Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität eingereicht von Prof. Dr. S. Johnsen (PhD)

Anreicherung und semiautomatisierte Detektion HER2-positiver zirkulierender Tumorzellen im Mammakarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Okka Johanna Wiebke Wilken

aus

Oldenburg

Göttingen 2022

Die vorliegende Dissertation wurde in Hamburg im Zeitraum von März bis September 2018 in der Arbeitsgruppe von C. Koch und Prof. Dr. med. K. Pantel (Institut für Tumorbiologie, UKE, Hamburg) unter der Betreuung von Prof. Dr. S. Johnsen (PhD) angefertigt.

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. S. Johnsen Prof. Dr. E. Heßmann

Prüfungskommission

Referent/in:	Prof. Dr. S. Johnsen
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. E. Heßmann
Drittreferent/in:	Prof. Dr. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 28.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Anreicherung und semiautomatisierte Detektion HER2-positiver zirkulierender Tumorzellen im Mammakarzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Koch C, Joosse SA, Schneegans S, **Wilken OJW**, Janning M, Loreth D, Müller V, Prieske K, Banys-Paluchowski M, Horst LJ et al. (2020): Pre-Analytical and Analytical Variables of Label-Independent Enrichment and Automated Detection of Circulating Tumor Cells in Cancer Patients. Cancers <u>12</u>, 442

Inhaltsverzeichnis

AbbildungsverzeichnisIII			
Tabe	TabellenverzeichnisV		
Abkü	rzungsverzeichnis	VI	
1	Einleitung	1	
1.1	Das Mammakarzinom	1	
1.2	Klinik des Mammakarzinoms	1	
1.3	Diagnostik	2	
1.4	Klassifikation	3	
1.4.1	Histologische Klassifikation	3	
1.4.2	Histopathologisches Grading	3	
1.4.3	Molekulare Subtypen	3	
1.5	Therapie des Mammakarzinoms	4	
1.6	HER2-positiver Brustkrebs	5	
1.6.1	EGFR-Familie	5	
1.6.2	Definition des HER2-positiven Status	6	
1.6.3	Therapie des HER2-positiven Brustkrebs	6	
1.6.4	HER2-Resistenzmechanismen	7	
1.7	Zirkulierende Tumorzellen	9	
1.7.1	CTCs beim Mammakarzinom		
1.7.2	CTC-Anreicherungsmethoden	12	
1.8	Cancer-ID	13	
1.9	Fragestellung	14	
2	Material und Methoden	15	
2.1	Liste der Geräte, Materialien und Chemikalien etc.	15	
2.1.1	Geräte	15	
2.1.2	Verbrauchsmaterial	16	
2.1.3	Chemikalien	17	
2.1.4	Lösungen		
2.1.5	Kits		
2.1.6	Zelllinien		
2.1.7	Antikörper und Färbesubstanzen	19	
2.1.8	Verwendete Software	19	
2.2	Methoden		
2.2.1	Zellkultur		
2.2.2	Ficoll-Aufarbeitung von Blutproben für Zytospins		
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer	21	
2.2.4	Spiken von Tumorzellen zu Blutspendeproben	21	
2.2.5	Patientenproben	21	
2.2.6	CellSearch-System		

