-2- bzw. CD49f-hoch oder -gering exprimierende Zellen klassifiziert.

In Abb. 2 sind die relativen Fluoreszenzintensitäten der durchflusszytometrischen Analysen dargestellt. Die Expressionsstärke von Trop-2 wurde an der Zelllinie T-47D referenziert (relative Färbeintensität $1{,}0 \pm 0{,}16$), da diese die höchsten Intensitäten aufwies. Anhand dieses Wertes wurden anschließend alle weiteren Tumorzellen sowie die PBMCs kategorisiert. SK-BR-3 wies eine Trop-2-Expression von $0{,}91 \pm 0{,}30$ auf, MCF7 zeigte einen Wert von $0{,}37 \pm 0{,}03$. Auf Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 sowie PBMCs ließen sich lediglich sehr geringe Trop-2 Antigenkonzentrationen nachweisen (MDA-MB-231: $0{,}09 \pm 0{,}02$; PBMC: $0{,}004 \pm 0{,}0008$).

Die CD49f-Expression der Zellen wies ein annähernd gegenteiliges Bild auf. Hierbei wurden die Fluoreszenzintensitäten auf die Expression der Zelllinie MDA-MB-231 referenziert ($1{,}0 \pm 0{,}02$). Bei weiteren Zelllinien sowie PBMCs lag eine dazu geringe Expression von CD49f vor (T-47D: $0{,}24 \pm 0{,}03$; MCF7: $0{,}12 \pm 0{,}006$; PBMC: $0{,}12 \pm 0{,}08$). Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 wiesen mit $0{,}03 \pm 0{,}03$ die geringste CD49f-Expression auf.

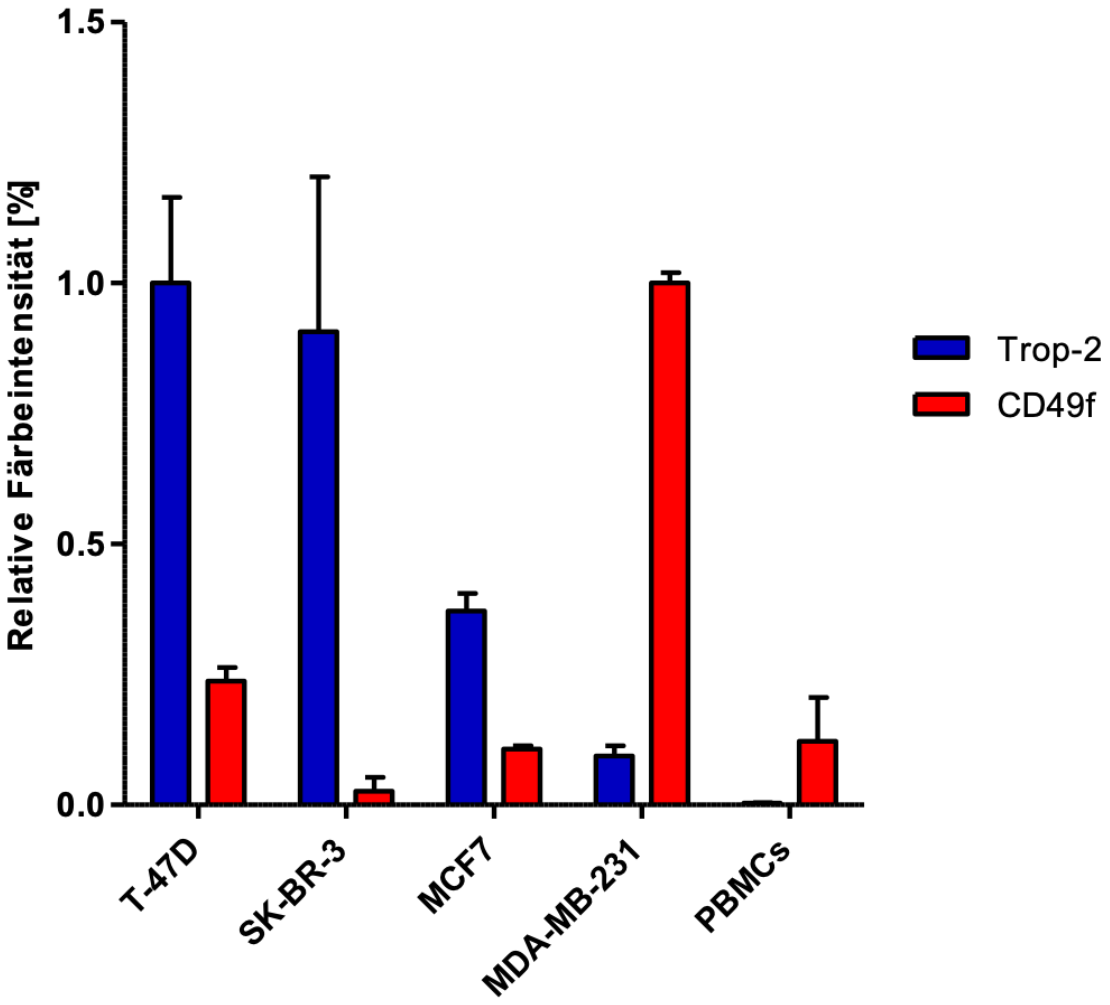

Abb. 2. Expression von Trop-2 und CD49f auf Tumorzellen und PBMCs. Die durchfluss-zytometrische Analyse zur Bestimmung der Expressionslevel von Trop-2 und CD49f erfolgte für die Tumorzellen der Zelllinien T-47D, SK-BR-3, MCF7 und MDA-MB-231 sowie für PBMCs. Die Berechnung der Expressionsstärken erfolgte jeweils anhand einer entsprechenden Isotypkontrolle: IgG1 für Trop-2 und IgG2a für CD49f. Die Färbeintensitäten wurden jeweils an der Zelllinie referenziert, die die höchste Expression des entsprechenden Antigens zeigte: für Trop-2 die Zelllinie T-47D, für CD49f die Zelllinie MDA-MB-231. Darstellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten der Tumorzellen und PBMCs als MW ± SD.

Insgesamt konnte durch diese Ergebnisse (vgl. Abb. 2) gezeigt werden, dass Tumorzellen mit epithelialem Charakter (wie SK-BR-3, T-47D und MCF7) für das Trop-2-Antigen hoch exprimierend sind; im Gegensatz dazu aber nur eine geringe oder nahezu keine Expression von CD49f aufweisen. Die eher mesenchymale Zelllinie MDA-MB-231 zeigte typischerweise eine starke Expression für CD49f, jedoch konnte Trop-2 nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Zusätzlich zum Vergleich der Expressionslevel der Antigene, sind in Abb. 3 repräsentative FACS-Ergebnisse der Zelllinien T-47D, SK-BR-3, MCF7 und MDA-MB-231 sowie von

PBMCs dargestellt. Analysiert wurden die Zellen jeweils auf die Expressionsstärken von Trop-2 und CD49f auf den Zelloberflächen. Die Isotypkontrollen definierten hierbei jeweils die Stärke des Hintergrundsignals, das vom Primärantikörper ausging. In Referenz dazu wurden die Färbeintensitäten, der gebundenen Antikörper auf den verwendeten Zellen betrachtet. Als Referenz für die CD49f-Expression diente eine IgG2a-Isotypkontrolle; die Analyse erfolgte im PE-Kanal in einer logarithmischen Darstellung. Die Bestimmung der Trop-2-Expression erfolgte im Kanal Alexa Fluor 488, ebenfalls logarithmisch dargestellt und referenziert auf eine IgG1-Isotypkontrolle.

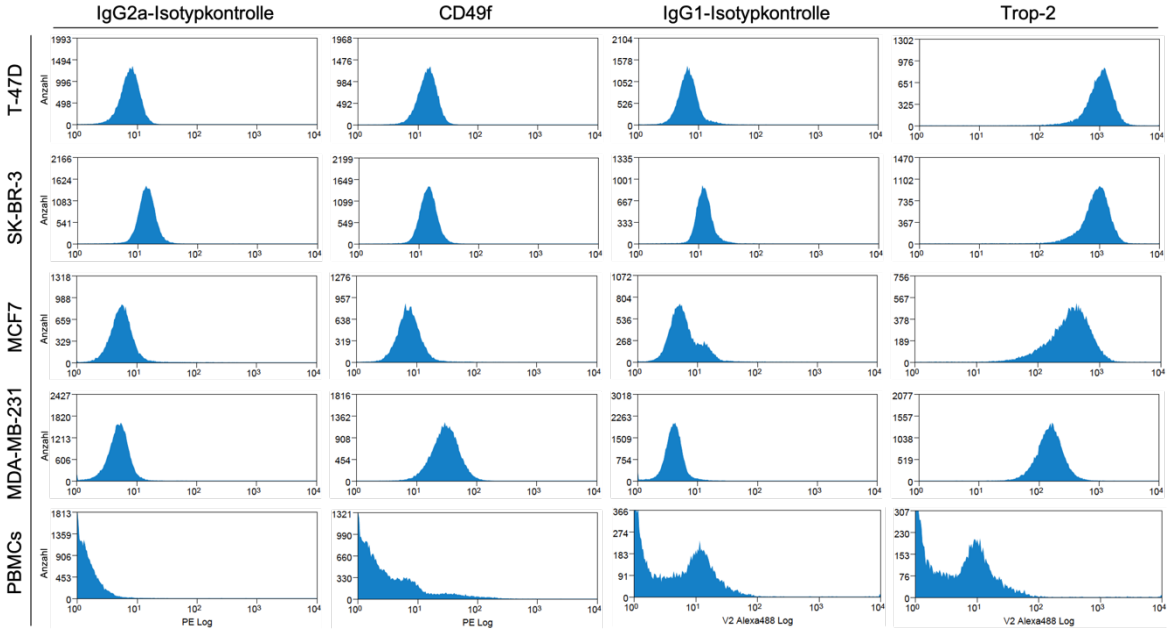

Abb. 3. Repräsentative FACS-Analyse von Tumorzellen und PBMCs. Die durchfluss-zytometrische Analyse zur Bestimmung der Expressionslevel von Trop-2 und CD49f erfolgte für die Tumorzellen der Zelllinien T-47D, SK-BR-3, MCF7 und MDA-MB-231 sowie für PBMCs. Die Auswertung der CD49f-Expression erfolgte im Kanal PE (logarithmisch), als Referenz diente die entsprechende IgG2a-Isotypkontrolle. Die Trop-2-Expression wurde im Kanal V2 Alexa488 (logarithmisch) ausgewertet; zur Bestimmung des Hintergrundsignals diente hier die IgG1-Isotypkontrolle. Darstellt sind repräsentative Primärergebnisse einer Durchflusszytometrie, wobei die einzelnen Färbeintensitäten jeweils auf die Anzahlen der analysierten Zellen bezogen wurden.

4.2.2 Fluoreszenzfärbung von Tumorzellen für Trop-2 und CD49f

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse erfolgte eine Fluoreszenzfärbung von Zytospin-fixierten Tumorzellen für Trop-2 und CD49f. Dafür wurden Tumorzellen der Zelllinien MCF7, als epitheliale Zellen und der Zelllinie MDA-MB-231 mit einem eher mesenchymalen Charakter verwendet. Die Färbung für die jeweiligen Primärantikörper erfolgte durch fluoreszierende Sekundärantikörper. Die Tumorzellen wurden jeweils für Trop-2 und CD49f sowie DAPI gefärbt. Die Isotypkontrollen dienten als Negativkontrollen, um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen.

Wie in Abb. 4 dargestellt, lag auf den Oberflächen der epithelialen MCF7-Zellen eine hohe Dichte des Trop-2-Antigens vor, sie ließen sich jedoch nur sehr schwach durch anti-CD49f anfärben. Die Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 hingegen exprimierten CD49f stark auf ihren Oberflächen, zeigten jedoch auch eine Expression von Trop-2 in der Färbung. Durch DAPI konnte die DNA in den Zellkernen der Tumorzellen angefärbt werden.

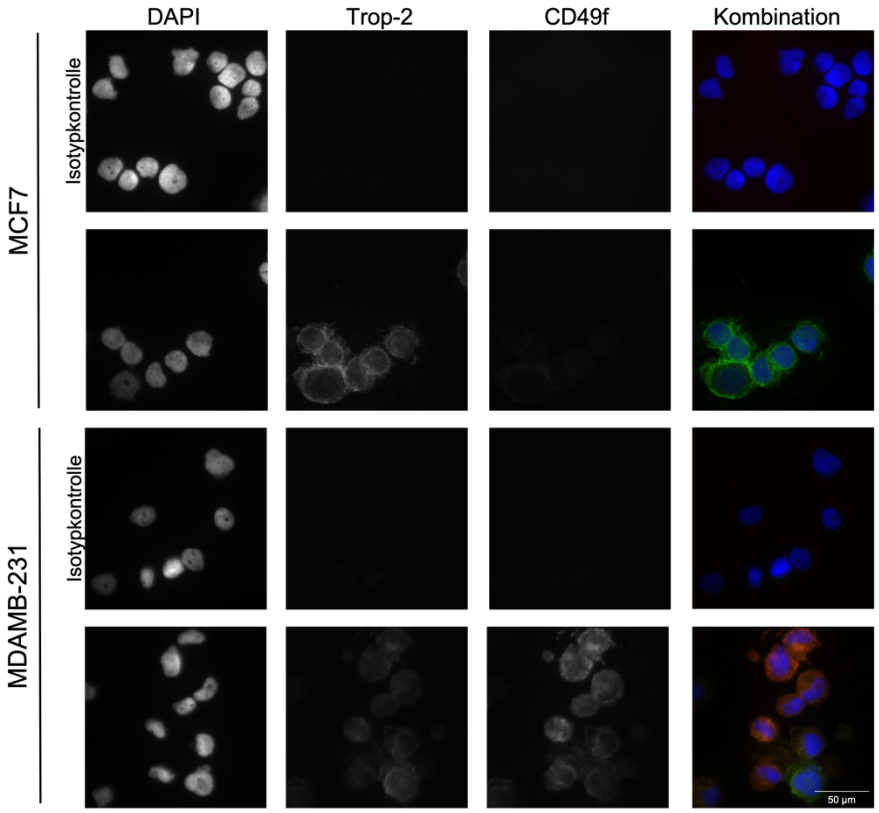

Abb. 4. Färbung von Tumorzellen für Trop-2 und CD49f. Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 wurden jeweils für die Antigene Trop-2 und CD49f gefärbt. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Isotypkontrollen dienten jeweils als Referenz für die Überexpression der Antigene auf den Oberflächen der Tumorzellen. Es wurde eine Vergrößerung von 40x verwendet.

4.3 Etablierung der EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen

4.3.1 Verifizierung der Bindung magnetischer Beads an Tumorzellen

Zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen sollten magnetische Beads verwendet werden, die über einen Antikörper spezifisch an die jeweiligen Tumorzellen binden. Die Spezifität der Bindung wurde im Folgenden untersucht und verifiziert. Dafür wurden magnetische Epoxy-Beads mit anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f inkubiert und

anschließend zu den Tumorzellen gegeben oder Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und anschließend magnetische Beads hinzugegeben. Eine Probe ohne Zugabe der Antikörper diente als Negativkontrolle. Die Bildauswertung erfolgte im Hellfeld eines Fluoreszenzmikroskops.

Wie in Abb. 5 dargestellt, entstand bei der Zelllinie MCF7 eine rosettenartige Bindung von magnetischen Beads (in der Abbildung als schwarze Punkte sichtbar) an die Tumorzellen (blassgrau sichtbar). Die Beads lagerten sich deutlich an die Oberflächen der Zellen an. In der Negativkontrolle fanden sich jedoch nur einzelne noch vorhandene Beads, die unspezifisch verteilt und nicht an den Oberflächen der Tumorzellen gebunden waren. Für Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 zeigten sich bei der Verwendung von anti-Trop-2 ebenso wie bei der Negativkontrolle keine spezifischen Bindungen der magnetischen Beads an die Zellen. An Zellen, welche mit anti-CD49f gekoppelt waren, haben die Beads sehr spezifisch gebunden und waren in hoher Konzentration angelagert. Die Bindung war deutlich ausgeprägter als sie bei MCF7-Zellen gekoppelt mit anti-CD49f zu beobachten war. Eine unspezifische Bindung von Beads an Tumorzellen konnte hierbei ausgeschlossen werden (siehe Negativkontrolle).

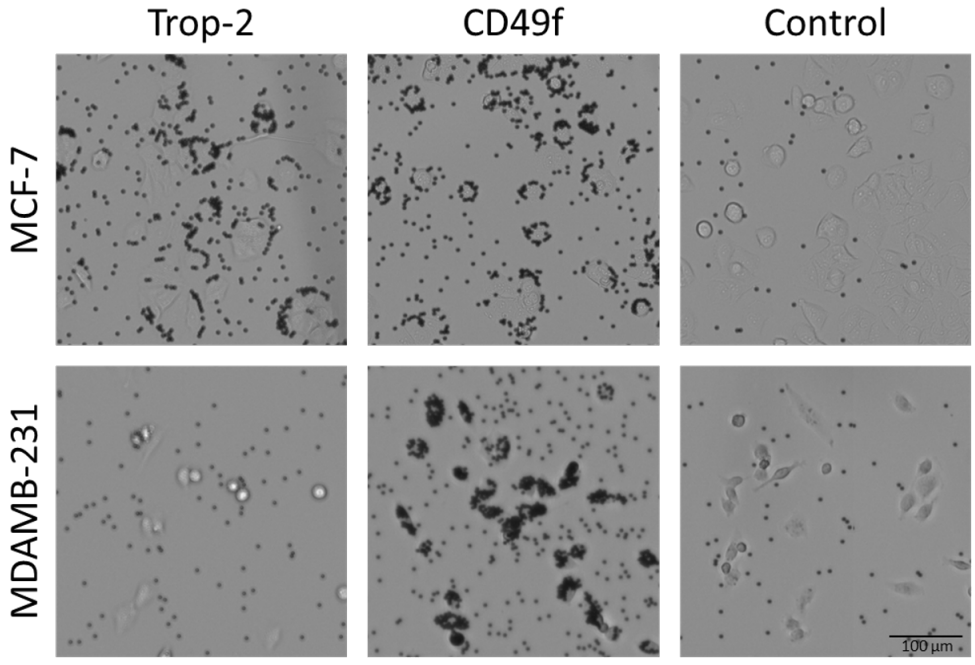

Abb. 5. Spezifische Bindung von magnetischen Beads an Tumorzellen. Antikörper gegen Trop-2 und CD49f wurden mit magnetischen Beads inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231, sodass die Beads an die Zellen binden konnten. Eine Kontrolle konnte unspezifische Bindungen an Tumorzellen ausschließen. Die Auswertung erfolgte durch Übersichtsaufnahmen des CellCelectors in einer Vergrößerung von 10x.

Die Ergebnisse des in Abb. 5 dargestellten Versuchs wurden anschließend weiterführend analysiert (vgl. Abb. 6). Dazu wurden die Flächen der gebundenen Beads pro Tumorzelle quantifiziert. Hier lagen für die Zelllinie MCF7 annähernd identische Resultate der gebundenen Beads für Trop-2 und CD49f vor (Trop-2: 1,78 ± 0,29 pro Zelle; CD49f: 1,81 ± 0,14 pro Zelle). Die Isotypkontrolle erwies nahezu keine Bindungen (0,05 ± 0,02 pro Zelle). Die Zelllinie MDA-MB-231 zeigte eine ausgeprägte Anreicherung von Beads bei der Verwendung von anti-CD49f (5,88 ± 1,41 pro Zelle). Durch anti-Trop-2 konnten nur wenige Beads an die Tumorzellen binden (0,26 ± 0,09 pro Zelle), nur geringfügig mehr als durch die Kontrollprobe (0,20 ± 0,06 pro Zelle).

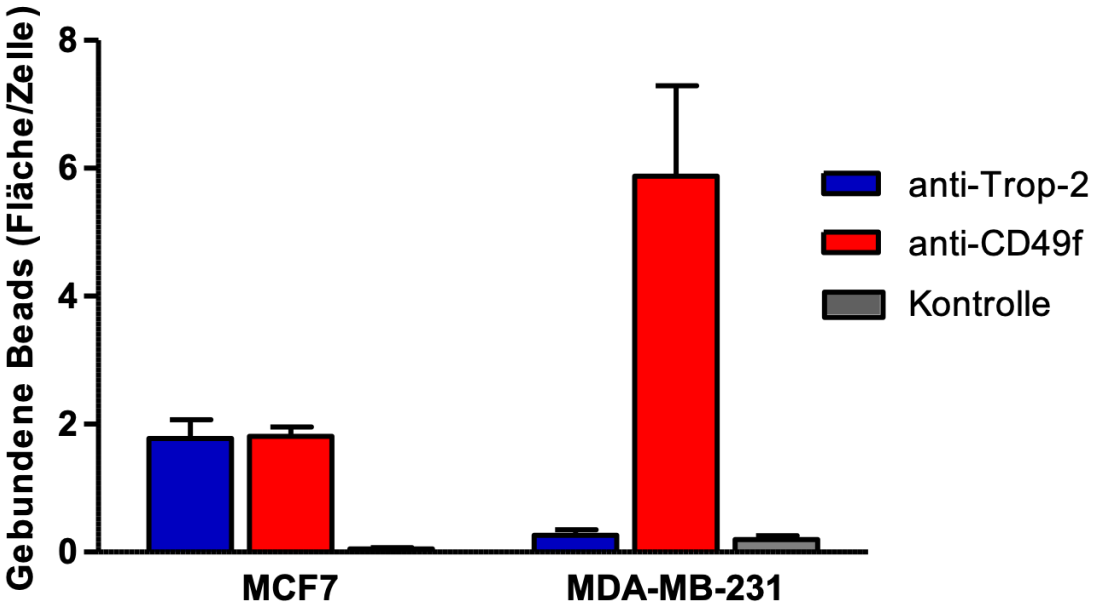

Abb. 6. Quantifizierung der gebundenen Beads. Die Quantifizierung der gebundenen Beads an Tumorzellen erfolgte mittels ImageJ, angegeben als Fläche der gebundenen Beads pro Tumorzelle. Die Ergebnisse der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 sind gegeneinander aufgetragen und für anti-Trop-2, anti-CD49f und die jeweilige Kontrolle dargestellt. Dargestellt sind MW ± SD.

4.3.2 Anreicherung von Tumorzellen durch magnetische Beads

Zur Etablierung des *Workflows* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen, wurden möglich viele objektive Faktoren und beeinflussbare Variablen durch *Spike-in* Experimente getestet und angepasst. Zunächst erfolgte die Anreicherung der Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 durch magnetische Epoxy-Beads. Unter der Verwendung der Antikörper gegen Trop-2 sowie CD49f wurden die Tumorzellen im IsoFlux-System angereichert.

Die Abb. 7 stellt die Wiederfindungsraten der oben genannten Anreicherung, bezogen auf Kontrollproben der verwendeten Zelllinien, dar. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 ließen sich durch die Anreicherung mittels anti-CD49f höhere Wiederfindungsraten (14,47 ± 3,73 %) detektieren als bei gleichem Verfahren durch die Verwendung von anti-Trop-2 (2,90 ± 1,21 %). Die Anreicherung der Tumorzellen der Zelllinie MCF7 wies durch anti-Trop-2 eine höhere Rate von Tumorzellen (21,91 ± 6,54 %) verglichen zur Verwendung von anti-CD49f (5,03 ± 0,8 %) auf. Insgesamt konnten durch Epoxy-Beads nicht mehr als maximal 19 % (MDA-MB-231) bzw. 28 % (MCF7) der initial vorhandenen Tumorzellen anreichert werden.

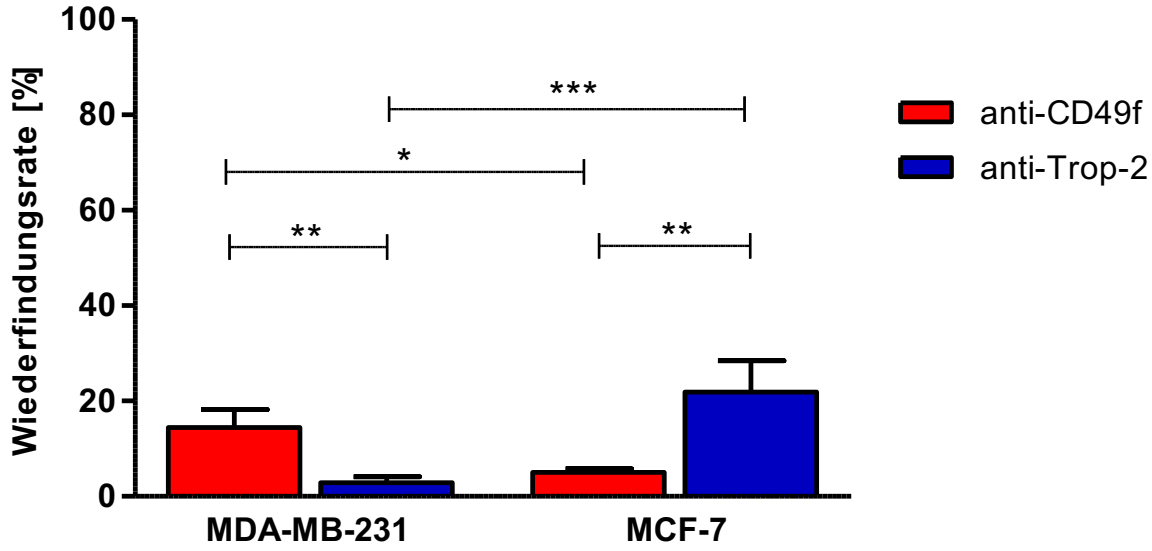

Abb. 7. Anreicherung von Tumorzellen durch Epoxy-Beads. Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 wurden jeweils durch anti-Trop-2 und anti-CD49f mit Epoxy-Beads angereichert. Die Wiederfindungsraten beider Zelllinien für die jeweiligen Antikörper sind in Prozent dargestellt. Dargestellt sind MW ± SD. P-Werte wurden mit einem *Two Way ANOVA mit posthoc Tukey's multiple comparison test* getestet. Dabei sind nur signifikante p-Werte aufgeführt. * für p <0,05, ** für p <0,01, und *** für p <0,001.

Zur Etablierung der Anreicherung von Tumorzellen wurden außerdem CELLection-Beads getestet, um im Vergleich zu Epoxy-Beads eine etwas andere Funktionsweise der magnetischen Beads zu untersuchen. Diese konnten, wie in Abschnitt 3.2.3.1 näher dargestellt, in zwei unterschiedlichen Methoden verwendet werden. CELLection-Beads wurden entweder zunächst an die jeweiligen Antikörper gekoppelt (direkte Methode) oder die Antikörper wurden erst mit Tumorzellen inkubiert und anschließend an die Beads gebunden (indirekte Methode). Hierzu wurden Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 verwendet; als Antikörper diente anti-CD49f.

In Abb. 8 werden die Wiederfindungsraten der Zelllinie MDA-MB-231 in der direkten sowie der indirekten Anreicherungsmethode durch CELLection-Beads verglichen. Die Anreicherung in der direkten Methode erzielte eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 7,88 ± 4,45 %. Die Ergebnisse der indirekten Anreicherungsmethode zeigten eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 37,39 ± 7,89 %. Diese lag also verglichen mit den Ergebnissen der direkten Methode 4,7-mal höher. Alle nachfolgenden *Spike-in* Versuche basieren deshalb auf der Verwendung von CELLection-Beads in der indirekten Methode.

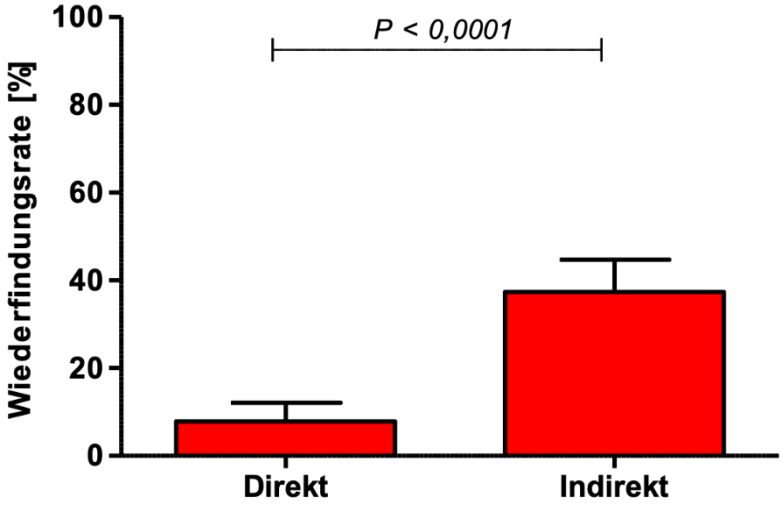

Abb. 8. Anreicherung von Tumorzellen durch CELLection-Beads. Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 wurde unter der Verwendung von anti-CD49f mit CELLection-Beads angereichert. Die Wiederfindungsraten (in %) der Tumorzellen werden in der Anwendung der direkten und indirekten Anreicherungsmethode gegenübergestellt. Dargestellt sind MW ± SD. Der P-Wert wurde mit einem zweiseitigen T-Test getestet.

4.3.3 Testung unterschiedlicher Antikörper-Konzentrationen

Da die Konzentration der verwendeten Antikörper variabel ist, wurde diese austitriert, um diejenige Konzentration zu bestimmen, die eine höchstmögliche Wiederfindungsrate erzielte. Die Antikörper gegen Trop-2 sowie gegen CD49f wurden dabei unabhängig voneinander getestet. Zusätzlich zu einer Isotypkontrolle erfolgte auch eine Zugabe von ausschließlich ungebundenen CELLection Beads, um eine unspezifische Bindung der Beads an die Tumorzellen auszuschließen.

Zur Titration der Konzentration des CD49f-Antikörpers wurden Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 verwendet, die durch CELLection-Beads in der indirekten Methode angereichert wurden. Der Antikörper wurde in den Konzentrationen 0,2 µg; 0,6 µg; 1,8 µg; 3,6 µg sowie 7,2 µg getestet.

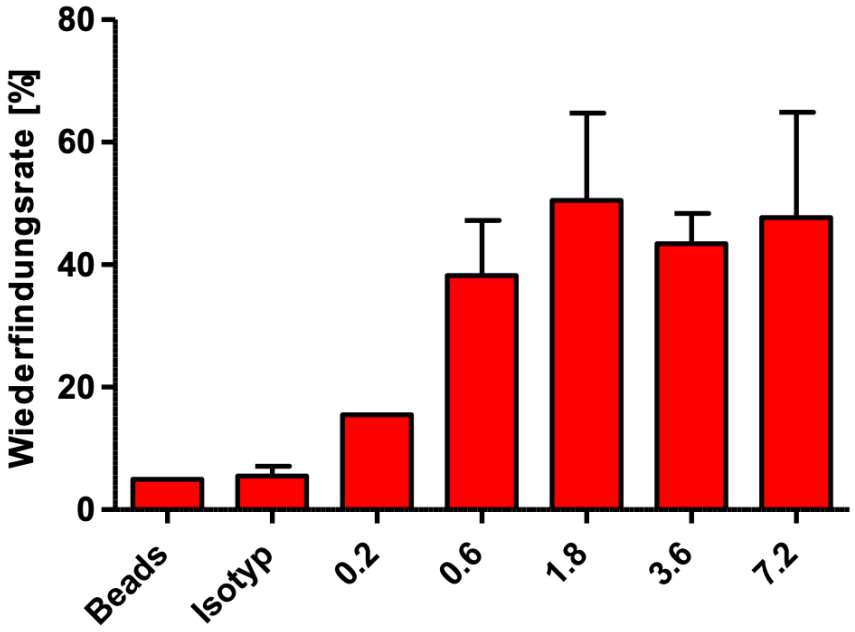

Abb. 9. Titration der anti-CD49f Konzentration. Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 wurden durch CELLection-Beads in der indirekten Methode und unterschiedlichen anti-CD49f Konzentrationen angereichert. Die getesteten Konzentrationen von anti-CD49f (in µg) sind gegen deren Wiederfindungsraten (in %) der Tumorzellen aufgetragen. Dargestellt sind MW ± SD.

Es wurde eine Erhöhung der Wiederfindungsraten mit steigender Konzentration des CD49f-Antikörpers festgestellt. Bei der Verwendung von 1,8 µg anti-CD49f wurde mit durchschnittlich 50,52 ± 14,26 % ein Plateau der Wiederfindungsrate erreicht. Diese ließ sich durch die Zugabe von höheren Konzentrationen nicht mehr steigern. Die unspezifische Anreicherung, ohne Kopplung durch anti-CD49f, führte zu sehr geringen Wiederfindungsraten (ungekoppelte Beads: 4,95 %; Isotypkontrolle: 5,52 ± 1,56 %).

Um die Konzentration des Trop-2-Antikörpers zu definieren, wurden Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 verwendet, die durch CELLection-Beads in der indirekten Methode durch das IsoFlux-System angereichert wurden. Auch hier wurden ungebundene Beads und eine Isotypkontrolle als Negativkontrollen eingesetzt und folgende Konzentrationen von anti-Trop-2 getestet: 0,0375 µg, 0,09375 µg, 0,375 µg, 0,75 µg, 1,5 µg, 2,25 µg, 4,5 µg, 9,0 µg, 18,0 µg sowie 27,0 µg.

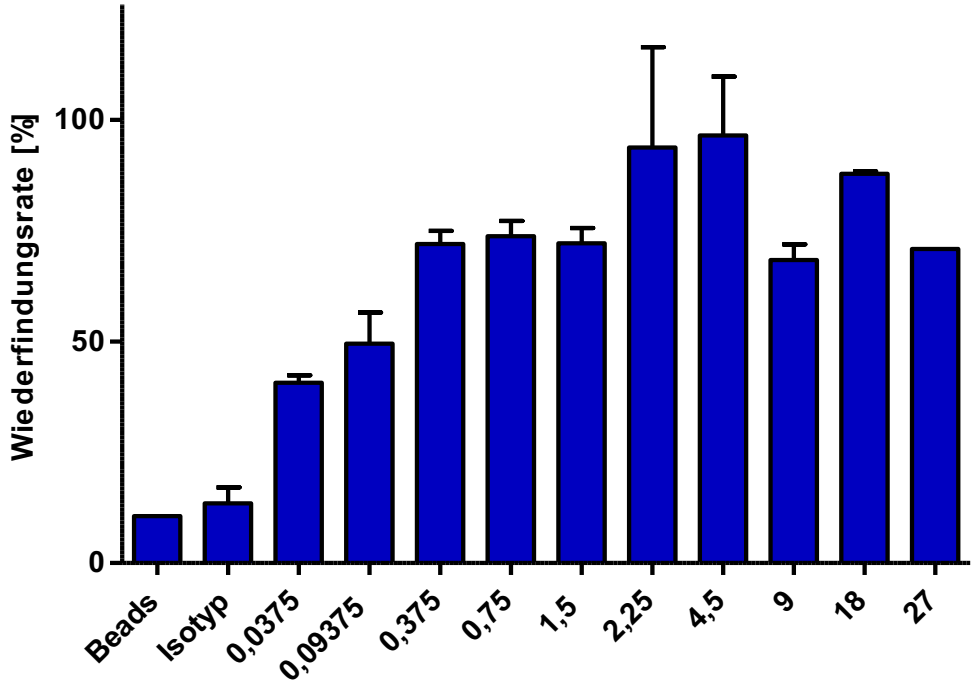

Abb. 10. Titration der anti-Trop-2 Konzentration. Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 wurden durch CELLection-Beads in der indirekten Methode und unterschiedlichen anti-Trop-2 Konzentrationen angereichert. Die getesteten Konzentrationen von anti-Trop-2 (in µg) sind gegen deren Wiederfindungsraten (in %) der Tumorzellen aufgetragen. Dargestellt sind MW ± SD.

Die Wiederfindungsrate der Tumorzellen stieg mit der Erhöhung der Konzentration des Trop-2 Antikörpers an. Bei der Verwendung von 2,25 µg bzw. 4,5 µg anti-Trop-2 wurde mit durchschnittlich 93,80 ± 22,61 % bzw. 96,48 ± 13,29 % eine maximale Wiederfindungsrate erreicht. Weitere Steigerungen der Antikörper-Konzentrationen konnten im Sinne der Wiederfindungsrate keinen Zugewinn bringen. Eine unspezifische Anreicherung der Tumorzellen lag auf geringem Niveau; durch ungebundene Beads ließen sich 10,59 % der Tumorzellen wiederfinden, die Anreicherung durch eine Isotypkontrolle erbrachte durchschnittlich 13,50 ± 3,62 %.

Verglichen mit den Wiederfindungsraten durch den CD49f-Antikörper (vgl. Abb. 9) lagen die des Trop-2 Antikörpers prozentual etwas höher. Auch erbrachte die Verwendung von 4,5 µg anti-Trop-2 verglichen zu 2,25 µg eine geringfügige Steigerung der Wiederfindungsraten. Da diese allerdings nur minimal war, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf diese Erhöhung verzichtet.

4.3.4 Kombinierte Anwendung der Antikörper

Zur weiteren Etablierung des *Workflows* zur Anreicherung von Tumorzellen, sollten die Wiederfindungsraten durch die Antikörper anti-Trop-2 sowie anti-CD49f im Einzelgebrauch, derjenigen durch den kombinierten Einsatz beider Antikörper gegenübergestellt werden. Hierzu wurden Tumorzellen der Zelllinien SK-BR-3, T-47D sowie MDA-MB-231 durch CELLection-Beads in der indirekten Methode im IsoFlux-System angereichert. Beide Antikörper wurden in den zuvor austitrierten Konzentrationen eingesetzt (vgl. Abb. 9 und Abb. 10). In Abb. 11 sind die Wiederfindungsraten aller Zelllinien für die Anreicherungen mit anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f im Einzelgebrauch, sowie deren Kombination dargestellt.

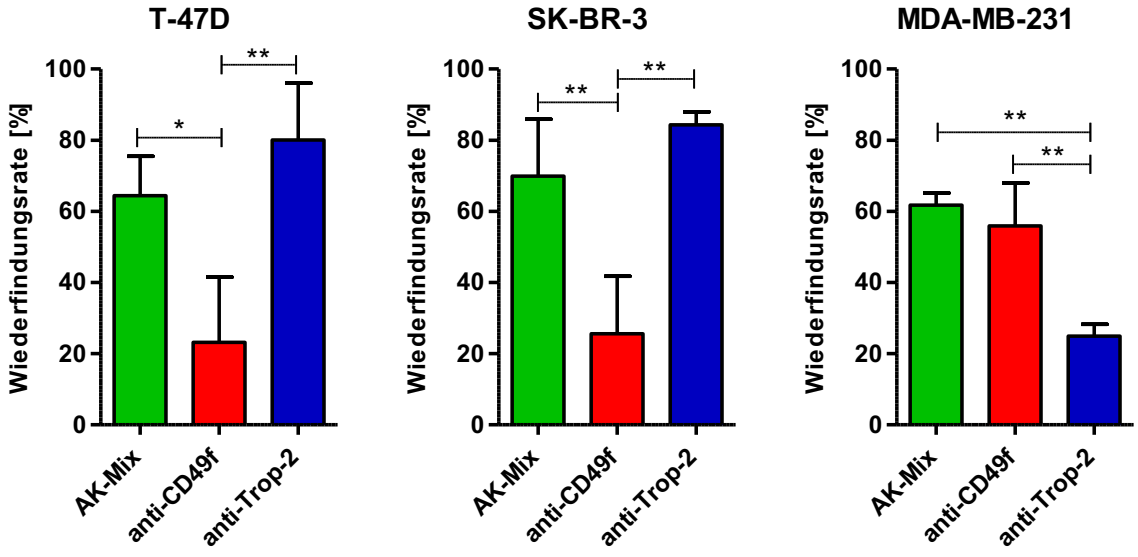

Abb. 11. Anreicherung von Tumorzellen durch den AK-Mix. Die Tumorzellen der Zelllinien T-47D, SK-BR-3 sowie MDA-MB-231 wurden mit CELLection-Beads in der indirekten Methode angereichert. Dabei wurden jeweils anti-Trop-2 und anti-CD49f allein eingesetzt, sowie deren Kombination (AK-Mix) getestet. Die Wiederfindungsraten (in %) der Tumorzellen entsprechender Zelllinien sind für den AK-Mix und anti-Trop-2 sowie anti-CD49f aufgetragen. Dargestellt sind MW ± SD. Die p-Werte wurden mittels *One Way ANOVA* ermittelt. Dargestellt sind nur signifikante p-Werte.

Die Zelllinie SK-BR-3 zeigte mit durchschnittlich 84,31 ± 3,66 % die höchste Wiederfindungsrate bei dem Einsatz von anti-Trop-2 im Einzelgebrauch. Die Verwendung des Antikörper-Mixes erbrachte im Mittel 69,86 ± 16,05 %. Eine geringe Rate ließ sich durch anti-CD49f erreichen (25,59 ± 16,20 %). Auch bei der Anreicherung von Tumorzellen der Zelllinie T-47D erbrachte der Trop-2-Antikörper die höchste Wiederfindungsrate (80,07 ± 15,97 %). Die Antikörper-Kombination zeigte durchschnittlich 64,37 ± 11,08 % angereicherte Tumorzellen und durch die Verwendung von anti-CD49f ließen sich 23,18 ± 18,30 % der Zellen wiederfinden. Bei Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231

wurden vergleichbare Wiederfindungsraten beim Einsatz sowohl des Antikörper-Mixes (61,78 ± 3,41 %) als auch von anti-CD49f im Einzelgebrauch (55,93 ± 12,08 %) nachgewiesen. Anti-Trop-2 reicherte im Mittel 24,95 ± 3,31 % der Tumorzellen an.

4.4 Präzisierung des finalen Workflows

4.4.1 Färbung der angereicherten Tumorzellen

Die in Patientenproben enthaltenen Tumorzellen können, anders als bei Spike-in Experimenten, nicht vor der Anreicherung im IsoFlux-System gefärbt werden. Deshalb mussten Patientenproben im Anschluss gefärbt werden. Die Färbung erfolgte hierbei anhand eines standardisierten Protokolls, sodass das Waschen der Zellen im Nachgang, die veränderbare Variable darstellte. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet und die Wiederfindungsraten der Tumorzellen gegenübergestellt. Dazu wurden Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 durch den AK-Mix im IsoFlux-System angereichert, anschließend gefärbt und gewaschen.