2.2.7	Parsortix TM -Technologie	22
2.2.8	Plasmaaufarbeitung	23
2.2.9	Färbeetablierung	23
2.2.10	Auswertung der Patientenproben mithilfe des Fluoreszenzmikroskops	26
2.2.11	Automatisierte Auswertung von Objektträgern mittels Xcyto 10	26
2.2.12	Isolierung von Einzelzellen	27
2.2.13	cfDNA-Gewinnung aus Plasma	27
2.2.14	cfDNA-Konzentrationsbestimmung	
3	Ergebnisse	29
3.1	Auswertung der CellSearch-Patientenproben	29
3.2	Auswertung der Parsortix-Patientenproben	32
3.2.1	Eruierung geeigneter Antikörperklone	32
3.2.2	CellSearch-Antikörper-ICC-Etablierung	
3.2.3	Cell Signaling-Antikörper-ICC-Etablierung	40
3.2.4	Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch bzw. Cell Signaling in Kombination mit verschiedenen Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen	41
3.2.5	Auswertung der Patientenblutproben mithilfe der Parsortix-Technologie	43
3.3	Vergleich zwischen Parsortix- und CellSearch-Patientenproben	46
3.4	CTC-Verläufe vor dem Hintergrund laufender Therapien	46
3.5	Automatisierte Auswertung von Objektträgern mittels Xcyto 10	48
3.5.1	Etablierung der Gatings	48
3.5.2	Übertragung der Gatings auf mBC-Patientenproben	50
4	Diskussion	52
4.1	Detektion von CTCs mittels CellSearch bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom	52
4.2	Detektion von CTCs mittels Parsortix bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom	54
4.2.1	Eruierung geeigneter Antikörperklone	54
4.2.2	Analyse der Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mittels Parsortix	56
4.3	Vergleich beider Anreicherungs- und Detektionssysteme	56
4.4	Automatisierte Auswertung von Objektträgern mittels Xcyto 10	58
4.5	Ausblick	60
5	Zusammenfassung	62
6	Anhang	64
7	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms mit Häufigkeitsverteilung	4
Abbildung 2: Schritte der Metastasierung	.10
Abbildung 3: Anteil der Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor an der analysierten Kohorte	.29
Abbildung 4: Anteil der CTC-positiven Proben von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positiven Primärtumor an allen CTC-positiven Proben	.30
Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Antikörperklons NB3 (Siemens), Konzentration 1,01 mg/ml, in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung	.32
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des EPR19547-12-Klons (Abcam), Konzentration 0,662 mg/ml, in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung	.33
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des 3B5-Antikörperklons (Abcam), Konzentration 0,2 mg/ml in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung	.34
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Antikörperklons N24 (Thermo Fisher) in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung.	.34
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch in Kombination mit 0,5 % PFA als Fixierung und 10 % AB-PBS als Blockierung.	.35
Abbildung 10: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch in unterschiedlichen Konzentrationen anhand von SKBR3-Kontrollobjektträgern	.36
Abbildung 11: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch in unterschiedlichen Konzentrationen anhand von Parsortix-SKBR3-Objektträgern	.37
Abbildung 12: Austestung des CellSearch-Antikörpers in 1:50-Verdünnung anhand von Parsortix-Objektträgern	.38
Abbildung 13: Austestung verschiedener Permeabilisierungssubstanzen in Kombination mit dem CellSearch-Antikörper	.38
Abbildung 14: Austestung verschiedener Permeabiliserungs- und Blockierungssubstanzen in Kombination mit dem CellSearch-Antikörper.	.39
Abbildung 15: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von Cell Signaling in Kombination mit verschiedenen Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen anhand von SKBR3 Zytospins	.40
Abbildung 16: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch bzw. Cell Signaling in Kombination mit verschiedenen Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen anhand von Parsortix-Objektträgern	.42
Abbildung 17: Austestung des Cell Signaling-Antikörpers mit (A) und ohne (B) Permeabilisierung mit Saponin 0,3 % anhand von SKBR3-Parsortix-Zytospins	.42
Abbildung 18: Anteil der Proben von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2- positivem Status an allen Proben	.43
Abbildung 19: Anteil der CTC-positiven Proben an allen Proben	.43
Abbildung 20: Anteil CTC-positiver Patientinnen an allen 26 Patientinnen	.44
Abbildung 21: Anteil der CTC-positiven Proben von Patientinnen mit gesichertem HER2- positivem Status an allen CTC-positiven Proben	.44
Abbildung 22: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 1 in Kombination mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen	.47

Abbildung 23: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 2 in Kombination mit zu	
unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen	.47
Abbildung 24: Etablierung von Gatings mithilfe des sogenannten "Plot-Managers" der Xcyto- View-Software.	.49
Abbildung 25: Vergleich der CTC-Aufnahmen von Fluoreszenzmikroskop und Xcyto 10 in 20- fach Vergrößerung	.51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte 15 Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Materialien 16 Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien 17 Tabelle 5: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen 18 Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits 18 Tabelle 7: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 (Abcam) und 3B5 (Abcam) Z4 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 24 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 25 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2-Antikörperklonen 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem 30 Tabelle 14: Übersicht die CTC-positiven Patientenproben. 45 Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben. 45	Tabelle 1: Übersicht über HER2-Resistenzmechanismen und die beteiligten Signalwege	8
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Materialien. 16 Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien 17 Tabelle 5: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen. 18 Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits 18 Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien. 18 Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 (Abcam) und 3B5 (Abcam) Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling) Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 12 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2-Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling) 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor. 30 Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben. 45 Tabelle 15: Übersicht über die CTC-positiven Patientenproben. 45	Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte	.15
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien 17 Tabelle 5: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen 18 Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits 18 Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien 18 Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 25 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 26 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling) 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor	Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Materialien	.16
Tabelle 5: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen. 18 Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits 18 Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien. 18 Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 24 (Abcam) und 3B5 (Abcam) 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 25 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 26 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem 30 Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben. 30 Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben und deren mittels manueller und 30	Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien	.17
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits 18 Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien 18 Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 19 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 25 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 26 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling) 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor	Tabelle 5: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	.18
Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien. 18 Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 25 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 26 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem 30 Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben. 45 Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben und deren mittels manueller und 45	Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits	.18
Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen 19 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 24 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor 25 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen 26 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- 26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem 30 Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben. 45 Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben und deren mittels manueller und 45	Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien	.18
 Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 (Abcam) und 3B5 (Abcam)	Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen	.19
 Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)	Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 (Abcam) und 3B5 (Abcam)	.24
 Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)	Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), TumorPhenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)	.25
 Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)26 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor	Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)	.26
 Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor	Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2- Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)	.26
Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben	Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor	.30
Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben und deren mittels manueller und	Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben	.45
automatisierter Auswertung ermittelten CTC-Zahlen	Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben und deren mittels manueller und automatisierter Auswertung ermittelten CTC-Zahlen	.50