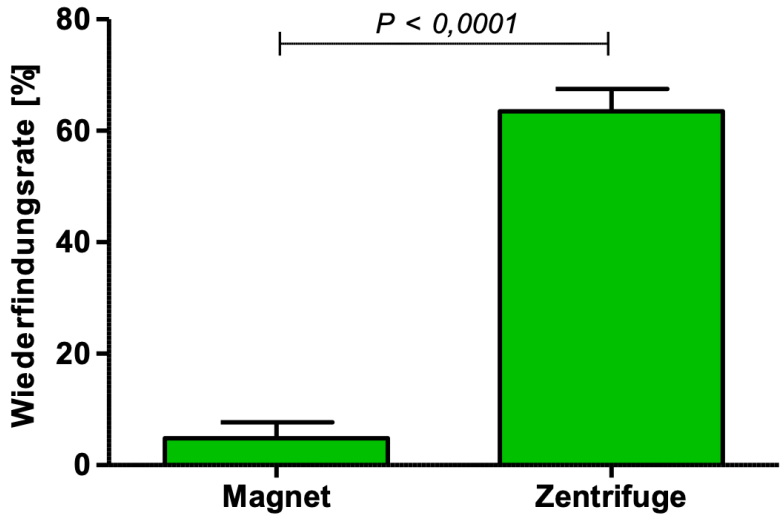

Abb. 12. Vergleich von Waschmethoden während der Färbung von Tumorzellen. Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 wurden mit dem AK-Mix und CELLection-Beads in der indirekten Methode angereichert. Während der Färbung von Tumorzellen im Anschluss an die Anreicherung wurden Waschmethoden mit einem Magneten und einer Zentrifuge gegenübergestellt. Verglichen wurden die Wiederfindungsraten (in %) der Tumorzellen. Dargestellt sind MW ± SD. Der P-Wert wurde durch einen zweiseitigen T-Test ermittelt.

Wie in Abb. 12 dargestellt, erbrachte der manuelle Waschschritt der Tumorzellen mit einem Magneten, der an Beads gebundene Tumorzellen sammeln sollte, eine Wiederfindungsrate

von 4,86 ± 2,83 %. Im Gegensatz dazu konnten Tumorzellen auch durch die Verwendung einer Zentrifuge, gewaschen werden. Das führte mit 63,48 ± 4,03 % zu deutlich höheren Widerfindungsraten.

4.4.2 Ablösung der magnetischen Beads

Nach der Anreicherung und Färbung der Tumorzellen, wurden CELLection-Beads von den Zellen abgelöst. Dies erfolgte über eine spezifische DNase, die die Bindungsstelle des Biotinankers spalten und so die Beads von den Tumorzellen lösen konnte. Zur späteren Einzelzellisolation war dies von entscheidender Wichtigkeit, da eine präzise Detektion der Zellen ansonsten unmöglich wäre. Zur Überprüfung eines möglichen Verlustes von Tumorzellen durch die Ablösung der Beads wurden SK-BR-3 Tumorzellen durch den AK-Mix angereichert. Es wurden die Wiederfindungsraten nach Ablösung der Beads mit jenen von gebundenen Beads verglichen und die abgelösten Bead-Reste untersucht (vgl. Abb. 13).

Abb. 13. Ablösung der CELLection-Beads von Tumorzellen. Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 wurden durch den AK-Mix und CELLection-Beads in der indirekten Methode angereichert und anschließend gefärbt. Die Wiederfindungsraten (in %) von Tumorzellen nach Ablösung der magnetischen Beads (-Beads) werden denen ohne Ablösung der Beads (+Beads) gegenübergestellt. Die Analyse der Bead-Reste diente als Kontrollprobe. Dargestellt sind MW ± SD.

Die Wiederfindungsrate von 46,95 ± 6,30 % nach Ablösung der Beads im Gegensatz zu 40,39 ± 16,82 % mit gebundenen Beads machte deutlich, dass durch die Spaltung mittels DNase keine relevanten Verluste an Tumorzellen aufgetreten sind. In der Auswertung der Bead-Reste ließen sich, bis auf einzelne Ausnahmen, keine gebundenen Tumorzellen finden (2,49 ± 1,70 %).

4.4.3 Test des finalen *Workflows*

Nach Präzisierung der einzelnen Arbeitsschritte des *Workflows* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen, wurde der gesamte etablierte *Workflow* abschließend getestet. Hierzu wurden Tumorzellen der Zelllinien T-47D und SK-BR-3 verwendet und deren Wiederfindungsraten bestimmt, die in Abb. 14 dargestellt sind.

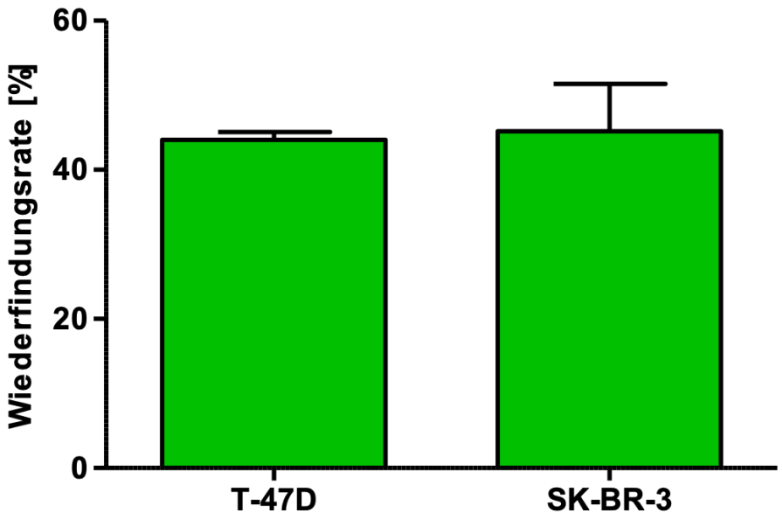

Abb. 14. Finaler Test des *Workflows*. Der gesamte etablierte *Workflow* zur Anreicherung von Tumorzellen wurde anhand der Zelllinien T-47D und SK-BR-3 final getestet. Die Anreicherung erfolgte durch den AK-Mix und CELLection-Beads in der indirekten Methode, darauf folgten Färbung und Ablösung der Beads. Dargestellt sind die Wiederfindungsraten (in %) der eingesetzten Zelllinien. Die Darstellung erfolgt als MW ± SD.

Die Wiederfindungsraten der Tumorzellen sowohl der Zelllinie SK-BR-3 als auch von T-47D lagen auf demselben Niveau. 45,20 ± 6,32 % der Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 konnten angereichert werden, bei der Zelllinie T-47D lag die Rate bei 44,03 ± 1,06 %. Insgesamt zeigte sich, dass die manuellen Arbeitsschritte, wie Färbung der Tumorzellen und Ablösung der Beads, nach Anreicherung im IsoFlux-System zu einer Verringerung der Wiederfindungsraten führten (vgl. Abb. 11).

4.5 Variablen, die die Anreicherung der Tumorzellen beeinflussen könnten

4.5.1 Einfluss der Zellfixierung

Gesundes Spenderblut für Spike-in Experimente wurde zumeist in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurden im Gegensatz dazu regelhaft in *CellSave*-Röhrchen gelagert. Nur so war eine Aufarbeitung der Proben einige Tage nach der Blutentnahme möglich, ohne dass es zu Verlusten der DNA-Integrität von Tumorzellen kam. Es wurde also der Einfluss des verwendeten Reagenzes auf die Wiederfindungsraten der Tumorzellen untersucht. Hierzu wurden die Wiederfindungsraten von Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 in EDTA-Blut denen in *CellSave*-Blut nach einem und drei Tagen gegenübergestellt.

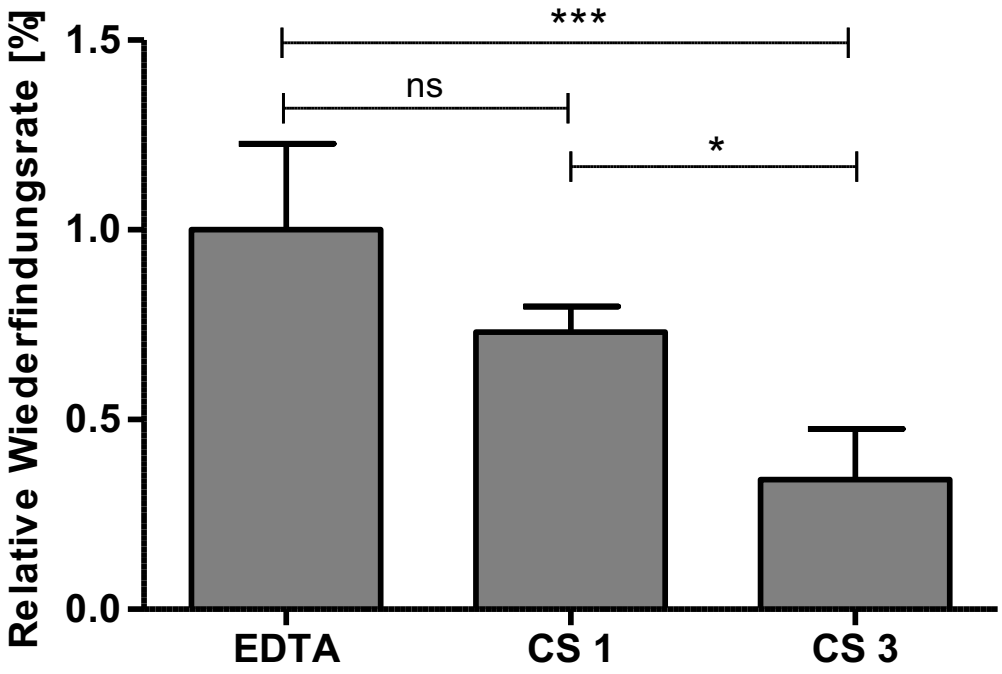

Abb. 15. Vergleich von EDTA- und *CellSave*-Blutproben. Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 wurden entweder in EDTA gelöst oder in *CellSave* fixiert und mit dem AK-Mix sowie CELLection-Beads in der indirekten Methode angereichert. EDTA-Blutproben wurden mit *CellSave*-fixierten Proben nach einem und drei Tagen verglichen. Dargestellt sind die relativen Wiederfindungsraten (in %) der Tumorzellen bei Einsatz des jeweiligen Reagenzes. Die Darstellung erfolgt als MW ± SD. P-Werte wurden durch einen *One Way ANOVA test* getestet. CS 1: *CellSave* an Tag 1. CS 3: *CellSave* an Tag 3. * für p <0,05, *** für p <0,001, ns = nicht signifikant.

Es erfolgte, wie in Abb. 15 dargestellt, eine Normalisierung der Wiederfindungsraten auf die Ergebnisse mit EDTA-Blut (1,0 ± 0,23). Durch die Verwendung von *CellSave*-fixiertem

Blut nahmen die Wiederfindungsraten insgesamt ab. So konnte eine Rate von 65 ± 3,90 % für *CellSave*-Blut nach einem Tag erzielt werden. Bei drei Tage gelagertem *CellSave*-Proben lag dieser noch bei 34,13 ± 13,38 %.

4.5.2 Etablierung des *Workflows* anhand von Patientenproben

Anhand drei Patientenproben erfolgte ein Vergleich der Anreicherungen durch den AK-Mix gegenüber anti-Trop-2 und anti-CD49f im Einzelgebrauch. In Abb. 16 ist die Anzahl der angereicherten Tumorzellen der Patientenproben jeweils für den AK-Mix, anti-Trop-2 und anti-CD49f dargestellt. Außerdem wurde die CTC-Anzahl auf 7,5 ml Patientenblut hochgerechnet. Für die EpCAM-unabhängige Methode im IsoFlux-System wurden 5 ml Blut der Patientinnen verwendet, im CellSearch jedoch 7,5 ml eingesetzt. Um einen Vergleich der CTC-Zahlen zu ermöglichen, wurden die Zahlen auf dieselbe Menge Blut kalkuliert.

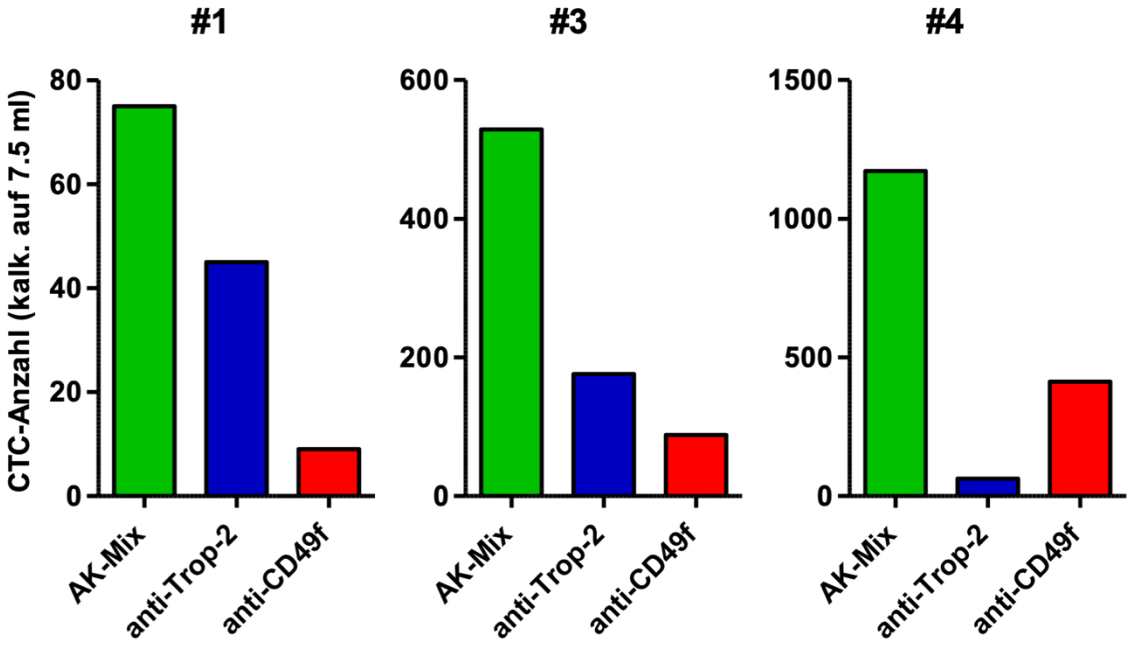

Abb. 16. CTC-Anzahlen in drei exemplarischen Patientenproben. Drei Patientenproben mit einer hohen Anzahl enthaltener CTCs, durch den CellSearch bestätigt, wurden zum Vergleich der Wiederfindungsraten durch den AK-Mix, verglichen mit anti-Trop-2 und anti-CD49f allein herangezogen. Die Anreicherung erfolgte anhand des etablierten *Workflows*. Die Identifikation der CTCs und Bestimmung der Zahlen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Darstellt sind für jede Patientin die CTC-Anzahl kalkuliert auf 7,5 ml Blut, da der CellSearch dieses Volumen analysiert, einzeln aufgetragen für AK-Mix, anti-Trop2- und anti-CD49f.

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen der Spike-in Experimente zeigten sich bei der Analyse der Patientenproben die höchsten CTC-Zahlen beim Einsatz des AK-Mixes. Diese

lagen deutlich über den Zahlen der angereicherten CTCs durch die Verwendung der Antikörper allein.

Außerdem wurden die EpCAM-Expressionen der CTCs dieser Patientenproben detailliert betrachtet. In Abb. 17 sind die analysierten Tumorzellen dargestellt, je nach verwendetem Antikörper (AK-Mix oder anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f allein) separat aufgeführt. Es zeigte sich, dass durch den AK-Mix sowohl die meisten CTCs als auch eine hohe Heterogenität bezogen auf die EpCAM-Expressionen, angereichert werden konnten. Außerdem wurde deutlich, dass das durchschnittliche Level der EpCAM-Expression zwischen den Patientinnen sehr verschieden ausfällt. Es ließ sich also eine große Streubreite der mittleren Fluoreszenzen der Tumorzellen zeigen.

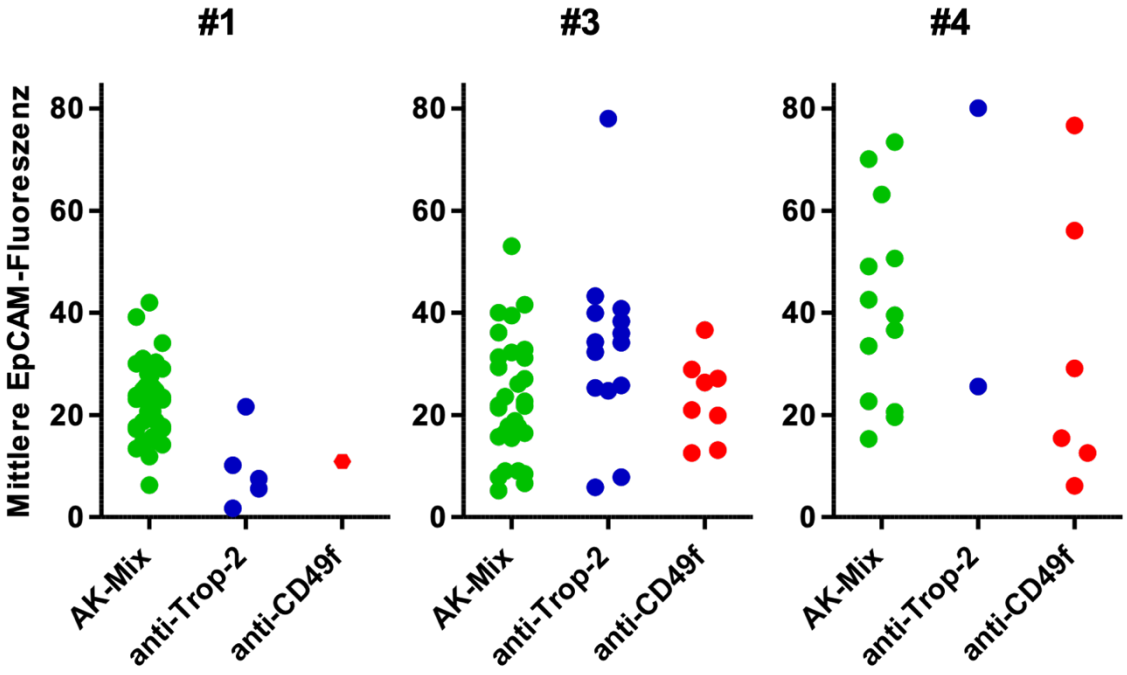

Abb. 17. EpCAM-Expression der CTCs aus drei exemplarischen Patientenproben. Drei Patientenproben mit einer hohen Anzahl enthaltener CTCs, durch den CellSearch bestätigt, wurden zum Vergleich ihrer EpCAM-Expressionen herangezogen. Die Anreicherung erfolgte anhand des etablierten *Workflows*. Die Identifikation der CTCs erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop; die anschließende Quantifizierung der EpCAM-Expressionen mittels ImageJ. Dabei wurden die mittleren EpCAM-Fluoreszenzen der identifizierten CTCs aus drei Patientinnen jeweils durch die Anreicherung mit dem AK-Mix, mit anti-Trop-2 oder anti-CD49f miteinander verglichen. Jeder • = 1 identifizierte CTC.

4.5.3 EpCAM-Expression im Verlauf von mehreren Tagen

Tumorzellen aus verschiedenen Blutproben waren nicht alle exakt gleich alt. Es war logistisch nicht möglich, die Blutproben der Patientinnen alle am Tag der Blutabnahme

umgehend zu prozessieren. Da trotzdem die EpCAM-Expressionen von Tumorzellen aus unterschiedlichen Blutproben miteinander verglichen werden sollten, erfolgte eine zeitliche Betrachtung der EpCAM-Expression auf Tumorzellen über fünf Tage hinweg. Dabei wurde untersucht, ob der zeitliche Faktor zu einer Änderung der EpCAM-Expression auf Tumorzellen führte. Es wurden Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 verwendet und am selben Tag, sowie im zeitlichen Verlauf durchflusszytometrisch auf ihre EpCAM-Expression untersucht.

An Tag 0 wurden die Tumorzellen umgehend isoliert und für die FACS-Analyse aufgearbeitet. Für die Betrachtung nach ein bis vier Tagen, wurden die Tumorzellen durch *CellSave* fixiert und am jeweiligen Tag durchflusszytometrisch untersucht. Die EpCAM-Expressionen an Tag 0 dienten als Referenzen, in deren Bezug die relativen Färbeintensitäten der weiteren Tage betrachtet wurden (vgl. Abb. 18).

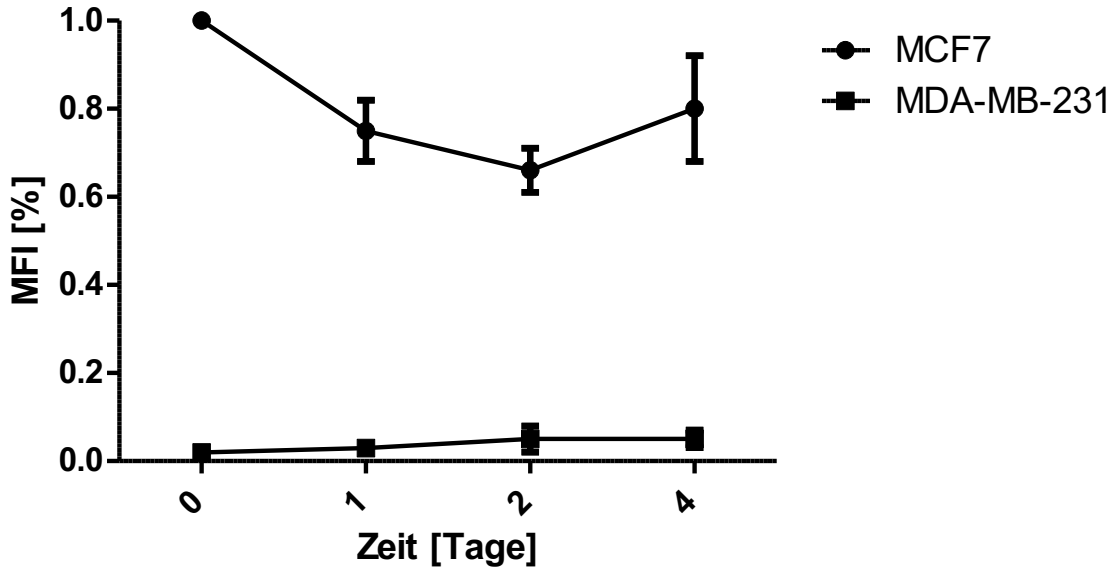

Abb. 18. EpCAM-Expression auf Tumorzellen im zeitlichen Verlauf mehrerer Tage. Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 aufgearbeitet und für EpCAM gefärbt. Die FACS-Analyse erfolgte für Tag 0 direkt im Anschluss an die Färbung. Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs wurden die Tumorzellen mit *CellSave* fixiert und am entsprechenden Tag gefärbt und ausgewertet. Dargestellt sind die relativen Färbeintensitäten (in %) für EpCAM in Bezug auf die Expressionsstärken an Tag 0. Dargestellt sind MW ± SD.

Die EpCAM-Expression auf den Oberflächen von Tumorzellen der Zelllinie MDA-MB-231 war nahezu gleichbleibend gering. Die EpCAM-Expression der Zelllinie MCF7 lag deutlich höher. Nach einem leichten Verlust der relativen Färbeintensität von Tag 0 zu Tag 1, verhielt sich die Expressionsstärke im weiteren Verlauf der Tage etwa konstant. Aus diesem Grund wurden Patientenproben ein bis drei Tage nach der Blutabnahme analysiert.

4.6 Isolation von CTCs aus Patientenproben

4.6.1 EpCAM-Referenz

Ein Ziel der Arbeit war es, die EpCAM-Expression von Tumorzellen aus verschiedenen Patientinnen miteinander zu vergleichen. So sollten diese in EpCAM-hoch und -gering exprimierende Tumorzellen unterteilt werden. Um diese Einteilung vornehmen zu können, waren Vergleichswerte notwendig, durch die eine starke bzw. schwache EpCAM-Expression definiert wurden. Dafür wurden MDA-MB-231 als EpCAM-gering exprimierende Zelllinie und MCF7 als EpCAM-hoch exprimierende Zelllinie verwendet (vgl. Abschnitt 4.5.3). Die Tumorzellen wurden nach dem etablierten *Workflow* angereichert, gefärbt und es wurden die Beads abgelöst. Anschließend erfolgte die Bestimmung der mittleren EpCAM-Fluoreszenzstärken der Zellen, jeweils auf Zytospins fixiert sowie in Suspension, an einem Fluoreszenzmikroskop. Anhand dieser Werte, dargestellt in Abb. 19, ließen sich im weiteren Verlauf die EpCAM-Expressionen auf CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen detaillierter einordnen und klassifizieren.

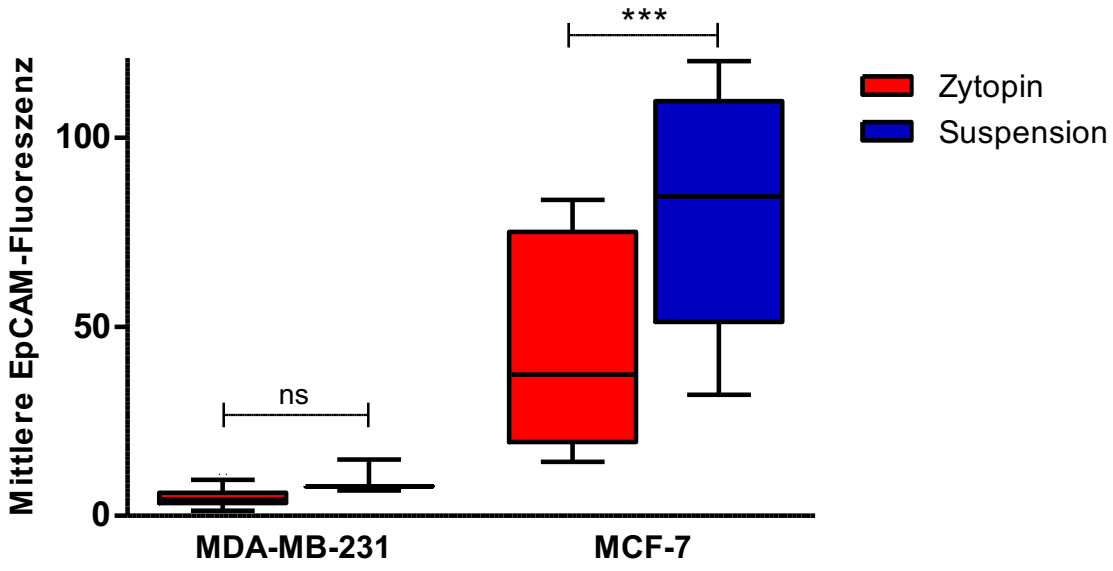

Abb. 19. EpCAM-Referenz zur Kategorisierung der EpCAM-Expression von CTCs. Tumorzellen der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 wurden anhand des etablierten Protokolls angereichert und anschließend für EpCAM gefärbt. Die Identifikation der Tumorzellen am Fluoreszenzmikroskop erfolgte jeweils in Suspension und auf Zytospins fixiert. Im Anschluss wurde die EpCAM-Expression jeder identifizierten Tumorzelle durch ImageJ quantifiziert. Dargestellt sind Median mit 25 %- und 75 %-Quartilen, sowie *Whiskers* mit 5 %- und 95 %-Intervallen. Die Ermittlung des P-Wertes erfolgte durch einen *Two Way ANOVA* mit *posthoc Sidak's multiple comparisons test.* *** für p <0,001.

4.6.2 EpCAM-Expression auf zirkulierenden Tumorzellen

Zum Vergleich der EpCAM-Expressionen von CTCs aus metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen wurden 20 Blutproben aus der Augusta- und den DETECT-Studien analysiert. Die Proben wurden anhand des zuvor etablierten *Workflows* angereichert. Im Anschluss wurden sie für DAPI, CK, EpCAM sowie CD45 gefärbt. Die Proben wurden anschließend auf Zytospins fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, wobei nur jene CTCs gewertet wurden, die DAPI-positiv, CK-positiv sowie CD45-negativ waren. Die Bestimmung der EpCAM-Expression erfolgte durch die Bildanalysesoftware ImageJ, wobei jeweils die mittlere Fluoreszenzstärke bestimmt wurde.

Die Abb. 20 zeigt die Verteilung der EpCAM-Expressionen der CTCs aus den untersuchten Patientenproben. Dabei wurden sowohl Blutproben mit vielen darin enthaltenen CTCs als auch Proben mit nur einzelnen Tumorzellen berücksichtigt. Anhand der EpCAM-Referenzen durch die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF7 konnte die Verteilungsbreite der EpCAM-Expression bestimmt werden. Es konnte keine strenge Unterteilung in EpCAM-positive und -negative Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich viel mehr eine Streubreite aus EpCAM-hoch und -gering exprimierenden Tumorzellen mit variablem Verteilungsmuster.

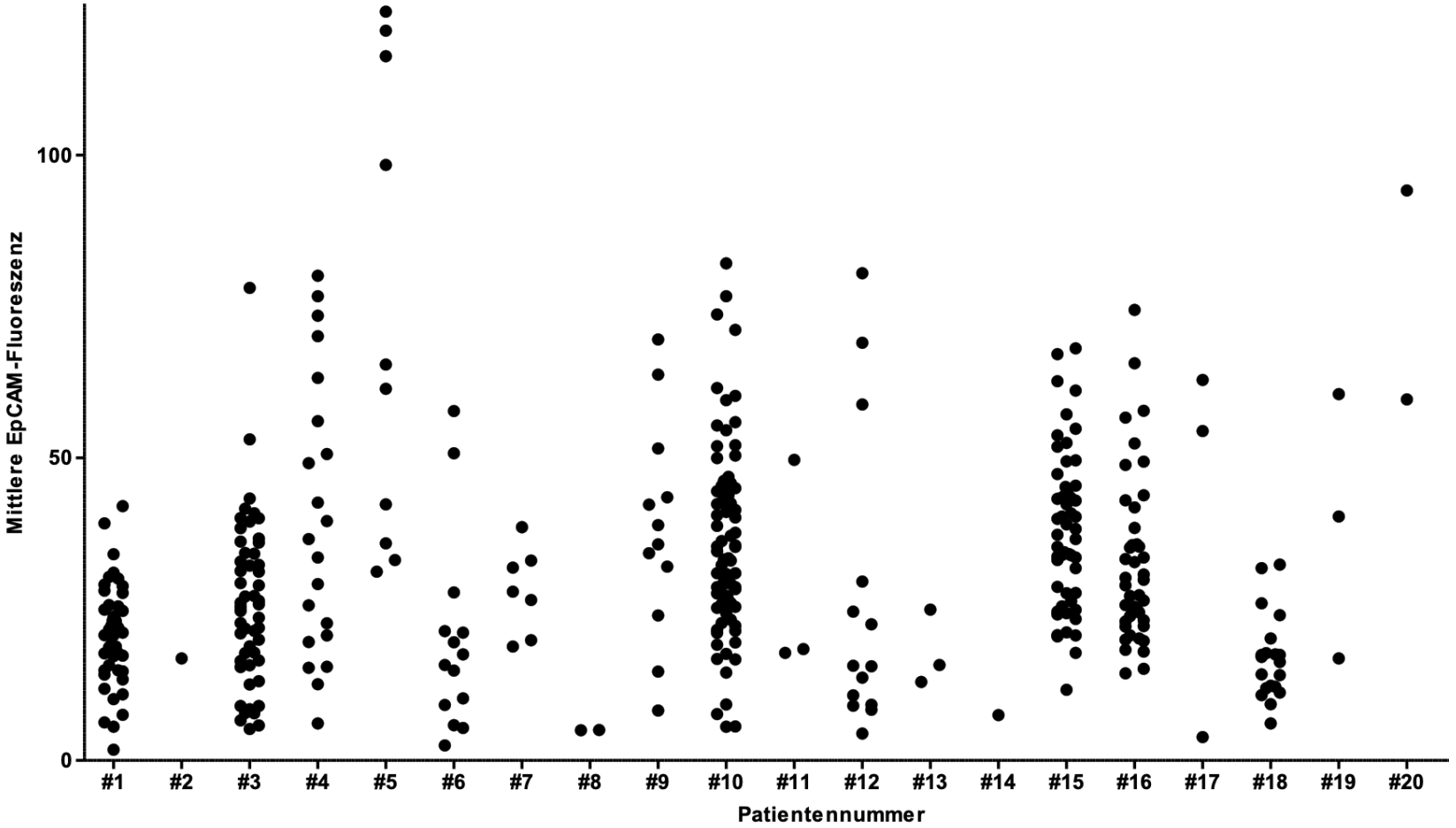

Abb. 20. EpCAM-Expression der CTCs von Brustkrebspatientinnen. Die Anreicherung der Tumorzellen aus 20 Patientenproben erfolgte anhand des zuvor etablierten *Workflows* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von CTCs. Die angereicherten Proben wurden auf Zytospins fixiert. Die Identifikation der CTCs erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Quantifizierung der EpCAM-Expressionen auf den Tumorzellen erfolgte mittels ImageJ. Dargestellt ist die mittlere EpCAM-Fluoreszenz jeder einzelnen identifizierten CTC, kategorisiert nach der jeweiligen Patientin. • = 1 CTC. n=466 CTCs aus 20 Proben.

Bezugnehmend auf Abb. 20 wurde in Abb. 21 ist exemplarisch eine EpCAM-hoch exprimierende Tumorzelle einer EpCAM-gering exprimierenden Tumorzelle aus der selben Patientin gegenübergestellt. Das zeigt ebenso die Streubreite der EpCAM-Expression innerhalb einer Patientenprobe.

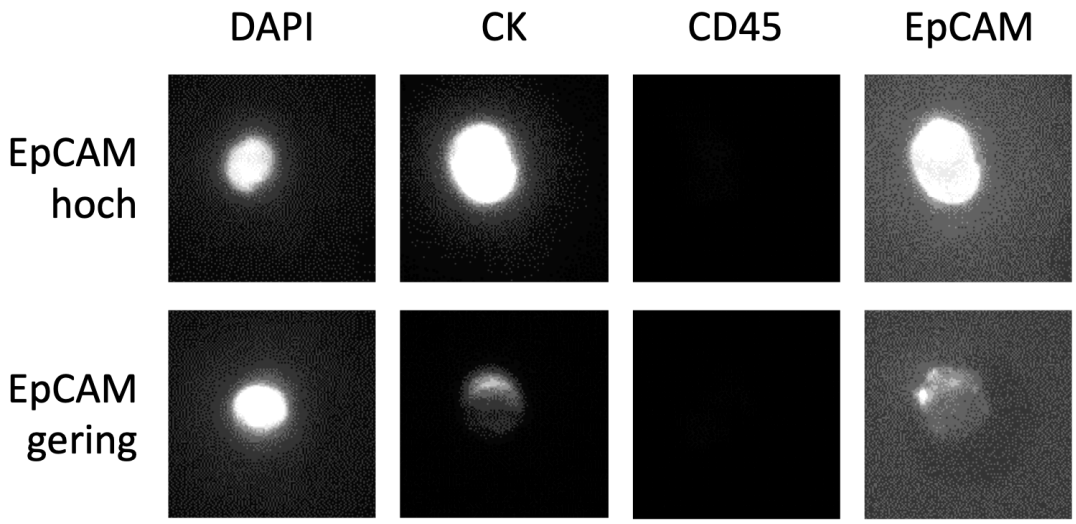

Abb. 21. EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierende CTCs. Nach Anreicherung der CTCs anhand des etablierten Protokolls, erfolgte die Identifikation der Tumorzellen (CK-positiv, DAPI-positiv, CD45-negativ) an einem Fluoreszenzmikroskop. Nach anschließender Quantifizierung der EpCAM-Expression durch ImageJ, wurde die Tumorzelle mit der höchsten, derjenigen mit der niedrigsten mittleren EpCAM-Fluoreszenz gegenübergestellt. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Eine Vergrößerung von 40x wurde angewendet.

4.7 Charakterisierung von EpCAM-positiven und EpCAM-negativen CTCs

Im dritten Teil der Arbeit sollten sowohl EpCAM-positive als auch EpCAM-gering exprimierende CTCs vergleichend charakterisiert werden. Zur Analyse von chromosomalen Aberrationen der CTCs erfolgte eine Einzelzellisolation mithilfe des CellCelectors. Dazu wurden die Proben im Anschluss an die Anreicherung durch das zuvor etablierte Verfahren mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop analysiert. Anschließend erfolgte die Einzelzellisolation der CTCs durch einen Mikromanipulator. So war eine weitere Verarbeitung zur Extraktion und Amplifikation der genomischen DNA jeder einzelnen Tumorzelle möglich.

4.7.1 DNA-Qualität der CTCs

Die DNA-Qualitäten der amplifizierten CTCs in der *Whole Genome Amplification* (WGA) ist variabel und von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig. Polzer et al. definierten über die Anzahl der Amplifikate den *Genome Integrity Index* (GII), anhand dessen eine Prognose über den Erfolg weiterer Analysen gestellt werden sollte. Vier Amplifikate stehen dabei für die höchste Qualität der WGA. Auch drei Amplifikate sind mit einer ausreichend guten Qualität verbunden. Null, ein oder zwei Amplifikate gelten allerdings als Hinweis auf eine geringe DNA-Qualität (171). Für die Chromosomenanalyse der CTCs in dieser Arbeit sollten ausschließlich WGA-Produkte mit einem GII ≥ 3 zur weiteren Verarbeitung verwendet werden. In Abb. 22 sind die DNA-Qualitäten der Tumorzellen unter dem Einfluss verschiedener Methoden zum Ablösen der magnetischen Beads dargestellt.

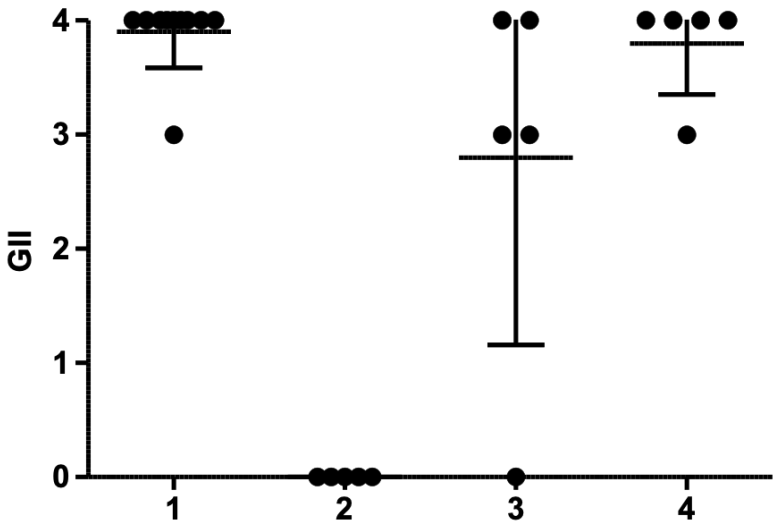

Abb. 22. DNA-Qualität nach unterschiedlichen Methoden zum Ablösen der Beads. Dargestellt sind verschiedene Varianten zum Ablösen der Beads: 1) Zellen werden gefärbt, aber Beads nicht abgelöst; 2) Standardprotokoll: erst Färbung, anschließend werden Beads abgelöst; 3) Beads werden erst abgelöst und anschließend gefärbt (1x Waschen); 4) Beads werden erst abgelöst und anschließend gefärbt (2x Waschen). Die jeweilige DNA-Qualität der Tumorzellen ist als *Genome Integrity Index* (GII) dargestellt. Jeder • = entsprechende DNA-Qualität einer Tumorzelle. Zusätzlich sind MW ± SD dargestellt.

Das zuvor etablierte Standardprotokoll zur Anreicherung der CTCs sah zunächst eine Färbung der Zellen und im Anschluss das Ablösen der Beads vor. Dies führte allerdings ausschließlich zu unbrauchbaren DNA-Qualitäten mit GII 0 (5/5). Eine Veränderung der Reihenfolge, die zunächst die Bead-Ablösung vorsah und die Färbung im Anschluss folgte,

zeigte nach gründlichem Waschen der Zellen bestmögliche DNA-Qualitäten (GII 4: 4/5; GII 3: 1/5).

4.7.2 Chromosomale Aberrationen und Mutationen von CTCs

Die Auswahl der zu analysierenden CTCs erfolgte aus Proben von drei Index-Patientinnen, in denen sich ausreichend viele CTCs anreichern ließen. In allen Proben wurden jeweils die EpCAM-Expressionen bestimmt. Die Auswahl der Tumorzellen erfolgte anhand der höchsten und der geringsten EpCAM-Expressionen innerhalb der gleichen Patientin, wie in Abb. 23 dargestellt. Dazu wurden aus den Proben mehrere EpCAM-hoch sowie -gering exprimierende CTCs ausgewählt und einzeln isoliert. Im Anschluss konnte eine Amplifikation der genomischen DNA jeder Tumorzelle erfolgen, wobei jeweils auf einen GII ≥ 3 geachtet wurde.

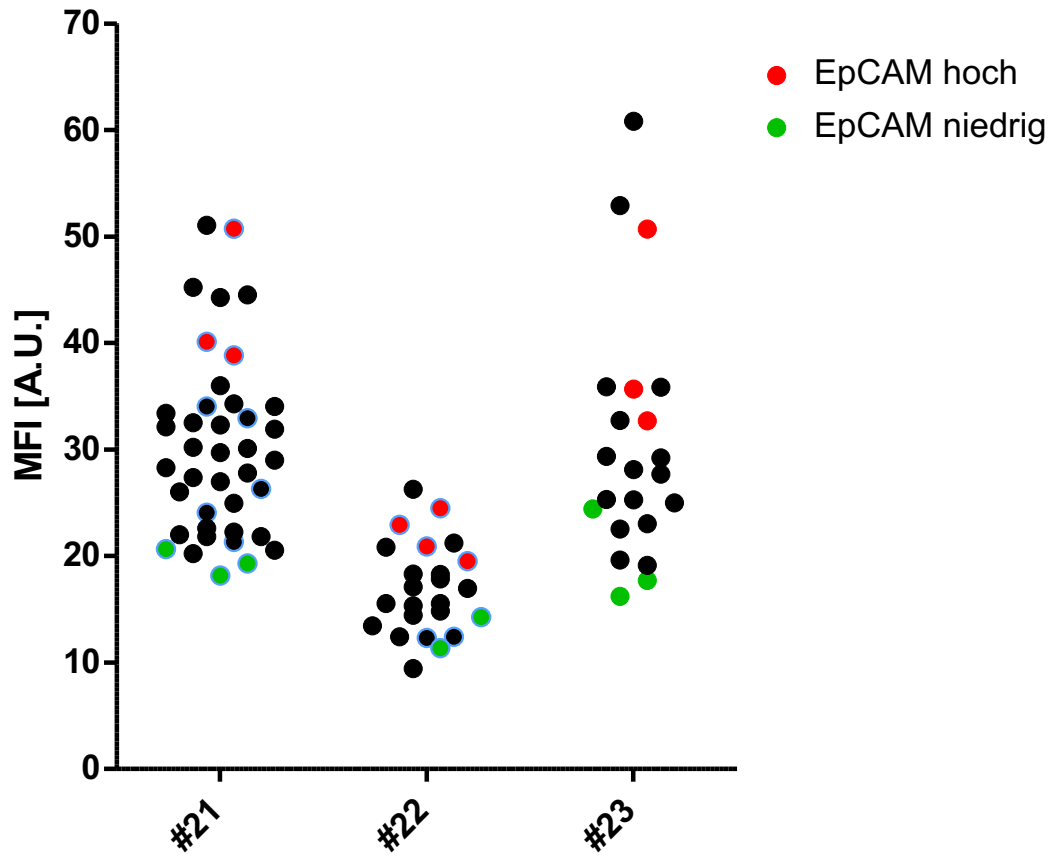

Abb. 23. Zellauswahl für die *Low Pass* Sequenzierung. Die Patientenproben #21, #22 und #23 wurden anhand des etablierten *Workflows* angereichert und in Suspension gefärbt. Nach Identifikation der CTCs und Quantifizierung der EpCAM-Expressionen dieser Tumorzellen, erfolgte die Einzelzellisolation mithilfe des CellCelectors. Dargestellt sind die identifizierten CTCs der Patientenproben nach ihrer mittleren EpCAM-Fluoreszenz. • = 1 CTC. • = ausgewählte EpCAM-

positive CTCs. • = ausgewählte EpCAM-gering exprimierende CTCs. • = CTCs für die Mutationsanalyse. Die Auswahl erfolgte außerdem nach DNA-Qualität ≥ GII 3.