Abkürzungsverzeichnis

Bcl	<i>b-cell lymphoma</i> , B-Zell Lymphom
BRCA	breast cancer, Brustkrebs
cfDNA	circulating free DNA, zirkulierende freie DNA
CTC	circulating tumor cells, zirkulierende Tumorzellen
ctDNA	circulating tumor DNA, zirkulierende Tumor-DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-Diamidino-2-phenylindol
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft e. V.
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e. V.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylenediaminetetraacetate, Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition, epithelial-mesenchymale Transition
ЕрСАМ	epithelial cell adhesion molecule, epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FDA	U.S Food and Drug Administration, US-Behörde für Lebens- und Arzneimit- tel
FISH	fluorescence in situ hybridization, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
HER	human epidermal growth factor receptor, humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ICC	immuncytochemistry, Immunzytochemie
IGF	insulin-like growth factor, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
MAPK	mitogen-activated protein kinase, Mitogen-aktivierende Protein-Kinase
MET	mesenchymal-epithelial transition, mesenchymal-epitheliale Transition
miRNA	microRNA, Micro-Ribonukleinsäure
МК	Marienkrankenhaus
m-TOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaOH	sodium hydroxide, Natriumhydroxid
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PFA	paraformaldehyde, Paraformaldehyd
PI3K	phosphoinositide 3-kinase, Phosphotidylinositol-3-Kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	room temperature, Raumtemperatur

T-DM1	<i>trastuzumab emtansine,</i> Trastuzumab-Emtansin	
-------	--	--

- TNM *tumor, node, metastasis,* Tumor, Nodus, Metastasen
- UICC Union Internationale Contre le Cancer, Internationale Union gegen Krebs
- UKE Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom stellt mit einem Anteil von 29,5 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland den häufigsten malignen Tumor der Frau dar (RKI und GEKID 2019). Im Jahre 2016 lag die Anzahl an Neuerkrankungen bei rund 69.000 (RKI und GEKID 2019). Aufgrund von Fortschritten in der Früherkennung und Therapie haben sich die Überlebenschancen für Brustkrebs verbessert, welches sich in der stetigen Abnahme der Mortalitätsrate wiederspiegelt, die im Jahre 2016 in Deutschland bei ungefähr 19.000 Sterbefällen lag (RKI und GEKID 2019). Trotz dieser positiven Entwicklung bleibt das Mammakarzinom weiterhin die häufigste Krebstodesursache bei Frauen in Deutschland, weswegen es weiterer Nachforschungen bedarf, um die Prognose dieser Patientinnen zu verbessern. Im Vergleich zu anderen Krebsarten liegt beim Mammakarzinom eine hohe 5-Jahresüberlebensrate von 87 % vor (RKI und GE-KID 2019). Zahlreiche genetische, hormonelle und toxische Faktoren erhöhen das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Als Risikofaktoren gelten das Alter (Seidman et al. 1985), genetische Vorbelastungen (z. B. Breast Cancer (BRCA)-1/2-Mutationen) (Hall et al. 1990; Miki et al. 1994; Bilimoria und Morrow 1995; Antoniou et al. 2003), Zeitdauer zwischen Periodenbeginn und Menopause (DGHO 2018), Anzahl der Geburten, Dauer des Stillens (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002), Hormonersatztherapien (Rossouw et al. 2002), Kontrazeptivaeinnahme (Mørch et al. 2018) und toxische Faktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum und Strahlenexposition der Brust (McPherson et al 2000).

1.2 Klinik des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom wird häufig mittels des Ertastens eines Knotens in der Brust durch den behandelnden Arzt oder die Patientin selbst auffällig. Meist tritt es einseitig auf und liegt in ungefähr 50 % der Fälle im oberen äußeren Quadranten, also nahe der Achselregion vor (DKG 2020). Weitere lokale Symptome sind Veränderungen im Kolorit der Haut wie die sogenannte Orangenhaut (peau d'orange), Einziehungen der Haut und der Brustwarze, Sekretion aus der Brustwarze, Umrissveränderungen und Asymmetrien (DGHO 2018). Bei weit fortgeschrittenen Karzinomen kommt es in seltenen Fällen zur Infiltration der Brustwand, die als cancer en cuirasse bezeichnet wird (DGHO 2018). Allgemeinsymptome treten meist erst im fortgeschrittenen Stadium, z. B. in Form der B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), auf (DGHO 2018). Beim Vorliegen von Metastasen können die Symptome sehr vielfältig sein. So können beispielsweise Schwellungen des Arms, die durch den Befall der Lymphknoten und ein daraus resultierendes Lymphödem hervorgerufen werden, Knochenschmerzen durch Skelettmetastasen und Husten sowie Atemnot bei Beteiligung der Lunge auftreten (DGHO 2018).