Die Analyse chromosomaler Aberrationen der Tumorzellen erfolgte mittels *Low Pass Sequencing*. In Abb. 24 sind die komparativen Analysen der Sequenzierungen von den zuvor ausgewählten EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierenden Tumorzellen der Patientenproben #21, #22 sowie #23 dargestellt.

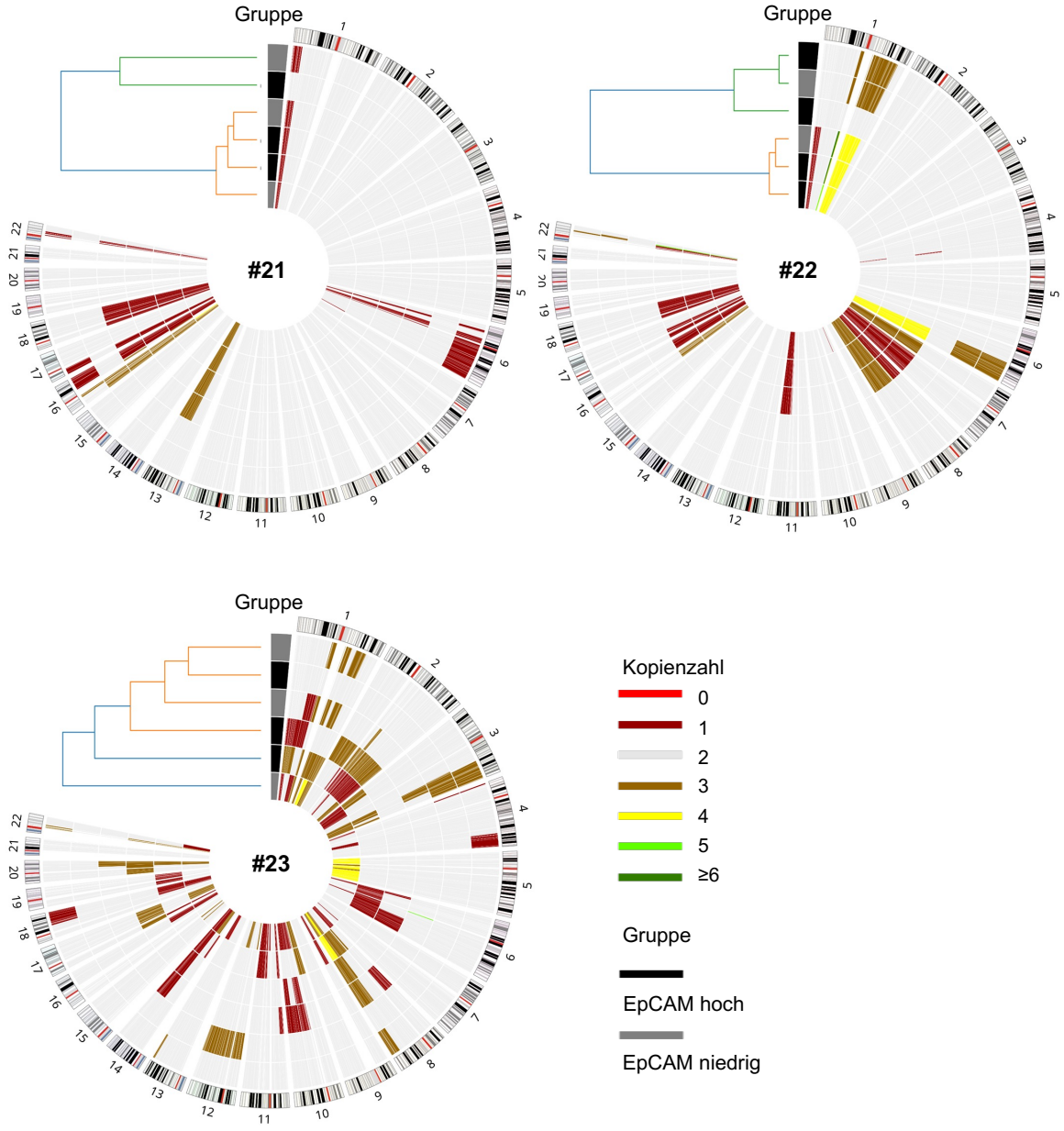

Abb. 24. Chromosomale Aberrationen durch *Low Pass Sequencing*. Chromosomale Aberrationen der ausgewählten Tumorzellen sind anhand der unterschiedlichen Kopienanzahl dargestellt. Die Gruppierung erfolgte in EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierende Tumorzellen.

In zwei der EpCAM-hoch exprimierenden CTCs ließen sich nahezu keine chromosomalen Aberrationen detektieren (vgl. Abb. 24). Trotzdem erfüllten diese Zellen die Kriterien zur Identifikation als Tumorzelle in der Immunfluoreszenz-Analyse. Außerdem zeigte sich insgesamt keine eindeutigen Unterschiede der chromosomalen Aberrationen von EpCAM-hoch sowie EpCAM-gering exprimierenden Tumorzellen.

Nach Analyse der chromosomalen Aberrationen sollten exemplarische Mutationsanalysen von EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierenden Tumorzellen durchgeführt werden. Mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) wurden Brustkrebs-typische *Hotspot*-Mutationen in Genen wie *AKT1*, *ERBB2* sowie *PIK3CA* untersucht. In Abb. 25 sind die NGS-Ergebnisse der Patientenproben #21 und #22 dargestellt. In den CTCs aus Probe #23 konnten keine typischen Mutationen nachgewiesen werden.

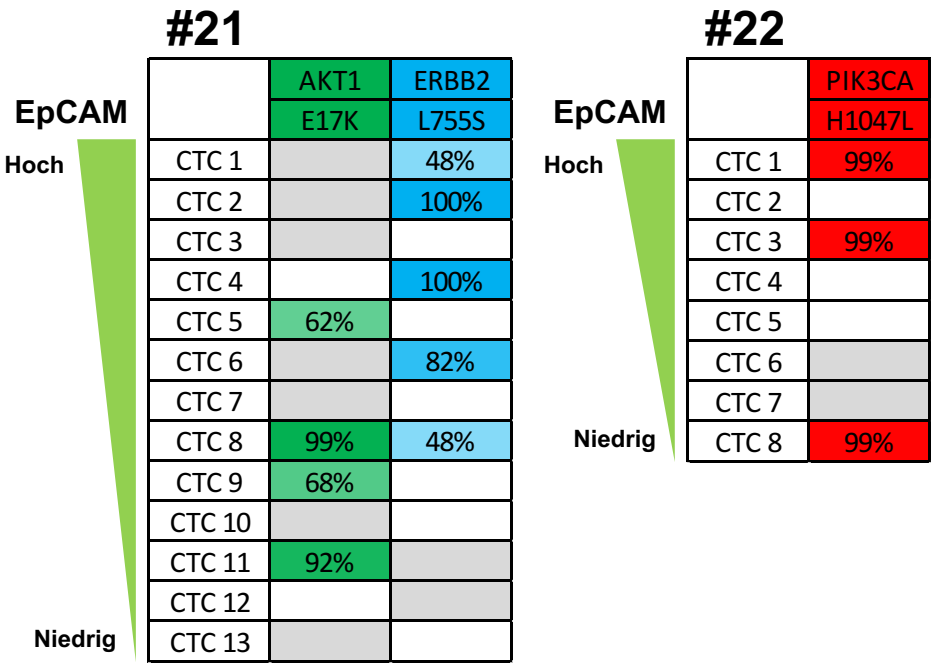

Abb. 25 Mutationsanalyse durch *Next Generation Sequencing* (NGS). Die zuvor ausgewählten Tumorzellen der Patientenproben #21 und #22 (vgl. blau umkreiste Punkte in Abb. 23) wurden mittels *Next Generation Sequencing* ausgewertet. Die dargestellten Werte entsprechen der jeweiligen Varianten-Allel-Frequenz (VAF). Ein *Cutoff* von 12,5 % wurde festgelegt. Die grauen Kästen implizieren, dass die erwartete Region nicht abgedeckt war.

Einige CTCs der Patientin #21 zeigten die Mutationen AKT1 E17K und ERBB2 L755S. In einigen CTCs von Patientin #22 wurden die Mutation PIK3CA H1047L nachgewiesen. Sowohl in EpCAM-hoch als auch in EpCAM-gering exprimierenden Tumorzellen zeigten sich gleiche bzw. ähnliche Mutationsprofile (vgl. Abb. 25) und die erwarteten Mutationen wurden nicht nur in einer Subpopulation von CTCs nachgewiesen. Eine Assoziation zwischen EpCAM-Expression und Mutationsprofil lag hier nicht vor.

4.8 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben abhängig von der EpCAM-Expression

Abschließend wurde das Überleben der Patientinnen abhängig vom Vorliegen von EpCAM-hoch sowie EpCAM-gering exprimierenden CTCs untersucht. In Abb. 26 sind die jeweiligen Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben sowie das progressionsfreie Überleben dargestellt. Dabei wurden unterschiedliche *Cutoff*-Werte der mittleren anti-EpCAM Fluoreszenzintensität (MF) näher betrachtet. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der EpCAM-gering exprimierenden CTCs bezogen auf das progressionsfreie Überleben sowie Gesamtüberleben der Patientinnen. Festgelegt wurde dabei ein MF < 12,5. Um den Einfluss von EpCAM-positiven CTCs auf das Outcome der Patientinnen weitergehend zu untersuchen, wurden verschiedene *Cutoff*-Werte analysiert. Einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen wurde ab einem *Cutoff*-Wert von > 75 mittlere anti-EpCAM Fluoreszenzintensität festgestellt. Patientinnen mit mindestens einer solchen CTC hatten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p = 0,052$) sowie progressionsfreies Überleben ($p = 0,008$).

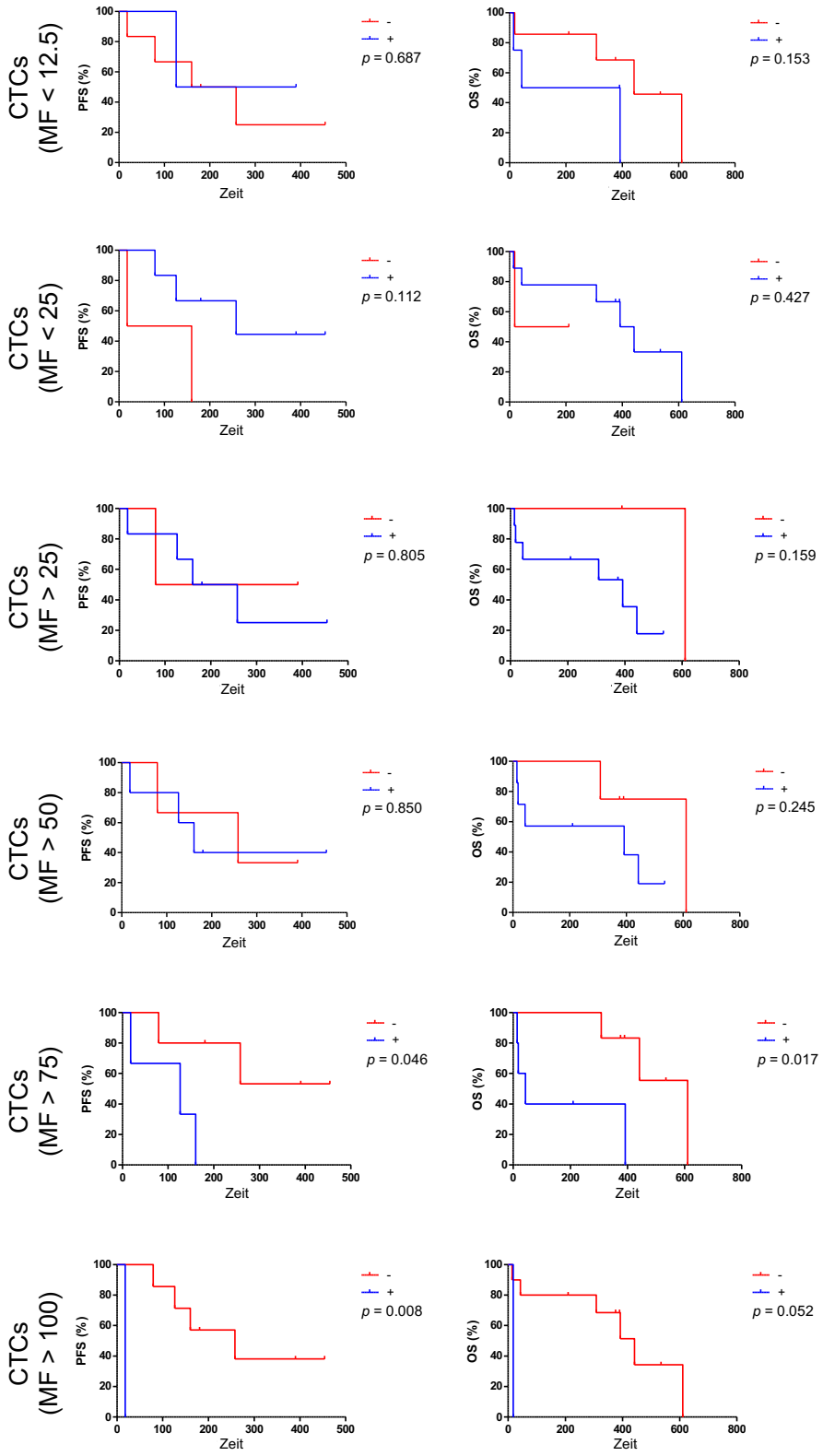

Abb. 26 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben von Patientinnen mit EpCAM-positiven sowie -negativen CTCs. Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien (PFS) sowie Gesamtüberleben (OS) von Patientinnen, die positiv oder negativ für CTCs mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MF) gegen anti-EpCAM sind. Aufgetragen ist die Zeit (in Tagen) gegen das PFS bzw. OS (in %). Dabei erfolgte eine Gruppierung anhand von unterschiedlichen *Cutoff*-Werten der MFs. Die Ermittlung des P-Wertes erfolgte durch einen Log-Rank-Test.

5 Diskussion

5.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Das Vorliegen von CTCs im peripheren Blut ist sowohl im frühen Stadium als auch im metastasierten Stadium beim Mammakarzinom mit einer Krankheitsprogression und einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert (145,153,155). CTCs haben eine hohe prognostische Relevanz hinsichtlich des Gesamtüberlebens sowie der Bildung von Metastasen, als auch zur Überwachung eines Therapieerfolgs (40,59,106,111,112). Dabei ist der prognostische Wert allerdings bisher nur für EpCAM-positive CTCs hinreichend belegt worden (112–114). Abschließende Aussagen über die prognostische und prädiktive Relevanz EpCAM-gering exprimierender Tumorzellen sind ausstehend und Gegenstand der aktuellen Forschung (167).

Der Goldstandard in der CTC-Anreicherung ist das CellSearch-System, das Tumorzellen über ihre EpCAM-Expression anreichert (108,112,127). CTCs durchlaufen jedoch im Rahmen des Metastasierungsprozesses die EMT, sodass sie epitheliale Charakteristiken teilweise bis ganz verlieren und einen eher mesenchymalen Phänotyp annehmen können (35–37). Auch dieser Aspekt muss bei der Etablierung einer alternativen Anreicherungsmethode berücksichtigt werden, die eine hoch spezifische und sensitive Anreicherung von allen Subpopulationen von CTCs erlaubt.

Die molekulare Charakterisierung aller Subpopulationen der CTCs ist essentiell, vor allem wenn eine Varianz in der Expression therapierelevanter Proteine zwischen dem Primärtumor und den angereicherten CTCs vorliegt (107,111,151). So könnte die Analyse von CTCs bei Brustkrebs-Patientinnen als *Liquid Biopsy* zu einer Therapieoptimierung und -anpassung führen (111,166). Durch die Analyse EpCAM-gering exprimierender CTCs könnten möglicherweise zusätzliche Informationen über die Tumorbiologie, den Metastasierungsprozess und das Therapieansprechen sowie die Überlebensprognose gewonnen werden.

5.2 Etablierung eines EpCAM-unabhängigen Workflows zur Anreicherung von Tumorzellen

Die Etablierung eines zum CellSearch-System alternativen Anreicherungsverfahren war ein Ziel dieser Arbeit. So sollte eine neue Möglichkeit geschaffen werden alle Subpopulationen, also sowohl EpCAM-positive als auch EpCAM-gering exprimierende CTCs, im gleichen Verfahren anzureichern. Aufgrund der Seltenheit von CTCs im peripheren Blut und ihrer genotypischen Heterogenität sowie phänotypischen Diversität, musste ein solches Verfahren in der Lage sein, Tumorzellen hoch sensitiv und spezifisch anzureichern (110,111). Dabei sollte der Zellverlust minimal gehalten werden und möglichst wenig falsch-positive Ereignisse angereichert werden (124). Zur Etablierung eines neuen EpCAM-unabhängigen *Workflows* basierend auf der Kombination zweier Antikörper mussten verschiedene Variablen vorerst in *Spike-in* Experimenten getestet werden.

Die Entscheidung zum Einsatz von zwei verschiedenen Antikörpern erfolgte nach Thege *et al.*, die beschrieben, dass die Kombination mehrerer Antikörper die Wiederfindungsrate von Tumorzellen erhöht (132). Basierend auf den Ergebnissen von Schneck *et al*. erwies es sich als sinnvoll, dabei einen Antikörper gegen das mit einem epithelialen Phänotyp assoziierte Protein Trop-2 mit einem Antikörper gegen das mit einem mesenchymalen Phänotyp assoziierte Protein CD49f zu kombinieren (86). Dadurch sollte es möglich sein, alle Subpopulationen der CTCs in Bezug auf die EpCAM-Expression anzureichern.

Die Auswahl der Brustkrebs-Zelllinien erfolgte aus dem Grund, dass sowohl epitheliale Tumorzellen mit einer hohen EpCAM-Expression als auch Tumorzellen mit eher mesenchymalem Charakter verwendet werden sollten. So konnte das Ziel der Anreicherung aller CTC-Subtypen etabliert werden. Insgesamt exprimierten Tumorzellen mit epithelialem Charakter, wie SK-BR-3, T-47D und MCF7, das Trop-2 Antigen stark auf ihren Oberflächen, wiesen im Gegensatz dazu aber nur eine geringe oder nahezu keine CD49f-Expression auf. Tumorzellen der eher mesenchymalen Zelllinie MDA-MB-231 zeigten hingegen eine starke CD49f-Expression auf ihren Oberflächen. Eine schwache Trop-2 Expression der Zelllinie MDA-MB-231 lässt sich jedoch darauf zurückführen, dass es sich hierbei um eine Mammakarzinom-Zelllinie handelt. Die Tumorzellen sind also ursprünglich epithelialen Charakters und haben durch EMT ihre mesenchymalen Eigenschaften gewonnen. Außerdem ergab die FACS-Analyse eine CD49f-Expression auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes. CD49f lässt sich also in geringen Konzentrationen auch auf

benignen mesenchymalen Zellen nachweisen. Der Vergleich mit der CD49f-Expression auf Tumorzellen lag dort allerdings eine starke Überexpression vor, sodass dieser Aspekt für die Anreicherung von Tumorzellen zu vernachlässigen ist.

Die Anreicherung der Tumorzellen durch die Antikörper gegen Trop-2 und CD49f erfolgte mit magnetischen Beads, die über anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f spezifisch binden. Zunächst wurden dazu Epoxy-Beads verwendet. Dadurch konnten jedoch nicht zufriedenstellend viele Tumorzellen angereichert werden (vgl. Abb. 7). Da CTCs allerdings in sehr geringen Frequenzen im peripheren Blut vorkommen, darf es bei deren Anreicherung zu keinem erheblichen Zellverlust kommen. Da dies bei der Anreicherung durch Epoxy-Beads der Fall war, wurde auf deren weitere Verwendung verzichtet und der Einsatz von CELLection-Beads getestet.

Die Anwendung der CELLection-Beads kann gemäss des Herstellermanuals in zwei verschiedenen Methoden erfolgen, einer direkten sowie einer indirekten Anreicherungsmethode, die sich in der Reihenfolge der Inkubationen von Beads, Antikörpern und Tumorzellen unterscheiden . Beide Methoden wurden getestet, wobei die indirekte Anreicherungsmethode eine 4,7-mal höhere Wiederfindungsrate erzielte, verglichen mit der direkten Methode (vgl. Abb. 8). Aus diesem Grund wurden ausschließlich CELLection-Beads in der Anwendung der indirekten Anreicherungsmethode verwendet. Sand *et al.* verglichen ebenfalls beide Methoden zur Anreicherung von CTCs und stellten identisch fest, dass die indirekte Methode deutlich besser funktioniert (172).

Die Wiederfindungsrate sollte weiterhin durch die Anpassung der verwendeten Antikörper-Konzentration verbessert werden. Dazu wurden sowohl für anti-Trop-2 als auch für anti-CD49f verschiedene Konzentrationen getestet und deren Wiederfindungsraten miteinander verglichen. In beiden Titrationskurven ließ sich ab einer bestimmten Konzentration ein Plateau der Wiederfindungsrate erkennen, sodass diese durch eine weitere Steigerung der Antikörper-Konzentration nicht erhöht werden konnte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass alle Trop-2- bzw. CD49f-Bindungsstellen auf den Oberflächen der Tumorzellen gesättigt waren und eine zusätzliche Bindung von Antikörpern nicht mehr möglich war (vgl. Abb. 9 und Abb. 10).

Zur Verwendung der Antikörper in Kombination wurden die Wiederfindungsraten der Anreicherung der Zelllinien für anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f allein, derjenigen durch den kombinierten Einsatz beider Antikörper gegenübergestellt. Die Verwendung der Antikörper

in Kombination konnte bei epithelialen Tumorzellen keinen Zugewinn bezogen auf die Wiederfindungsrate erzielen. Die Verwendung des AK-Mixes hatte bei der Etablierung durch Zelllinien keine Vorteile gegenüber den Antikörpern im Einzelgebrauch. Dies lässt sich vor allem auf epithelialen Zellen dadurch erklären, dass bereits die FACS-Analyse nahezu keine CD49f-Expression auf deren Oberflächen nachweisen konnte. So führte die Kombination der Antikörper vermutlich eher dazu, dass durch anti-CD49f ein stärkerer Hintergrund durch PBMCs vorlag, sodass die Anreicherung dadurch erschwert war. Bei Tumorzellen mit einer phänotypischen Dynamik zwischen epithelialen und mesenchymalen Stadien könnte die Verwendung des AK-Mixes trotz allem von Vorteil sein und einen Zugewinn der Wiederfindungsrate bringen. Dies wurde im weiteren Verlauf der Arbeit getestet und wird nachstehend beschrieben.

Da in *Spike-in* Experimenten die Färbung von Tumorzellen der Zelllinien vor der Anreicherung im IsoFlux-System erfolgen konnte, musste im Nachgang eine Färbung der Tumorzellen aus Patientenproben etabliert werden. Die Verwendung eines Magneten erbrachte eine sehr niedrige Wiederfindungsrate. Die Verwendung einer Zentrifuge, verzeichnete einen deutlich geringeren Zellverlust. Insgesamt ist ein solcher manueller Waschschritt der Tumorzellen allerdings nicht optimal, da es so zu einem Zellverlust von 93,04 % bzw. 9,13 % kam, der möglichst vermieden werden sollte.

Ein Vorteil der CELLection Beads ist das sekundäre Ablösen der Beads. Dabei ist eine Spaltung der Biotin-Bindungsstelle über eine spezifische DNase möglich. Für anschließende Einzelzellisolationen ist dies ein enormer Vorteil, da so eine präzise Isolierung einer bestimmten Zelle ermöglicht wird. Bei vernachlässigbaren Zellverlusten schien die Spaltung des Biotinankers präzise zu funktionieren.

Als finaler Abschluss der *Workflow*-Etablierung wurden alle Arbeitsschritte in Kombination getestet, bevor sie auf den Einsatz mit Patientenproben übertragen wurden. Verglichen zu den Wiederfindungsraten, die zuvor in *Spike-in* Experimenten erzielt werden konnten, musste hier ein Zellverlust von -35,3 % für SK-BR-3 bzw. -31,6 % für T-47D verzeichnet werden. Diese erheblichen Verluste in den Wiederfindungsraten lassen sich dadurch erklären, dass in *Spike-in* Experimenten vorgefärbte Tumorzellen verwendet wurden. Außerdem wurden diese erst nach Entfernen der Erythrozyten dem Spenderblut zugegeben. Für die Auswertung des finalen *Workflows* wurden die Zellen ungefärbt direkt in die Spender-Blutprobe gegeben, die nachfolgend aufgearbeitet, angereichert und gefärbt

wurden. In jedem dieser Arbeitsschritte kam es zum Verlust einzelner Tumorzellen, da viele dieser Methoden manuell durchgeführt wurden. Die geringeren Wiederfindungsraten sind also insgesamt auf eine Kombination dieser Gegebenheiten zurückzuführen.

5.2.1 Fazit

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Etablierung eines neuen EpCAM-unabhängigen *Workflows* in dieser Arbeit gelungen ist. Anhand des festgelegten Protokolls war eine erfolgreiche Anreicherung von Tumorzellen aus Brustkrebs-Zelllinien mit zufriedenstellenden Wiederfindungsraten möglich. Durch die Kombination der Antikörper ist dieses Protokoll erfolgsversprechend für die Anreicherung sowohl EpCAM-positiver als auch EpCAM-gering exprimierender CTCs. Zusätzlich ist festzuhalten, dass es nicht das primäre Ziel dieses *Workflows* war, bestmögliche Wiederfindungsraten zu erzielen und möglicherweise Vergleiche mit denen des CellSearch-Systems zu unternehmen. Viel eher lag der Fokus auf einem Protokoll, wodurch sowohl EpCAM-hoch als auch EpCAM-gering exprimierende Tumorzellen erfolgreich angereichert werden können.

Im Vergleich dazu basierten EpCAM-unabhängige Anreicherungsverfahren, die von Schneck *et al.* und auch von Lampignano *et al.* etabliert wurden, immer auf einer Kombination mit dem CellSearch-System (86,122). Dazu wurde das Blut nach Anreicherung der EpCAM-positiven CTCs verwendet, um daraus nicht angereicherte Tumorzellen, die dadurch als EpCAM-negativ galten, zu isolieren. Die Anreicherung erfolgte manuell durch magnetische Beads in Kombination mit verschiedenen Antikörpern (86) oder Marker-unabhängig durch Filtrationssysteme wie VyCap oder Parsortix (122). Durch die Kombination zweier Verfahren lagen die Wiederfindungsraten der Tumorzellen deutlich unter denen, die in dieser Arbeit erzielt werden konnten. Außerdem scheint die Anreicherung beider Subpopulationen von CTCs durch das Verfahren dieser Arbeit verlässlicher und aussagekräftiger zu sein. Die Übertragung des etablierten Workflows auf die Verwendung von Patientenproben erfolgte im nächsten Schritt der Arbeit.

Eine Verwendung verschiedener biotinylierter Antikörper würden in Zukunft eine Art „Baukasten-Prinzip“ ermöglichen. Je nach vorliegendem Primärtumor wäre dann der Einsatz von unterschiedlich angepassten Kombinationen von Antikörpern möglich. Die optimalen Zusammensetzungen, spezifisch für den jeweiligen Tumor, müssten in weiteren Projekten erarbeitet werden. Lucci *et al.* beschrieben beispielweise den erfolgreichen Einsatz von anti-CD146 beim malignem Melanom (173). Ebenso konnte in mehreren Studien bereits

bewiesen werden, dass eine Kombination mehrerer Antikörper für die Anreicherung von CTCs deutlich von Vorteil ist (132,174).

5.2.2 Limitationen

Limitationen dieses *Workflows* bestehen vor allem in der manuellen Durchführung der überwiegenden Aufbereitungsschritte. Dadurch ist dieses Protokoll, im Gegensatz zum CellSearch-System, deutlich weniger standardisiert. Die einzelnen Arbeitsschritte und nicht-automatisierte Färbung nach der Anreicherung im IsoFlux-System führen jeweils zu einem erheblichen Zellverlust. Dieser sollte jedoch gerade bei der Anreicherung der seltenen CTCs aus Patientenblut möglichst vermieden werden. In Abb. 27 sind die Wiederfindungsraten von Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3 nach jedem Arbeitsschritt des *Workflows* dargestellt.

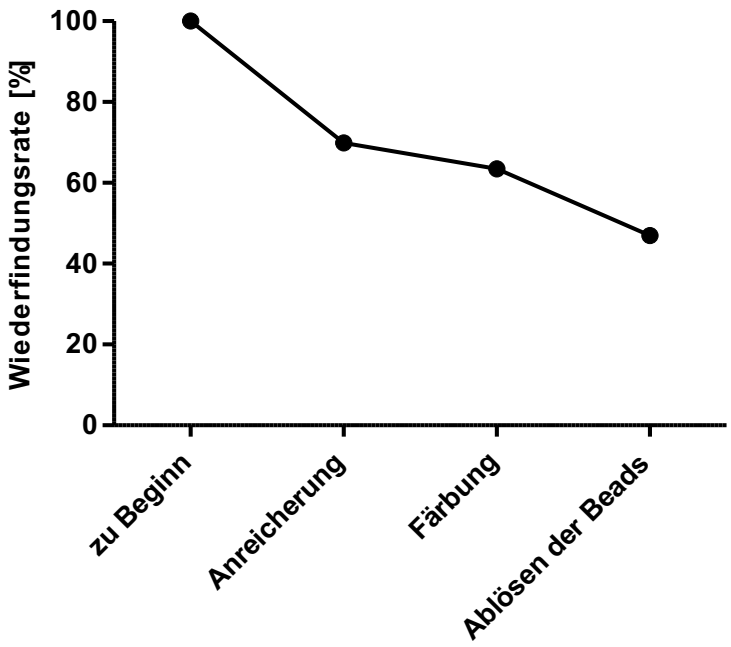

Abb. 27. Zellverluste durch einzelne Arbeitsschritte des *Workflows*. Dargestellt sind die Zellverluste durch die einzelnen Arbeitsschritte des Protokolls zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen exemplarisch anhand von Tumorzellen der Zelllinie SK-BR-3. Aufgetragen ist dies als Wiederfindungsrate (in %) pro Arbeitsschritt.

Daraus ergeben sich folgende Zellverluste für die einzelnen Arbeitsschritte in der Tumorzellanreicherung: 30,14 % durch die Anreicherung der Tumorzellen, 9,13 % durch die Färbung, 36,37 % durch das Ablösen der Beads. Insgesamt entstehen während des hier etablierten *Workflows* Zellverluste von 54,8 % (exemplarisch für die Zelllinie SK-BR-3).

In weiteren Arbeiten könnten Teilschritte dieses Protokolls standardisiert werden, um die Validität des Verfahrens zu erhöhen. In anderen Projekten wurde bereits die Verwendung von alternativen Geräten zur Bead-basierten Anreicherung von Tumorzellen getestet. Im IsoFlux-System kann lediglich der reine Isolationsvorgang durchgeführt werden, eine Kombination mit der Färbung ist dabei, anders als im CellSearch, nicht möglich. So könnte möglicherweise auch das IsoFlux-System für diesen *Workflow* nicht unbedingt besonders gut geeignet sein.

5.3 Bestimmung der EpCAM-Expressionen auf CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen

Die Blutproben der Mammakarzinom-Patientinnen wurden im Regelfall in *CellSave*-Röhrchen gelagert. Nur so war eine Aufarbeitung der Proben auch einige Tage nach der Blutentnahme möglich, ohne dass die Tumorzellen Verluste der DNA-Integrität erlitten. Eine Prozessierung der Proben am selben Tag war logistisch aufgrund der Multicenter-Studien in der Regel nicht möglich. Im Rahmen der *Spike-in* Experimente wurden Blutproben von gesunden Spendern allerdings zumeist in EDTA abgenommen und am gleichen Tag aufgearbeitet. Um den Einfluss des zugesetzten Reagenzes zu evaluieren, erfolgte ein Vergleich der Wiederfindungsraten zwischen EDTA und *CellSave* im Verlauf von mehreren Tagen. Es wurde deutlich, dass die Verwendung von *CellSave*-fixierten Blutproben mit einem deutlichen Zellverlust verbunden war. Die Reduktion der Wiederfindungsraten lag bei -25,4 % für *CellSave* am ersten Tag bzw. -65,9 % nach drei Tagen verglichen zu EDTA-Proben (vgl. Abb. 15). Dies könnte zum einen am Einfluss des Reagenzes selbst liegen, durch das möglicherweise Bindungsstellen für Antikörper auf den Oberflächen der Tumorzellen blockiert werden. Andererseits spielt die Lagerung über einige Tage hinweg eine Rolle, da deutlich wurde, dass die Wiederfindungsrate an Tag 1 noch entsprechend höher lag. Außerdem ließ sich Folgendes feststellen: je älter die Proben sind, desto schlechter ließen sich andere Blutbestandteile wie Erythrozyten aus den Proben entfernen. Auch dies kann die reduzierten Wiederfindungsraten erklären, da die Tumorzellen vor einem deutlich stärkeren Hintergrund vorlagen. Aus diesen Gründen wurde darauf geachtet, die Proben so zügig wie möglich aufzuarbeiten und auf die Analyse älterer Proben zu verzichten. So wurden lediglich Proben zur Analyse herangezogen, die zwischen einem und maximal vier Tagen alt waren. Aufgrund der Abnahme der Wiederfindungsraten mit

zunehmendem Alter der Patientenproben waren quantitative Vergleiche zwischen unterschiedlichen Proben nicht möglich. Riethdorf *et al.* beschrieben, dass die Blutproben zur Anreicherung von CTCs mit dem CellSearch für 72 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden können, da in diesem Zeitraum die CTC-Zahlen konstant blieben und sich nicht signifikant veränderten (175).

Zunächst erfolgten Anreicherungen von CTCs aus drei Patientenproben, bei denen das CellSearch-System viele CTCs nachweisen konnte. Dies wurde genutzt, um auch an Patientenproben die Wiederfindungsraten der Antikörper im Einzelgebrauch und der des AK-Mixes zu evaluieren. In vorherigen *Spike-in* Experimenten wurde durch die Verwendung der Antikörper in Kombination kein Zugewinn in den Wiederfindungsraten der Tumorzellen erzielt. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der drei Patientenproben die höchsten CTC-Anreicherungen beim Einsatz des AK-Mixes. Diese lagen deutlich über den Zahlen der CTCs, die durch anti-Trop-2 bzw. anti-CD49f allein angereichert wurden (vgl. Abb. 16). Da sich dieses Resultat bei allen drei Patientenproben in ähnlicher Weise darstellte, kann von einem positiven Nutzen durch die Verwendung des AK-Mixes bei Patientenproben ausgegangen werden. Hierbei lag nicht nur ein additiver Effekt des AK-Mixes, sondern viel eher ein synergistischer Effekt vor. Um dies mit Sicherheit zu sagen, ist der verwendete Stichprobenumfang sicherlich zu gering. Da sich das aber in allen analysierten Proben bestätigte, ist von dieser Tendenz auszugehen. Dies würde einen enormen Vorteil und erheblichen Zugewinn für die weitere Prozessierung von Patientenproben bedeuten, was sich durch die vorherigen *Spike-in* Experimente nicht abzeichnen ließ.

Ebenso wurde die EpCAM-Expression dieser Patientenproben untersucht und die Verteilung der Expressionsstärken bezogen auf den jeweiligen Antikörper und deren Kombination bewertet. Die Anreicherung durch den AK-Mix erbrachte dabei nicht nur die meisten Tumorzellen, es ließ sich auch eine breite Verteilung der EpCAM-Expressionen dieser CTCs erkennen. Insgesamt entstand bei der Analyse der EpCAM-Expressionen der Eindruck, dass durch anti-Trop-2 eher stärker EpCAM-positive CTCs und durch anti-CD49f eher EpCAM-gering exprimierende Tumorzellen angereichert würden (vgl. Abb. 17). Es wurde aber anhand dieser drei Proben bereits deutlich, dass die durchschnittlichen EpCAM-Level der Patienten sehr unterschiedlich ausfallen und untereinander stark variieren.

Der zeitliche Einfluss auf die Stärke der EpCAM-Expression von Tumorzellen sollte untersucht werden, da Patientenproben nicht immer gleich alt waren und im Verlauf von wenigen Tagen aufgearbeitet wurden. Trotzdem sollten die EpCAM-Expressionen von Tumorzellen aus unterschiedlichen Patientenproben miteinander verglichen werden. Dazu wurden Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF7 durchflusszytometrisch auf ihre EpCAM-Expressionen im Verlauf von vier Tagen analysiert. Aufgrund des eher mesenchymalen Charakters der Zelllinie MDA-MB-231 war hier eine niedrige relative Fluoreszenzintensität für EpCAM zu erwarten. Diese lag auf gleichbleibend niedrigem Niveau. Tumorzellen der Zelllinie MCF7 wiesen eine stärkere EpCAM-Expression und von Tag 0 zu Tag 1 einen Verlust der Fluoreszenzintensitäten (vgl. Abb. 18) auf. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Tumorzellen an Tag 0 unfixiert waren und umgehend aufgearbeitet wurden. In den folgenden Tagen wurden allerdings *CellSave*-fixierte Zellen verwendet, die entsprechend lange gelagert wurden. Die analysierten Patientenproben waren allesamt *CellSave*-fixiert und zwischen einem und vier Tagen alt. In dieser Zeit zeigten sich keine relevanten Veränderungen der EpCAM-Expressionen. Aus diesem Grund beeinflusst dieser Aspekt die Aussagekraft des EpCAM-Vergleichs dieser Arbeit nicht.

Schwellenwerte, die Tumorzellen als EpCAM-positiv bzw. -negativ einstufen, existieren nicht. Aus diesem Grund mussten für den folgenden EpCAM-Vergleich verschiedener Patientenproben eigene Vergleichswerte definiert werden. Die Zelllinie MDA-MB-231 diente dabei als Referenz für EpCAM-negative Zellen; die Zelllinie MCF7 bildete die Referenz für EpCAM-positive Zellen. Auch hier zeigte sich ein großes Spektrum der EpCAM-Expression, vor allem für Tumorzellen der Zelllinie MCF7. Außerdem erbrachten die Ergebnisse eine Variabilität zwischen den EpCAM-Expressionen von auf Zytospins-fixierten Zellen und in Suspension befindlichen Zellen (vgl. Abb. 19). Die EpCAM-Expression von Tumorzellen in Suspension lag signifikant höher ($p = 0{,}0049$) als diese auf Zytospins. Gründe dafür könnten die Fixierung der Tumorzellen auf den Objektträgern und der Herstellungsprozess der Zytospins sein, wodurch es zu einem Verlust der EpCAM-Expression kommt. Für die vorliegende Arbeit war diese Erkenntnis nur teilweise limitierend. Der eigentliche EpCAM-Vergleich von CTCs aus Patientenproben ist ausschließlich auf Zytospin-fixierten Präparaten erfolgt. Die Einzelzellisolation musste in Suspension erfolgen, sodass diese Ergebnisse nicht für die Betrachtung der EpCAM-Expression herangezogen werden konnten.

Die Analyse der EpCAM-Expressionen auf CTCs (n = 399) von metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen erfolgte anhand von 20 Blutproben. Um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurden sowohl Proben mit vielen CTCs als auch Proben mit nur einzelnen Tumorzellen berücksichtigt. Wie durch vorherige Ergebnisse erwartet, konnte auch hier ein großes Spektrum von EpCAM-Expressionsstärken der Tumorzellen (vgl. Abb. 20) aufgezeigt werden. Die Verteilungsbreiten ließen sich durch die MDA-MB-231- sowie MCF7-Referenzen weiter eingrenzen. Jedoch war es nicht möglich eine strengere Unterteilung in EpCAM-positive und EpCAM-negative CTCs vorzunehmen. Es ließen sich viel eher Bereiche definieren, in denen CTCs als EpCAM-hoch bzw. EpCAM-gering exprimierende Zellen definiert werden konnten. Die wenigsten Patientinnen besaßen CTCs, deren EpCAM-Expressionen alle auf dem gleichen Level eingestuft wurden. Innerhalb einer Patientin wurde in den meisten Fällen eine große Heterogenität der EpCAM-Expressionen und eine Varianz der Fluoreszenzstärken festgestellt. Auch ließen sich keine Zusammenhänge zwischen der Frequenz von CTCs in einer Probe und deren EpCAM-Expressionen feststellen. Die Probe #1 enthielt beispielsweise viele CTCs, welche auf niedrigem Expressionsniveau eingeordnet wurden. Im Gegensatz dazu enthielten die Proben #10, #15 und #16 ebenfalls reichlich CTCs; ihre EpCAM-Expressionen zeigten allerdings deutlich größere Streubreiten sowie CTCs, die als EpCAM-hoch exprimierend eingestuft werden konnten.

Im weiteren Verlauf wurden die Zusammenhänge zwischen der EpCAM-Expression der CTCs einer Patientin und ihrem Gesamtüberleben sowie progressionsfreien Überleben näher beleuchtet. Dabei wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Gesamtüberleben sowie progressionsfreie Überleben für die in dieser Arbeit eingeschlossenen Patientinnen betrachtet. Durch die Analyse von unterschiedlichen *Cutoff*-Werten der mittleren EpCAM-Fluoreszenz gelangen schließlich aussagekräftige Ergebnisse. Dabei waren EpCAM-hoch exprimierende Tumorzellen (MFI > 75) mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben ($p = 0{,}046$) und progressionsfreien Überleben ($p = 0{,}026$) assoziiert. Bei dieser Analyse schienen EpCAM-gering exprimierende CTCs (definiert als MFI < 12,5) keinen signifikanten prognostischen Einfluss zu haben.