1.3 Diagnostik

Nach den S3-Leitlinien der AWFM (DKG 2020) zählen zu den Basisuntersuchungen die Anamnese, körperliche Brustuntersuchung, die Mammographie und die Sonographie. Das Mammographie-Vorsorge-Screening wird Frauen zwischen 50 und 69 Jahren zur Krebsfrüherkennung alle zwei Jahre angeboten (RKI und GEKID 2019). Laut Studienlage senkt das Screening die Brustkrebsmortalität um ungefähr 20 % (Gøtzsche und Jørgensen 2013; Lauby-Secretan et al. 2015). Jedoch besteht bei der Mammographie auch die Gefahr falsch positiver Befunde. Frauen, die zwischen 50 und 70 Jahren 10 mal gescreent wurden, hatten ein geschätztes kumulatives Risiko von 19,7 %, ein falsch-positives Ergebnis zu erhalten (Hofvind et al. 2012). Sollten die Ergebnisse aus der Mammographie nicht eindeutig sein, wird laut Leitlinie empfohlen, zusätzlich eine Sonographie der Brustdrüse und der Achselregion durchzuführen (DKG 2020). Hierbei ist die Patientin keiner Strahlenbelastung ausgesetzt; die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer eigentlich gesunden Patientin im Ultraschall auch ein negativer Befund festgestellt wird, beträgt jedoch lediglich 33,5 % (niedrige Spezifität) (Buchberger et al. 1999). Zur definitiven Diagnosesicherung bedarf es einer histologischen Abklärung mittels einer Biopsie. In aller Regel wird eine Ultraschall-gesteuerte Stanzbiopsie durchgeführt, bei der mit einer 14-Gauge-Nadel mindestens drei Proben entnommen werden (DKG 2020). Hierbei handelt es sich um ein minimal-invasives Verfahren, welches zeitaufwendig und häufig für die Patientinnen schmerzhaft ist. Mit der Entnahme der Gewebeprobe gehen gewisse Risiken wie z. B. Blutungen, Infektionen und die Verschleppung von Tumorzellen einher, weswegen heutzutage ein Fokus auf alternative Diagnoseverfahren gelegt wird, die für die Patientinnen eine geringere Belastung darstellen (siehe 1.8) (Marrugo-Ramírez et al. 2018).

1.4 Klassifikation

1.4.1 Histologische Klassifikation

Das Mammakarzinom wird gemäß der World Health Organization in invasive und nichtinvasive Formen (sogenanntes Carcinoma in situ) eingeteilt. Das invasive Karzinom ohne speziellen Typ (NST), früher invasiv duktales Karzinom, liegt mit ca. 80 % am häufigsten vor, gefolgt vom invasiv lobulären Karzinom, welches in 10-15 % der Fälle auftritt (Schnitt et al. 2012). Weiterhin gibt es zahlreiche Sonderformen wie das tubuläre, muzinöse, szirrhöse und medulläre Karzinom, welche weniger als 5 % der Mammakarzinome ausmachen und deren Prognose im Vergleich zu den beiden häufigsten Typen günstiger ist (Schnitt et al. 2012). Für die Klinik bedeutend ist die Einteilung des Mammakarzinoms anhand der TNM (tumor, node, metastasis)-Klassifikation. Hierbei werden die Größe des Primärtumors, die Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Ausmaß der Metastasierung berücksichtigt. Die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) hat basierend auf dieser Klassifikation vier Stadien eingeführt, denen die Kriterien zugeordnet wurden (siehe Tabelle A.1).

1.4.2 Histopathologisches Grading

Die Gradierung des Mammakarzinoms erfolgt nach dem Bloom-Richardson-Elston-Score (BRE-Score), welcher den Grad der Tubulusbildung, Kernpolymorphismen und Mitoseraten berücksichtigt (Bloom und Richardson 1957). Je nach Ausprägung der drei Kriterien werden Punktewerte vergeben, durch deren Summierung sich die Einteilung in G1 (gut differenziert) bis G3 (schlecht differenziert) ergibt (Bloom und Richardson 1957; Elston und Ellis 1991).