5.3.1 Fazit

Die Bestimmung der EpCAM-Expression auf CTCs von metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen erbrachte wichtige Erkenntnisse in der CTC-Forschung. So konnte deutlich

herausgestellt werden, dass die EpCAM-Expression auf CTCs in einem breiten Kontinuum verläuft und eine Kategorisierung in EpCAM-positiv und EpCAM-negativ zu einseitig wäre. Viel eher ließen sich auch innerhalb einer Patientin unterschiedlich hohe Expressionslevel feststellen. Der hier untersuchte Stichprobenumfang von n = 399 CTCs aus 20 Proben war ausreichend groß, um verlässliche Aussagen über die Verteilung der EpCAM-Expression zu machen. Die Analyse von zusätzlichen Proben hätte möglicherweise für Aussagen über das Überleben der Patientinnen einen Zugewinn gebracht, für die reine EpCAM-Bestimmung konnte darauf jedoch verzichtet werden.

Die Evaluation des zuvor etablierten *Workflows* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen anhand von Patientenproben, erbrachte zusätzlich wichtige Ergebnisse. So konnte erst durch die Übertragung des Protokolls auf Patientenproben der synergistische Effekt des AK-Mixes in der Anreicherung der CTCs festgestellt werden. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass durch die Verwendung beider Antikörper auch Zellen angereichert werden, die sich zwischen dem epithelialen und dem mesenchymalen Zustand befinden. Die Verwendung des AK-Mixes führte so zu erfolgreichen Anreicherungen von CTCs aus Patientenproben. Vor allem lässt sich festhalten, dass das Ziel dieses *Workflows*, eine Anreicherung sowohl EpCAM-hoch als auch EpCAM-gering exprimierender CTCs zu etablieren, gelungen ist. Verglichen zu den CTC-Zahlen, die das CellSearch-System anreichern konnte, lagen die Zahlen dieses *Workflows* durchschnittlich niedriger. Allerdings konnten in einigen Patientenproben CTCs angereichert werden, in denen durch das CellSearch-System keine Tumorzellen gefunden werden konnten. Da selbst das Vorliegen einzelner CTCs mit einer schlechteren Prognose für die Patientin assoziiert ist, könnte dies ein wichtiger Einflussfaktor für das Überleben der Patientin sein (152).

Das Vorliegen von EpCAM-hoch exprimierenden CTCs war mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben assoziiert. Aus diesem Grund scheinen EpCAM-hoch exprimierende CTCs prognostisch wichtig zu sein.

5.3.2 Limitationen

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Bestimmung der EpCAM-Expression auf CTCs. Da zuvor ein EpCAM-unabhängiger *Workflow* etabliert wurde, lag die Auswahl von EpCAM als zu bestimmenden Marker nahe. So konnte zusätzlich der Erfolg des Anreicherungsverfahrens evaluiert werden. Trotzdem sollten in zukünftigen Projekten auch weitere epitheliale als auch mesenchymale Marker untersucht werden. Es kann davon

ausgegangen werden, dass EpCAM-niedrig exprimierende CTCs stattdessen mesenchymale Marker, wie beispielsweise Vimentin, stärker exprimieren (38–40). So könnten in Zukunft auch die Einflüsse einer Überexpression alternativer Marker untersucht werden und möglicherweise in einen Zusammenhang mit dem Überleben der Patientinnen gestellt werden. Außerdem erfolgte die Bestimmung der EpCAM-Expressionen auf den angereicherten CTCs manuell durch die Bildanalysesoftware ImageJ. Auch das ist ein limitierender Faktor in der Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Arbeit, da diese Analyse Untersucher-abhängig ist.

Für aussagekräftige und verlässliche Aussagen über den prognostischen Nutzen von CTCs bezogen auf das Gesamtüberleben sowie progressionsfreie Überleben in Abhängigkeit der EpCAM-Expression ist der Stichprobenumfang von 23 Patientinnen eher gering. Trotzdem gelangen hier aussagekräftige und signifikante Ergebnisse. Der *Follow-up* Zeitraum von 500 Tagen (für das progressionsfreie Überleben) bzw. 800 Tage (für das Gesamtüberleben) ist für metastasierten Brustkrebs angemessen lang. Innerhalb des Beobachtungszeitraums zeigten nahezu alle Patientinnen einen Progress bzw. sind verstorben. Allerdings lagen nicht für alle Patientinnen Überlebensdaten vor. In weiterführenden Analysen sollten größere Stichprobenumfänge angestrebt werden, um verlässliche Ergebnisse erzielen zu können.

5.4 Charakterisierung von EpCAM-hoch bzw. -gering exprimierenden CTCs anhand von drei Index-Patientinnen

Im dritten Teil der Arbeit sollten EpCAM-hoch und -niedrig exprimierende CTCs vergleichend charakterisiert werden. So sollten Rückschlüsse auf die klonale Verwandtschaft von EpCAM-positiven und -niedrigen exprimierenden Tumorzellen gezogen werden. Dazu sollte als Grundlage in dieser Arbeit eine *Low Pass*-Sequenzierung von exemplarischen CTCs erfolgen, um deren chromosomale Aberrationen zu charakterisieren.

Um Aberrationen auf chromosomaler Ebene untersuchen zu können, musste die DNA der Tumorzellen intakt bleiben. Die Kombination der Arbeitsschritte bis zur Anreicherung der CTCs verbunden mit dem anschließenden Färben und Ablösen der magnetischen Beads konnte in verschiedenen Formen einen negativen Einfluss auf die DNA-Integrität nehmen. Zur Sequenzierung sollten ausschließlich WGA-Produkte mit bestmöglicher DNA-Qualität

verwendet werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Qualitätsanalyse der amplifizierten genomischen DNA aus CTCs machte jedoch deutlich, dass das zuvor etablierte Standardprotokoll die DNA der Zellen erheblich schädigte. Es konnten keine Tumorzellen mit ausreichend guter DNA-Qualität nachgewiesen werden (vgl. Abb. 22). Das Verfahren sah vor, die CTCs nach der Anreicherung erst zu färben und im Anschluss die Beads abzulösen. Ein Grund für die resultierende DNA-Qualität könnte sein, dass die Zellmembranen im Rahmen der Färbung durch Saponin permeabilisiert wurden, damit eine intrazelluläre Zytokeratinfärbung ermöglicht wurde. Dadurch wäre es möglich, dass die zur Ablösung der Beads verwendete DNase in den Zellkern eindringen und hier die genomische DNA der Zellen schneiden konnte. Das Resultat von bestmöglichen DNA-Qualitäten der Tumorzellen ohne Ablösen der Beads, unterstützt diese Annahme. Durch Anpassung des *Workflows* und Änderung der Reihenfolge in der Aufarbeitung der CTCs konnte dieses Problem gelöst werden. Die Färbung nach Ablösen der Beads unter gründlichem Waschen der Zellen, erzielte DNA-Qualitäten von GII ≥3. Dadurch waren anschließende *Low Pass*-Sequenzierungen der CTCs möglich.

Die Sequenzierung und Analyse von möglichen chromosomalen Aberrationen der Tumorzellen erfolgte anhand von CTCs, die von drei Index-Patientinnen stammten. Dazu wurden insgesamt 10 EpCAM-hoch exprimierende und 8 EpCAM-niedrig exprimierende CTCs ausgewählt (vgl. Abb. 23). Durch die EpCAM-Bestimmung der Einzelzellen erfolgte die Auswahl von Tumorzellen mit besonders hohen bzw. niedrigen Fluoreszenzstärken verglichen zu anderen Tumorzellen innerhalb derselben Patientin (vgl. Abb. 23). Zusätzlich musste die DNA der Zelle von ausreichend guter Qualität sein. Dadurch standen teilweise nicht die CTCs mit den höchsten bzw. niedrigsten EpCAM-Level zu Verfügung, was zu einer Einschränkung der Zellauswahl führte. Auch konnte festgestellt werden, dass die EpCAM-Niveaus der Patientinnen unterschiedlich hoch waren. Eine EpCAM-hoch exprimierende CTC aus Probe #22 hätte beispielsweise im Vergleich zu Probe #21 in dieser nur im unteren Drittel der Fluoreszenzstärke gelegen. Diese unterschiedlichen Verteilungen konnten bereits im EpCAM-Vergleich der Patientenproben gezeigt werden und waren daher zu erwarten.

Die Auswertung der *Low Pass*-Sequenzierung verdeutlichte, dass alle sequenzierten Zellen wirklich Tumorzellen und deren DNA-Qualitäten so gut waren, dass eine aussagekräftige Analyse möglich war. Es ließen sich sowohl Insertionen als auch Deletionen in den

Chromosomen erkennen, jedoch ohne klares Muster in Bezug auf die EpCAM-Expression der Tumorzellen (vgl. Abb. 24).

Bezogen auf die Fragestellung dieser Arbeit ließ sich feststellen, dass keine Trennung der chromosomalen Aberrationen von EpCAM-hoch sowie EpCAM-gering exprimierenden Tumorzellen vorlag. Dies weist auf eine nahe phylogenetische Verwandtschaft hin, sodass man davon ausgehen kann, dass beide Subpopulationen von CTCs vom gleichen Tumorklon abstammen.

Zur Bestätigung, dass es sich bei den analysierten Zellen um Tumorzellen handelte, wurden außerdem Mutationsanalysen mittels *Next Generation*-Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurden für Mammakarzinome typische Mutationen untersucht. Dies diente zusätzlich zur Fluoreszenzfärbung der Zellen als Absicherung für das Vorliegen von Tumorzellen. Vor allem eine EpCAM-positive CTC aus der Patientenprobe #22 wies in der *Low Pass*-Sequenzierung keinerlei Aberrationen des Chromosoms (vgl. Abb. 24) auf. So war eine Aussage darüber, ob es sich trotzdem mit Sicherheit um eine Tumorzelle handelt, nicht möglich. Die durchgeführte Mutationsanalyse zeigte allerdings deutlich, dass auch diese Zelle eine Tumorzelle war, da sie die dafür charakteristische Mutation *PIK3CA H1047L* aufwies. In den Proben #21 und #22 konnten für das Mammakarzinom typische Hotspot-Mutationen in den *AKT1*, *ERBB2* sowie *PIK3CA* Genen nachgewiesen werden.

5.4.1 Fazit

In der Frage nach der klonalen Verwandtschaft von EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierenden CTCs, ist davon auszugehen, dass beide Subpopulationen vom gleichen Tumorklon abstammen. Es wurden keine eindeutigen Unterschiede in deren chromosomalen Aberrationen gefunden.

Auch zeigte sich keine Korrelation zwischen den vorliegenden Mutationen und der EpCAM-Expression der jeweiligen Tumorzelle. Dies unterstützt die Annahme, dass EpCAM- hoch sowie EpCAM-gering exprimierende Subpopulationen von CTCs vom selben Tumorklon abstammen und damit eine enge phylogenetische Verwandtschaft zeigen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wird die prädiktive Relevanz der EpCAM-gering exprimierenden Subpopulation deutlich. Es konnte zwar gezeigt werden, dass EpCAM-positive CTCs bezogen auf die Prognose primär relevant sind. Falls durch EpCAM-abhängige Anreicherungsmethoden jedoch keine CTCs detektiert werden könnten, wäre es

möglich, durch unabhängige Verfahren EpCAM-gering exprimierende Zellen anzureichern. Da durch diese Arbeit die enge phylogenetische Verwandtschaft mit EpCAM-hoch exprimierenden CTCs herausgestellt wurde, könnte die Analyse EpCAM-gering exprimierender CTCs in diesen Fällen einen prädiktiven und prognostischen Nutzen für die Patientin haben.

5.4.2 Limitationen

Der wichtigste Faktor, der die Aussagekraft der hier durchgeführten *Low Pass*-Sequenzierung limitiert, ist die Größe der Stichprobe. Ein valides Ergebnis mit einem signifikanten Ergebnis lässt sich voraussichtlich nicht durch eine Stichprobe von n = 18 (aus drei Patientinnen) erreichen. Um die Hypothesen der Klonalität EpCAM-negativer Subpopulationen und der Regulierung deren EpCAM-Expression weiter zu prüfen, müssten in Zukunft die CTCs weiterer Patientinnen untersucht werden. Trotzdem sind durch die analysierten Tumorzellen erste aussagekräftige Ergebnisse gelungen.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Anzahl der CTCs ist bei Brustkrebs-Patientinnen ein unabhängiger Marker für ihr Gesamtüberleben sowie das progressionsfreie Überleben sowohl im Frühstadium als auch in der metastasierten Situation (112,153,155). Der prognostische Nutzen EpCAM-positiver CTCs ist dabei bereits hinreichend belegt worden. Der klinische Nutzen und die Biologie EpCAM-negativer CTCs wird derzeit in vielen Studien untersucht und auch in dieser Arbeit adressiert.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Anreicherungsverfahren ist es möglich, CTCs aus Patientenproben unabhängig von ihrer EpCAM-Expression anzureichern. Dabei konnte eine zuverlässige Anreicherung sowohl EpCAM-hoch als auch -gering exprimierender Tumorzellen gezeigt werden. Auch konnte dieses Verfahren erfolgreich im Einsatz mit Blutproben von Patientinnen angewendet werden. Durch die gelungene Etablierung eines neuen EpCAM-unabhängigen Anreicherungsverfahrens konnte die Forschung im Bereich der EpCAM-negativen CTCs positiv vorangetrieben werden. Bisher existiert, anders als für EpCAM-positive CTCs, kein standardisiertes Anreicherungsverfahren (86,122). Auf der Grundlage dieser Arbeit könnte also in weiteren Projekten an der Automatisierung und somit der Reproduzierbarkeit sowie Verlässlichkeit der Anreicherungsmethode gearbeitet werden,

die in ersten Überprüfungen erfolgsversprechende Ergebnisse zeigten (1). Ebenso wäre es möglich, auf Basis dieser Arbeit eine auf EpCAM-negativen CTCs basierende klinische Studie anzustreben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der EpCAM-Expression auf CTCs. Dabei zeigte sich, dass die EpCAM-Expression innerhalb einer Patientin stark heterogen ist und dabei EpCAM-hoch und -gering exprimierende CTCs nebeneinander vorkommen. Außerdem ließ sich feststellen, dass es keine klaren *Cutoff*-Werte gibt, die die Definition in EpCAM-positiv bzw. -negativ erlauben. Auf der Basis dieser Arbeit könnten in Zukunft auch andere relevante Marker auf eine mögliche Überexpression untersucht werden.

Die Analyse chromosomaler Aberrationen und Mutationen von EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierenden CTCs aus drei Index-Patientinnen erlaubte erste Rückschlüsse über die Verwandtschaft EpCAM-gering exprimierender Subpopulationen. In beiden Subpopulationen wurden gleiche chromosomale Aberrationen und typische Hotspot Mutationen detektiert, was auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft schließen lässt. Anhand dieses Ansatzes könnte in Zukunft die Evolution der EpCAM-negativen Subpopulation weiterführend untersucht werden. Eine weitere Charakterisierung der CTCs könnte also wertvolle Informationen über die Grundlagen des Metastasierungsprozesses und der Biologie aller Subpopulationen von CTCs erlauben. Da diese aufgrund identischer Mutationen vom gleichen Tumorklon abzustammen scheinen, könnten EpCAM-gering exprimierende Tumorzellen einen prädiktiven Nutzen haben und als wichtiges Surrogatmaterial dienen, wenn durch konventionelle Verfahren keine EpCAM-positiven CTCs nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

1. Franken A, Kraemer A, Sicking A, Watolla M, Rivandi M, Yang L, 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. Springer US; 2023;128:1742–52.

2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [Internet]. 2020 [cited 2021 Feb 5]. Available from: https://gco.iarc.fr/today

3. Weinberg RA. The Biology of Cancer. 2013;

4. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000;100:57–70.

5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. Elsevier Inc.; 2011;144:646–74.

6. Barnes. Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015.

7. Wörmann. Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) 2014. 2014.

8. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. Clinical Anatomy. 2013;26:29–48.

9. Janni W, Hancke K, Fehm T, Scholz C, Rack B. Gynäkologie Facharztwissen. 2. Auflage. 2017.

10. Tao ZQ, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. Cell Biochem Biophys. Springer US; 2015;72:333–8.

11. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. Breast Care. 2013;8:149–54.

12. Bertos NR, Park M. Breast cancer - One term, many entities? Journal of Clinical Investigation. 2011;121:3789–96.

13. Howell LP, Gandour-Edwards R, O'Sullivan D. Application of the Scarff-Bloom-Richardson Tumor Grading System to Fine-needle Aspirates of the Breast. Am J Clin Pathol. 1994;101:262–5.

14. Elston, Ellis. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19.

15. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 8th Edition. John Wiley and Sons; 2016.

16. Leitlinienprogramm Onkologie. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [Internet]. Version 4.3. 2020. page 1–390. Available from: http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom

17. Liedtke C, Jackisch C, Thill M, Thomssen C, Müller V, Janni W. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2018. Breast Care. 2018;13:196–208.

18. Thill M, Liedtke C, Müller V, Janni W, Schmidt M. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2018. Breast Care. 2018;13:209–15.

19. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell. 2017;168:670–91.

20. Chaffer CL, Weinberg RA. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. Science (1979). 2011;331:1559–64.

21. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. Cancer Cell. 2013;23:573–81.

22. De Boer M, Van Dijck JAAM, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VCG. Breast Cancer Prognosis and Occult Lymph Node Metastases, Isolated Tumor Cells, and Micrometastases. J Natl Cancer Inst. 2010;102:410–25.

23. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Ben S, Spencer JA, et al. Circulating Tumor Cell Clusters are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. Cell. 2014;158:1110–22.

24. Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, Krol I, Gkountela S, Landin J, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. Nature. Springer US; 2019;566:553–7.

25. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. Nat Biotechnol. 2013;31:539–44.

26. Headley MB, Bins A, Nip A, Roberts EW, Looney MR, Gerard A, et al. Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. Nature. 2016;531:513–7.

27. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-Derived Transforming Growth Factor-β Down-Regulates NKG2D Thereby Inhibiting Natural Killer Cell Antitumor Reactivity. Cancer Res. 2009;69:7775–83.

28. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets. Cancer Res. 1999;59:1295–300.

29. Spiegel A, Brooks MW, Houshyar S, Reinhardt F, Ardolino M, Fessler E, et al. Neutrophils suppress intraluminal NK-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. Cancer Discov. 2016;6:630–49.

30. Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol. 2012;14:777–83.

31. Palumbo JS, Talmage KE, Massari J V., La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. Blood. 2005;105:178–85.

32. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. J Clin Invest. 2013;123:3446–58.

33. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct Signaling Between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. Cancer Cell. 2011;20:576–90.

34. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer. 2009;9:274–84.

35. Grosse-Wilde A, D'Hérouël AF, McIntosh E, Ertaylan G, Skupin A, Kuestner RE, et al. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. PLoS One. 2015;10:1–28.

36. Li W, Kang Y. Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis. Trends Cancer. 2016;2:65–7.

37. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. Cancer and Metastasis Reviews. 2012;31:673–87.

38. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002;2:442–54.

39. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO Mol Med. 2015;7:1–11.

40. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull J, et al. Circulating Tumor Cells from Patients with Advanced Prostate and Breast Cancer Display Both Epithelial and Mesenchymal Markers. Molecular Cancer Research. 2011;9:997–1007.

41. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression. Bull Acad Natl Med. 2009;193:1969–78.

42. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. Science (1979). 2013;339:580–4.

43. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. Springer US; 2020;21:341–52.

44. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119:1420–8.

45. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. Cell. 2016;166:21–45.

46. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-eesenchymal eransition generates cells with properties of stem cells. Cell. 2008;133:704–15.

47. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. Cell Cycle. 2011;10:2865–73.

48. Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. PLoS One. 2008;3:1–7.

49. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. Cell. 2009;138:645–59.

50. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar A V., Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, et al. Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells. Stem Cells. 2009;27:2059–68.

51. Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. Eur J Immunol. 1979;9:657–9.

52. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. Br J Cancer. 2007;96:417–23.

53. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. Cancer Treat Rev. 2012;38:68–75.

54. Litvinov S V., Balzar M, Winter MJ, Bakker HAM, Briaire-De Bruijn IH, Prins F, et al. Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) Modulates Cell-Cell Interactions Mediated by Classic Cadherins. Journal of Cell Biology. 1997;139:1337–48.

55. Balzar M, Winter MJ, De Boer CJ, Litvinov S V. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). J Mol Med. 1999;77:699–712.

56. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. Nat Cell Biol. 2009;11:162–71.

57. Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? Cancer and Metastasis Reviews. Cancer and Metastasis Reviews; 2020;39:969–87.

58. Trzpis M, McLaughlin PMJ, De Leij LMFH, Harmsen MC. Epithelial Cell Adhesion Molecule: More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. Am J Pathol. 2007;171:386–95.

59. Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. Cancer Res. 2009;69:5627–9.

60. Barradas AMC, Terstappen LWMM. Towards the Biological Understanding of CTC: Capture Technologies, Definitions and Potential to Create Metastasis. Cancers (Basel). 2013;5:1619–42.

61. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC Cancer. 2012;12.

62. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh RF, et al. Molecular Biomarker Analyses Using Circulating Tumor Cells. PLoS One. 2010;5:1–12.