1.4.3 Molekulare Subtypen

Die Unterteilung in molekulare Subtypen anhand von immunhistochemischen Markern ist für eine sinnvolle Therapieentscheidung essentiell. Beim Luminal-A-Typ, welcher mit einer Häufigkeit von ca. 40 % auftritt, ist der Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorstatus positiv, während ein negativer human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-Status vorliegt (Malhotra et al. 2010). Ki67 als Proliferationsmarker ist niedrig, was bedeutet, dass die Anzahl an Zellteilungen des Tumors gering ist (Malhotra et al. 2010). Der Luminal-B-Typ, mit einem Vorkommen von ca. 20 %, wird anhand des HER2-Status nochmals in zwei Subgruppen unterschieden (Malhotra et al. 2010). Beide haben gemeinsam, dass ein positiver Hormonrezeptorstatus vorliegt, jedoch unterscheiden sie sich in der Proliferationsrate. Während beim HER2-negativen Luminal-B-Typ ein hoher Ki67-Wert vorliegt, findet man beim HER2positiven Luminal-B-Typ Werte beliebiger Größe (DGHO 2018). Bei dem HER2-positiven Subtyp, auf dem der Fokus dieser Arbeit liegen soll, wird HER2 überexprimiert oder amplifiziert, während der Hormonrezeptorstatus negativ ist. HER2-positive Tumore liegen mit einer Häufigkeit von ca. 15 % vor (Malhotra et al. 2010). Beim Triple-negativen Subtyp (Häufigkeit: 20 %) ist sowohl der Hormon- als auch HER2-Rezeptorstatus negativ (Malhotra et al. 2010), weswegen zielgerichtete Therapien oft unwirksam sind und die Patientinnen eine schlechte Prognose haben (Goldhirsch et al. 2011).



Abbildung 1: Übersicht über die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms mit Häufigkeitsverteilung, basierend auf Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V (2010): Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biol Ther <u>10</u>, 955–960

1.5 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapieentscheidung bei Brustkrebspatientinnen ist davon abhängig, ob ein lokal begrenztes, lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes Mammakarzinom vorliegt. Während bei lokalen Tumoren ein kurativer Therapieansatz verfolgt wird, steht beim fernmetastasierten Mammakarzinom die palliative Behandlung im Vordergrund (DGHO 2018). Beim kurativen Ansatz wird in der Regel ein multimodales Behandlungskonzept, bestehend aus Operation, Strahlentherapie und/oder medikamentöser Therapie, gewählt (DGHO 2018). Die systemische Therapie, welche besonders beim metastasierten Mammakarzinom einen hohen Stellenwert einnimmt, richtet sich nach der Unterteilung in die molekularen Subtypen (siehe 1.4.3) und setzt sich aus den Bausteinen Chemo-, Hormon- und Antikörpertherapie zusammen (Fehm und Müller 2018). Hierbei besteht die Möglichkeit zur neoadjuvanten Gabe, um das Therapieansprechen besser verfolgen und günstigere Operationsbedingungen schaffen zu können (Fehm und Müller 2018). Bei Vorliegen eines positiven Hormonrezeptorstatus erhalten Patientinnen i. d. R. eine endokrine Therapie mit dem selektiven ÖstrogenrezeptorModulator Tamoxifen, wodurch die Rezidivwahrscheinlichkeit nachweislich gesenkt werden kann (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2011). Ausgenommen hiervon sind Patientinnen, die neben dem positiven Hormonrezeptorstatus auch einen positiven HER2-Status aufweisen, da diese schlechter auf eine endokrine Therapie ansprechen (De Laurentiis et al. 2005). Mit der Entdeckung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab gelang ein entscheidender Fortschritt in der Behandlung des HER2-positiven Brustkrebs (siehe 1.6.3) (Slamon et al. 2011).

1.6 HER2-positiver Brustkrebs

1.6.1 EGFR-Familie

Die Primärstruktur von HER2 wurde erstmals im Jahre 1985 von der Arbeitsgruppe um Axel Ullrich beschrieben (Coussens et al. 1985). 1987 konnte gezeigt werden, dass eine HER2-Überexpression in ca. 30 % der untersuchten Brustkrebstumore vorliegt und diese einen Einfluss auf das Gesamtüberleben und die Rezidivrate hat (Slamon et al. 1987). Aufgrund der Homologie zum epidermal growth factor receptor (EGFR) wurde der Transmembranrezeptor der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren zugeordnet, welche aus den weiteren drei Vertretern EGFR/HER1, HER3 und HER4 besteht (Moasser 2007). Diese Rezeptoren, welche ebenfalls bei anderen Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle spielen wie z. B. EGFR beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Lynch et al. 2004) haben alle einen ähnlichen strukturellen Aufbau, bestehend aus einer extrazellulären Domäne, einer lipophilen Transmembran-Untereinheit und der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (Moasser 2007). Während sich die extrazelluläre Liganden-bindende Untereinheit bei allen Vertretern unterscheidet, liegt eine identische Tyrosinkinase-Domäne vor (Moasser 2007). Im Gegensatz zu den anderen Vertretern hat der HER2-Rezeptor keinen identifizierten Liganden und liegt konstitutiv aktiv vor (Arteaga et al. 2011) Über die Heterodimer-Bildung, bevorzugt mit HER3, kommt es zu der Transphosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Untereinheiten, woran Enzyme und Adaptorproteine binden, die zur Aktivierung zahlreicher Signalkaskaden führen (Moasser 2007). Hierbei ist im Besonderen der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg zu nennen, welcher zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und Invasion im Mammakarzinom führt (Isakoff et al. 2005). Ein wichtiges Zielmolekül ist die Serin/Threonin-Kinase Akt (Protein Kinase B), welche durch die Hemmung der pro-apoptotischen B-celllymphoma (Bcl)-Proteine und p21 die Apoptose hemmt. Zudem werden über Proteine wie z. B. "Mammalian Target of Rapamycin (mTor)", Translationsfaktoren aktiviert und die Zellproliferation verstärkt (Roux und Topisirovic 2018).