63. Gires O, Kieu C, Fix P, Schmitt B, Munz M, Wollenberg B, et al. Tumor Necrosis Factor α Negatively Regulates the Expression of the Carcinoma-Associated Antigen Epithelial Cell Adhesion Molecule. Cancer. 2001;92:620–8.

64. Flieger D, Hoff AS, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IGH. Influence of cytokines, monoclonal antibodies and chemotherapeutic drugs on epithelial cell adhesion

molecule (EpCAM) and Lewis antigen expression. Clin Exp Immunol. 2001;123:9–14.

65. Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Fong D, Haun M, Grünewald K, et al. Methylation status of the Ep-CAM promoter region in human breast cancer cell lines and breast cancer tissue. Cancer Lett. 2007;246:253–61.

66. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. Cellular and Molecular Life Sciences. 2014;71:4393–402.

67. Cubas R, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2: A possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2009;1796:309–14.

68. Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: Regulation and clinical/therapeutic implications. Genes Cancer. 2015;6:84–105.

69. Fornaro M, Arciprete RD, Stella M, Bucci C, Nutini M, Capri MG, et al. Cloning of the gene encoding TROP-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. Int J Cancer. 1995;62:610–8.

70. Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. Human TROP-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. Int J Cancer. 1998;76:671–6.

71. Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, Palka G, Guerra E, Alberti S. Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 2001;92:164–5.

72. Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, et al. Retroposition in a Family of Aarcinoma-Associated Antigen Genes. Mol Cell Biol. 1993;13:1507–15.

73. Basu A, Goldenberg DM, Stein R. The epithelial/carcinoma antigen EGP-1, recognized by monoclonal antibody RS7–3G11, is phosphorylated on serine 303. Int J Cancer. 1995;62:472–9.

74. Linnenbach AJ, Wojcierowski J, Wu S, Pyrc JJ, Ross AH, Dietzschold B, et al. Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:27–31.

75. Lin JC, Wu YY, Wu JY, Lin TC, Wu CT, Chang YL, et al. TROP2 is epigenetically inactivated and modulates IGF-1R signalling in lung adenocarcinoma. EMBO Mol Med. 2012;4:472–85.

76. Cubas R, Zhang S, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway. Mol Cancer. 2010;9:1–13.

77. Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP, Witte ON. Indetification of a cell-of-origin for human prostate cancer. Science (1979). 2010;329:568–71.

78. Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Sun W, Garraway IP, Witte ON. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:20882–7.

79. Zeng P, Chen M, Zhou L, Tang M, Liu C, Lu P. Impact of TROP2 expression on prognosis in solid tumors : A Systematic Review and Meta- analysis. Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;1–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/srep33658

80. Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. Genes Cancer. 2015;6:84–105.

81. Goldenberg DM, Stein R, Sharkey RM. The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target. Oncotarget. 2018;9:28989–9006.

82. Pak MG, Shin DH, Lee CH, Lee MK. Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer. World J Surg Oncol. BioMed Central Ltd; 2012;10:1–8.

83. Bardia A, Diamond JR, Vahdat LT, Tolaney SM, O'Shaughnessy J, Moroose RL, et al. Efficacy of sacituzumab govitecan (anti-Trop-2-SN-38 antibody-drug conjugate) for treatment-refractory hormone-receptor positive (HR+)/HER2- metastatic breast cancer (mBC). Journal of Clinical Oncology. Wolters Kluwer; 2018;36:1004.

84. Lenárt S, Lenárt P, Šmarda J, Remšík J, Souček K, Beneš P. Trop2: Jack of All Trades, Master of None. Cancers (Basel). 2020;12.

85. Shastry M, Jacob S, Rugo HS, Hamilton E. Antibody-drug conjugates targeting TROP-2: Clinical development in metastatic breast cancer. Breast. 2022;66:169–77.

86. Schneck H, Gierke B, Uppenkamp F, Behrens B, Niederacher D, Stoecklein NH, et al. EpCAM-independent enrichment of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. PLoS One. 2015;10:1–23.

87. Cardillo TM, Mostafa AA, Rossi DL, Liu D, Chang C-H, Sharkey RM, et al. Treatment of high Trop-2-expressing triple-negative breast cancer (TNBC) with sacituzumab govitecan (IMMU-132) overcomes homologous recombination repair (HRR) rescue mediated by Rad51. Cancer Res. 2017;77:3193.

88. Evans EA, Calderwood DA. Forces and Bond Dynamics in Cell Adhesion. 2007;316:1148–54.

89. Gilcrease MZ. Integrin signaling in epithelial cells. Cancer Lett. 2007;247:1–25.

90. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell. 2002;110:673–87.

91. Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. EMBO J. 2002;21:3919–26.

92. Hogervorst F, Kuikman I, Van Kessel AG, Sonnenberg A. Molecular cloning of the human α6 integrin subunit: Alternative splicing of α6 mRNA and chromosomal localization of the α6 and β4 genes. Eur J Biochem. 1991;199:425–33.

93. Tamura RN, Cooper HM, Collo G, Quaranta V. Cell type-specific integrin variants with alternative α chain cytoplasmic domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:10183–7.

94. Goel HL, Gritsko T, Pursell B, Chang C, Schultz LD, Greiner DL, et al. Regulated Splicing of the α6 Integrin Cytoplasmic Domain Determines the Fate of Breast Cancer Stem Cells. Cell Rep. 2014;7:747–61.

95. Dogic D, Rousselle P, Aumailley M. Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform-specific clustering of integrins and other focal adhesion components. J Cell Sci. 1998;111:793–802.

96. Kligys KR, Wu Y, Hopkinson SB, Kaur S, Platanias LC, Jones JCR. A6B4 Integrin, a Master Regulator of Expression of Integrins in Human Keratinocytes. Journal of Biological Chemistry. 2012;287:17975–84.

97. Neuber K, Hilger RA, König W. Differential increase in 12-HETE release and CD29/CD49f expression of platelets from normal donors and from patients with atopic dermatitis by Staphylococcus aureus. Int Arch Allergy Immunol. 1992;98:339–42.

98. Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin a 6 (CD49f) in Stem Cells : More than a Conserved Biomarker. Stem Cells Dev. 2017;26:1090–9.

99. Vieira AF, Ricardo S, Ablett MP, Dionísio MR, Mendes N, Albergaria A, et al. P-Cadherin Is Coexpressed with CD44 and CD49f and Mediates Stem Cell Properties in Basal-like Breast Cancer. Stem Cells. 2012;30:854–64.

100. Meyer MJ, Fleming JM, Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E, Vonderhaar BK. CD44pos CD49fhi CD133/2hi Defines Xenograft-Initiating Cells in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. Cancer Res. 2010;70:4624–33.

101. Goel HL, Pursell B, Chang C, Shaw LM, Mao J, Simin K, et al. GLI1 regulates a novel neuropilin-2/α6β1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. EMBO Mol Med. 2013;5:488–508.

102. Mostert B, Kraan J, Sieuwerts AM, van der Spoel P, Bolt-de Vries J, Prager-van der Smissen WJC, et al. CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. Cancer Lett. 2012;319:49–55.

103. Hu T, Zhou R, Zhao Y, Wu G. Integrin α6/Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy. Sci Rep. 2016;6:33376.

104. Ashworth TR. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in Blood after Death. Med J Aust. 1869;14:146–7.

105. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of Cell Shedding Into Efferent Blood of Mammary Adenocarcinoma. Cancer Res. 1975;35:512–6.

106. Rink M, Chun FKH, Minner S, Friedrich M, Mauermann O, Heinzer H, et al. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. BJU Int. 2011;107:1668–75.

107. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival in Aarly Average-to-High Risk Breast Cancer Patients. J Natl Cancer Inst. 2014;106:1–11.

108. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. Clinical Cancer Research. 2004;10:6897–904.

109. Coumans FAW, Ligthart ST, Uhr JW, Terstappen LWMM. Challenges in the Enumeration and Phenotyping of CTC. Clinical Cancer Research. 2012;18:5711–8.

110. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Annu Rev Med. 2012;63:199–215.

111. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. Trends Mol Med. 2010;16:398–406.

112. Cristofanilli M, Budd T, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. N Engl J Med. 2004;351:781–91.

113. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2008;26:3213–21.

114. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Clinical Cancer Research. 2008;14:6302–9.

115. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. J Clin Pathol. 2011;64:415–20.

116. Mego M, Giorgi U De, Dawood S, Wang X, Valero V, Andreopoulou E, et al. Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. Int J Cancer. 2011;129:417–23.

117. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. Cells. 2020;9:1–17.

118. Rao CG, Chianese D, Doyle G V., Miller MC, Russell T, Sanders RAJ, et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. Int J Clin Oncol. 2005;27:49–57.

119. Mostert B, Kraan J, Bolt-De Vries J, Van Der Spoel P, Sieuwerts AM, Schutte M, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. Breast Cancer Res Treat. 2011;127:33–41.

120. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. Acta Oncol (Madr). 2011;50:700–10.

121. Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MA, Ngo J, Yin W, Kumar D, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs component for brain metastasis. Sci Transl Med. 2013;5.

122. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A novel workflow to enrich and isolate patient-matched EpCAMhigh and EpCAMlow/negative CTCs enables the comparative characterization of the PIK3CA status in metastatic breast cancer. Int J Mol Sci. 2017;18.

123. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC Cancer. 2012;12.

124. Allan AL, Keeney M. Circulating Tumor Cell Analysis: Technical and Statistical Considerations for Application to the Clinic. J Oncol. 2010;2010:3656–7.

125. Gabriel MT, Calleja LR, Chalopin A, Ory B, Heymann D. Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. Clin Chem. 2016;62:571–81.

126. Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: Facts and vision. Lab Chip. 2014;14:57–62.

127. Kagan M, Howard D, Bendele T, Mayes J, Silvia J, Repollet M, et al. A Sample Preparation and Snalysis System for Identification of Circulating Tumor Cells. Journal of Clinical Ligand Assay. 2002;25:104–10.

128. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. Breast Cancer Res Treat. 2009;115:581–90.

129. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, et al. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. Transl Oncol. 2013;6:528–38.

130. Mostert B, Kraan J, Sieuwerts AM, van der Spoel P, Bolt-de Vries J, Prager-van der Smissen WJC, et al. CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd; 2012;319:49–55.

131. Albuquerque A de, Kaul S, Breier G, Krabisch P, Fersis N. Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine. Breast Care. 2012;7:7–12.

132. Thege FI, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, Kochman ML, Hollingsworth MA, et al. Microfluidic immunocapture of circulating pancreatic cells using parallel EpCAM and MUC1 capture: Characterization, optimization and downstream analysis. Lab Chip. 2014;14:1775–84.

133. Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Deighan C, Wu Y, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Research. 2014;16:1–15.

134. Hao S-J, Wan Y, Xia Y-Q, Zou X, Zheng S-Y. Size-based separation methods of circulating tumor cells. Adv Drug Deliv Rev. 2018;125:3–20.

135. Coumans FAW, van Dalum G, Beck M, Terstappen LWMM. Filter Characteristics Influencing Circulating Tumor Cell Enrichment from Whole Blood. PLoS One. 2013;8:1–12.

136. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, et al. A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. Anticancer Res. 2011;31:427–42.

137. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells: A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells. American Journal of Pathology. 2000;156:57–63.

138. Xu L, Mao X, Imrali A, Syed F, Mutsvangwa K, Berney D, et al. Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System. PLoS One. 2015;10:1–23.

139. Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, Janning M, Quidde J, Stein A, et al. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. Int J Cancer. 2016;138:2894–904.

140. Franken A, Driemel C, Behrens B, Meier-Stiegen F, Endris V, Stenzinger A, et al. Label-free enrichment and molecular characterization of viable circulating tumor cells from diagnostic leukapheresis products. Clin Chem. 2019;65:549–58.

141. Lu J, Fan T, Zhao Q, Zeng W, Zaslavsky E, Chen JJ, et al. Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. Int J Cancer. 2010;126:669–83.

142. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. Breast Cancer Research. BioMed Central Ltd; 2012;14:1–9.

143. Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, Parisi C, Lianidou ES. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. Breast Cancer Research. 2013;15:1–11.

144. Bulfoni M, Gerratana L, Del Ben F, Marzinotto S, Sorrentino M, Turetta M, et al. In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis. Breast Cancer Research. Breast Cancer Research; 2016;18:1–15.

145. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, et al. Meta-Analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. Clinical Cancer Research. 2012;18:5701–10.

146. Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, et al. HER2-Positive Circulating Tumor Cells Indicate Poor Clinical Outcome in Stage I to III Breast Cancer Patients. Clinical Cancer Research. 2006;12:1715–20.

147. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, et al. Different Prognostic Value of Cytokeratin-19 mRNA-Positive Circulating Tumor Cells According to Estrogen Receptor and HER2 Status in Early-Stage Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2007;25:5194–202.

148. Slade MJ, Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SAA, Stebbing J, et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. Br J Cancer. 2009;100:160–6.

149. Early Breast Cancer Trialists`Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet. 2005;365:1687–717.

150. Molloy TJ, Bosma AJ, Baumbusch LO, Synnestvedt M, Borgen E, Russnes HG, et al. The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients. Breast Cancer Research. 2011;13:1–11.

151. Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients

with operable breast cancer: Prognostic relevance for late relapse. Breast Cancer Research. 2011;13:1–11.

152. Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ, Lucci A, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2018;110:560–7.

153. Janni WJ, Rack B, Terstappen LWMM, Pierga JY, Taran FA, Fehm T, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. Clinical Cancer Research. 2016;22:2583–93.

154. Krawczyk N, Banys M, Hartkopf A, Hagenbeck C, Melcher C, Fehm T. Circulating tumour cells in breast cancer. Ecancermedicalscience. 2013;7:1–12.

155. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 2014;15:406–14.

156. De Wit S, Manicone M, Rossi E, Lampignano R, Yang L, Zill B, et al. EpCAMhigh and EpCAMlow circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients. Oncotarget. 2018;9:35705–16.

157. Fehm T, Müller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: A prospective, multicenter trial. Breast Cancer Res Treat. 2010;124:403–12.

158. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodríguez M, García-Puche JL, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. Breast Cancer Research. BioMed Central Ltd; 2012;14:1–12.

159. Babayan A, Hannemann J, Spötter J, Müller V, Pantel K, Joosse SA. Heterogeneity of Estrogen Receptor Expression in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer Patients. PLoS One. 2013;8:1–11.

160. Somlo G, Lau SK, Frankel P, Hsieh H Ben, Liu X, Yang L, et al. Multiple Biomarker Expression on Circulating Tumor Cells in Comparison to Tumor Tissues from Primary and Metastatic Sites in Patients with Locally Advanced/Inflammatory, and Stage IV Breast Cancer, Using a Novel Detection Technology. Breast Cancer Res Treat. 2011;128:155–63.

161. Bidard F-C, Jacot W, Kiavue N, Dureau S, Kadi A, Brain E, 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. JAMA Oncol. 2021;7:34.

162. Schramm A, Friedl TWP, Schochter F, Scholz C, de Gregorio N, Huober J, et al. Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program. Arch Gynecol Obstet. 2016;293:271–81.

163. Fehm T, Müller V, Banys-Paluchowski M, Fasching P, Friedl T, Hartkopf A, et al. Erste Ergebnisse aus der randomisierten Phase III Studie DETECT III zur Wirksamkeit des Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib bei der Behandlung von Patientinnen mit HER2-negativem metastasiertem Mammakarzinom und HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen. Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie 18(2). 2021;

164. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. BMC Med. BMC Medicine; 2017;15:1–12.

165. Reinhardt F, Franken A, Fehm T, Neubauer H. Navigation through inter- and intratumoral heterogeneity of endocrine resistance mechanisms in breast cancer: A potential role for Liquid Biopsies? Tumor Biology. 2017;39:1–15.

166. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. Ther Adv Med Oncol. 2018;10:1–24.

167. Hayes DF. Biomarker validation and testing. Mol Oncol. 2015;9:960–6.

168. Alix-Panabieѐres C, Pantel K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. Clin Chem. 2013;59:110–8.

169. Ferrarini A, Forcato C, Buson G, Tononi P, Del Monaco V, Terracciano M, et al. A streamlined workflow for single-cells genome-wide copy-number profiling by low-pass sequencing of LM-PCR whole-genome amplification products. PLoS One. 2018;13:e0193689.

170. Franken A, Rivandi M, Yang L, Jäger B, Krawczyk N, Honisch E, et al. A multiplex PCR-based next generation sequencing-panel to identify mutations for targeted therapy in breast cancer circulating tumor cells. Applied Sciences (Switzerland). 2020;10.

171. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Andergassen U, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. EMBO Mol Med. 2014;6:1371–86.

172. Sand NT, Petersen TB, Bang-Christensen SR, Ahrens TD, Løppke C, Jørgensen AM, et al. Optimization of rVAR2-Based Isolation of Cancer Cells in Blood for Building a Robust Assay for Clinical Detection of Circulating Tumor Cells. Int J Mol Sci. 2020;21.

173. Lucci A, Addanki S, Chiang Y-J, Meas S, Sarli VN, Upshaw JR, et al. Presence of Circulating Tumor Cells Predates Imaging Detection of Relapse in Patients with Stage III Melanoma. Cancers (Basel). 2023;15.

174. Po JW, Roohullah A, Lynch D, DeFazio A, Harrison M, Harnett PR, et al. Improved ovarian cancer EMT-CTC isolation by immunomagnetic targeting of epithelial EpCAM and mesenchymal N-cadherin. J Circ Biomark. 2018;7:1849454418782617.

175. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. Clin Cancer Res. 2007;13:920–8.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. *Workflow* zur EpCAM-unabhängigen Anreicherung von Tumorzellen 40
Abb. 2. Expression von Trop-2 und CD49f auf Tumorzellen und PBMCs 47
Abb. 3. Repräsentative FACS-Analyse von Tumorzellen und PBMCs 48
Abb. 4. Färbung von Tumorzellen für Trop-2 und CD49f 49
Abb. 5. Spezifische Bindung von magnetischen Beads an Tumorzellen 50
Abb. 6. Quantifizierung der gebundenen Beads 51
Abb. 7. Anreicherung von Tumorzellen durch Epoxy-Beads 52
Abb. 8. Anreicherung von Tumorzellen durch CELLection-Beads 53
Abb. 9. Titration der anti-CD49f Konzentration 54
Abb. 10. Titration der anti-Trop-2 Konzentration 55
Abb. 11. Anreicherung von Tumorzellen durch den AK-Mix 56
Abb. 12. Vergleich von Waschmethoden während der Färbung von Tumorzellen 57
Abb. 13. Ablösung der CELLection-Beads von Tumorzellen 58
Abb. 14. Finaler Test des *Workflows* 59
Abb. 15. Vergleich von EDTA- und *CellSave*-Blutproben 60
Abb. 16. CTC-Anzahlen in drei exemplarischen Patientenproben 61
Abb. 17. EpCAM-Expression der CTCs aus drei exemplarischen Patientenproben 62
Abb. 18. EpCAM-Expression auf Tumorzellen im zeitlichen Verlauf mehrerer Tage 63
Abb. 19. EpCAM-Referenz zur Kategorisierung der EpCAM-Expression von CTCs 64
Abb. 20. EpCAM-Expression der CTCs von Brustkrebspatientinnen 66
Abb. 21. EpCAM-hoch und EpCAM-gering exprimierende CTCs 67
Abb. 22. DNA-Qualität nach unterschiedlichen Methoden zum Ablösen der Beads 68
Abb. 23. Zellauswahl für die *Low Pass* Sequenzierung 69
Abb. 24. Chromosomale Aberrationen durch *Low Pass Sequencing* 70
Abb. 25 Mutationsanalyse durch *Next Generation Sequencing* (NGS) 71
Abb. 26 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben von Patientinnen mit EpCAM-positiven sowie -negativen CTCs 73
Abb. 27. Zellverluste durch einzelne Arbeitsschritte des *Workflows* 79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TNM-Klassifikation nach Brierley et al. 2016. 4
Tabelle 2 Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC und AJCC. 4
Tabelle 3 Tumorbiologische Klassifikation des Mammakarzinoms 5
Tabelle 4 Verwendete Geräte 21
Tabelle 5 Verwendete Chemikalien 22
Tabelle 6 Verwendete primäre Antikörper 23
Tabelle 7 Verwendete sekundäre Antikörper 24
Tabelle 8 Verwendete Kits 24
Tabelle 9 Verwendete Gebrauchsartikel 25
Tabelle 10 Verwendete Lösungen und Puffer 25
Tabelle 11 Verwendete Zelllinien 26
Tabelle 12 Verwendete Softwares 27
Tabelle 13. Klinische Daten der 23 untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinom. 44

Danksagung

Nur mit Unterstützung wichtiger Personen war die Umsetzung dieser Dissertation möglich. Ich möchte mich an dieser Stelle für die verschiedene Hilfe sehr herzlich bedanken.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans Neubauer für die Auswahl des Themas, die Ermöglichung der Umsetzung sowie der stetigen Unterstützung bis zum Abschluss dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. André Franken von der Arbeitsgruppe für translationale Gynäkoonkologie der Frauenklinik. Er hat wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Mit seinem großen Engagement stand er stets mit Rat und Tat zur Seite und hat sowohl die Arbeiten im Labor als auch die Verschriftlichung kompetent betreut. Außerdem danke ich Mahdi Rivandi und Liwen Yang aus dieser Arbeitsgruppe für die Unterstützung im Bereich des CellCelectors.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinem Partner Sebastian sowie meinen Eltern Sylvia und Lutz Krämer, ohne deren Unterstützung mein Studium sowie diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.