1.6.2 Definition des HER2-positiven Status

Bei 20-30 % der Brustkrebspatientinnen liegt eine Amplifikation des HER2-Rezeptors vor, die durch eine höhere Rezidivrate und ein kürzeres Gesamtüberleben gekennzeichnet ist (Slamon et al. 1987). Nach den Leitlinien der American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists besteht eine klinisch relevante HER2-Amplifikation, falls in der immunhistologischen Färbung mehr als 10 % der Zellen vollständig angefärbt (3+) oder per Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mindestens 6 HER2-Genkopien detektiert werden (Wolff et al. 2014). Um den HER2-Status zu bestimmen, kann zusätzlich mittels FISH die Anzahl an HER2-Genkopien auf Chromosom 17 (CEP 17) bestimmt werden. Liegt hierbei ein HER2/CEP17-Verhältnis von ≥ 2 vor, spricht man von einem HER2-positiven Status (Wolff et al. 2014). In 24 % der Fälle stimmt der HER2-Status des Primärtumors nicht mit dem HER2-Status der Metastasen überein, was mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patientinnen assoziiert ist (Niikura et al. 2012).

1.6.3 Therapie des HER2-positiven Brustkrebs

Nach den S3-Leitlinien (DKG 2020) erhalten Patientinnen mit einem HER2-positiven Primärtumor zunächst eine (neo-)adjuvante Chemotherapie aus der Anthrazyklinreihe, gefolgt von einem Taxanpräparat in Kombination mit einjähriger Gabe des humanisierten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin), welcher an die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors bindet (Slamon et al. 2001). Im Jahre 2006 wurde Trastuzumab von der Food and Drug Administration (FDA) für die adjuvante Therapie von HER2-positiven Primärtumoren zugelassen (Blackwell et al. 2018). Der Antikörper sorgt u. a. für eine verringerte HER2-Expression (Cuello et al. 2001), die Blockierung der Liganden-unabhängigen Interaktion zwischen HER2 und HER3 (Junttila et al. 2009) und eine reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von HER3 (Yakes et al. 2002). Über die Regulierung zahlreicher Zellzyklus-Moleküle wie z. B. p27, Zyklin D1 wird die Zellproliferation gehemmt und die Apoptose induziert (Yakes et al. 2002). Mithilfe dieser zielgerichteten Antikörpertherapie konnte eine Erhöhung der 10-Jahres-Überlebensrate bei HER2-positiven Brustkrebspatientinnen erreicht werden (Perez et al. 2014). Eine Alternative zum Anthrazyklin-basierten Regime in Kombination mit Trastuzumab stellt die adjuvante Gabe von Docetaxel, Carboplatin und Trastuzumab über sechs Zyklen alle drei Wochen dar, welche bei gleicher Wirksamkeit geringere Kardiotoxizität aufweist (Slamon et al. 2011). Bei Patientinnen mit metastasierendem HER2-positivem Primärtumor wird eine duale Blockade mittels Trastuzumab und Pertuzumab in Kombination mit Taxanen als Erstlinientherapie empfohlen, da diese zu einem längeren mittleren progressionsfreien Überleben führt (Baselga et al. 2012). Bei Patientinnen in einem metastasierten Stadium, für die keine Chemotherapie-Indikation besteht, wird die Therapieentscheidung je nach Hormonrezeptorstatus getroffen (DGHO 2018). Bei Hormonrezeptor-positiven Patientinnen wird entweder Trastuzumab als Monotherapie oder in Form der dualen Blockade, jeweils in Kombination mit einem Aromataseinhibitor, verabreicht (DGHO 2018). Bei Hormonrezeptor-negativen Patientinnen kann die Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib mit oder ohne Trastuzumab durchgeführt werden (DGHO 2018). Sollte es zu Unverträglichkeiten oder einem Fortschreiten unter diesen Therapien kommen, steht als Zweittherapie Trastuzumab-Emtansin (T-DM1) zur Verfügung, welches ein Antikörper-Wirkstoff-Präparat ist, bestehend aus dem monoklonalen Antikörper und Maytansin-Derivat DM1, dass sich als Zytostatikum selektiv in Tumorzellen anreichert und dort die Apoptose auslöst (Cardoso et al. 2018)

1.6.4 HER2-Resistenzmechanismen

Die zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie hat zwar zu einer deutlich besseren Prognose des metastasierten HER2-positiven Brustkrebses geführt (Slamon et al. 2001; Vogel et al. 2002), jedoch sprechen weniger als 35 % der HER2-positiven Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom auf Trastuzumab als alleinige Therapie an, weswegen in den letzten Jahren vermehrt Mechanismen untersucht wurden, die für eine Resistenz gegen die HER2-gerichtete Therapie ursächlich sein könnten (Vogel et al. 2002; Luque-Cabal et al. 2016). Besonderes Augenmerk wurde auf den PI3K/Akt/mTor-Signalweg gelegt, welcher eine bedeutende Rolle im Zellwachstum spielt und dessen Aktivität durch die Dimerisierung der HER-Rezeptoren gesteigert wird (Isakoff et al. 2005; De Melo Gagliato et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass durch die dauerhafte Aktivität der PI3K, welche entweder durch Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PIK3CA)-Mutationen oder durch Verlust von phosphatase and tensin homolog (PTEN) erreicht wird, Brustkrebszellen schlechter auf die Antikörper-Therapie mit Trastuzumab ansprechen (Nagata et al. 2004; Chandarlapaty et al. 2012). In diesem Zusammenhang ist die Rezeptortyrosinkinase Src zu nennen, welche an der Dephosphorylierung von PTEN beteiligt ist, wodurch der PI3K-Signalweg ungehindert ablaufen kann (Zhang et al. 2011). Des Weiteren wird die Aktivität von EGFR-Rezeptoren durch Src in Form eines positiven Feedback-Mechanismus stimuliert. Aus diesem Grund sollten Substanzen, die gegen Src gerichtet sind, für die Therapie von HER2-positivem Brustkrebs in Betracht gezogen werden (De Melo Gagliato et al. 2016). Die Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase c-MET, die ebenfalls den PI3K-Signalweg stimuliert, geht mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Trastuzumab einher (Beviglia et al. 1997). Mittels Einsatz des Multikinase-MET-Inhibitors Foretinib konnte eine verringerte Phosphorylierung von MET, HER1, HER2, HER3 und Akt erzielt werden, wodurch das Wachstum der Tumorzellen gehemmt wurde (Liu et al. 2011). Eine Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt ebenfalls der Insulin-like growth factor receptor (IGF-IR), der über den Mitogen-activated-protein-kinase (MAPK)- und PI3K-Signalweg die Zellproliferation stimuliert und dessen Überexpression bei Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor mit einem schlechteren Ansprechen auf zielgerichtete Antikörper-Therapien assoziiert ist (De Melo Gagliato et al. 2016). Mittels Einsatz des IGF-binding protein 3 ließ sich die Trastuzumab-Sensitivität wiederherstellen (Lu et al. 2001). Des Weiteren wird bei Patientinnen mit Trastuzumab-resistenten Tumoren häufig die p95-Variante des HER2-Antikörpers exprimiert, die keine Antikörper-Bindestelle und dauerhafte Tyrosinkinaseaktivität aufweist (Scaltriti et al. 2007; De Melo Gagliato et al. 2016). Zahlreiche Prozesse und Signalwege (siehe Tabelle 1) scheinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber der Antikörper-Therapie zu haben, weswegen diese in Zukunft noch gezielter untersucht und der Blick vermehrt auf kombinierte Therapien gerichtet werden sollte.

Signalweg	Resistenzmechanismus	
	Gesteigerte PI3-Kinase-Aktivität	PIK3CA-Mutation PTEN-Verlust
PI3K/Akt/mTor	Aktivierung des IGF-1-Rezeptors	
	Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase Src	
	K/Akt/mTor Überexpression der p95-HER2-Variante und Überexpression von c-MET Inaktivierung von Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie z. B. cytotoxic T-	
PI3K/Akt/mTor und		
Ras/Rai/MAPK	lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) und programmed cell death	
	protein 1 (PD-1)	

Tabelle 1: Übersicht über HER2-Resistenzmechanismen und die beteiligten Signalwege

1.7 Zirkulierende Tumorzellen

Im Jahre 2014 konnte jeder vierte Todesfall in Deutschland auf Krebs zurückgeführt werden (RKI und GEKID 2019). Als häufigste Ursache hierfür wird die Ausbildung von Metastasen angesehen, die meist über die hämatogene Verbreitung (Chambers et al. 2002) von zirkulierenden Tumorzellen, sogenannten CTCs erfolgt (siehe Abbildung 2) (Joosse et al. 2015; Pantel und Alix-Panabières 2019). Beim Brust-, Prostata- und Kolonkarzinom konnte gezeigt werden, dass hohe Anzahlen an CTCs im Blut mit einer schlechteren Prognose der Patienten/Patientinnen assoziiert sind (Cristofanilli et al. 2004; Bono et al. 2008; Cohen et al. 2009). Es wird davon ausgegangen, dass sich Millionen von Tumorzellen vom Primärtumor lösen, wovon aber nur wenige die Fähigkeit zur Extravasation und Absiedlung in fremden Organen besitzen (Chambers et al. 2002). Diese CTCs können sich in entfernten Organen, wie z. B. dem Knochenmark, einnisten und in einem inaktiven Stadium als sogenannte disseminierte Tumorzellen vorliegen (Braun et al. 2005; Pantel et al. 2009; Alix-Panabières et al. 2012). Noch Jahrzehnte später können diese Tumorzellen durch bisher noch unbekannte Signale reaktiviert werden und Mikro- sowie Makro-Metastasen ausbilden (Uhr und Pantel 2011).

Die ersten Schritte der Metastasierung sind die Loslösung vom ursprünglichen Zellverband und die Invasion in Lymph- und Blutgefäße (Hanahan und Weinberg 2011). Hierbei wird zwischen einer aktiven und passiven Migration der Tumorzellen unterschieden (Joosse et al. 2015). Bei der aktiven Migration sind Krebszellen in der Lage, durch Veränderung ihrer Morphologie und Motilität in Gefäße ein- und auszuwandern (Friedl und Alexander 2011; Joosse et al. 2015); bei der passiven Migration werden Tumorzellen z. B. durch Tumorwachstum verdrängt und gelangen auf diese Art in die Zirkulation (Joosse et al. 2015). Um migratorische Eigenschaften zu gewinnen und den Zellverband zu verlassen, durchlaufen Tumorzellen die epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT) (Thiery 2002). Hierbei kommt es zur verminderten Expression von epithelialen Markern, wie z. B. epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), E-Cadherin, und Keratinen, während mesenchymale Marker wie Vimentin vermehrt ausgebildet werden (Thiery 2002; Joosse et al. 2012). Durch den hiermit einhergehenden Verlust von Zell/Zell-Kontakten und Zellpolarität wird diesen Tumorzellen sowohl die Intravasion in Blutgefäße, als auch die anschließende Extravasion in entfernte Gewebe ermöglicht (Joosse et al. 2015). Um wiederum in diesen entlegenen Organen neue Tumorherde zu bilden, ist der umgekehrte Prozess, die mesenchymale-zu-epitheliale Transition (MET) notwendig (Thiery 2002). Diese Prozesse sind nicht "schwarz/weiß" und Tumorzellen durchlaufen meist eine partielle EMT, bei der sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker zu gewissen Anteilen exprimiert werden (Saitoh 2018). Um in dem eher feindseligen Milieu des Blutes zu überleben, müssen Tumorzellen adversen Bedingungen wie Scherkräften (Follain et al. 2018) oder Anoikis standhalten und dem Immunsystem ausweichen (siehe Abbildung 2) (Mohme et al. 2017). Mesenchymale Zellen scheinen hierbei im Vorteil zu sein (Mitchell und King 2013).



Abbildung 2: Schritte der Metastasierung. Die Tumorzellen lösen sich vom ursprünglichen Zellverband und treten über aktive (z. B. EMT) oder passive Prozesse in den Blutstrom ein. Im Blutkreislauf sind die Zellen adversen Bedingungen wie z. B. Scherkräften, Anoikis und dem körpereigenen Immunsystem ausgesetzt. In der Peripherie können die Zellen z. B. über MET die Gefäße verlassen und Metastasen ausbilden. Quelle: Joosse SA, Gorges TM, Pantel K (2015): Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO Mol Med 7, 1–11, CC BY 4.0 license

1.7.1 CTCs beim Mammakarzinom

Blutbasierte Biomarker wie z. B. zirkulierende Tumorzellen (CTCs), zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) und microRNA (miRNA) lassen sich aus Blutproben von Patienten/Patientinnen extrahieren (Liquid Biopsy) und stellen potentielle Indikatoren für die Entwicklung eines Tumors dar (Alix-Panabières und Pantel 2016). Anstatt aufwändige Biopsien durchzuführen, ist das Ziel, mittels Liquid Biopsy kontinuierlich Informationen über den Tumorstatus zu erlangen, Therapien zu überwachen und diese an den einzelnen Patienten/die einzelne Patientin anzupassen (personalisierte Medizin) (Alix-Panabières und Pantel 2016; Alix-Panabières und Pantel 2021). Sowohl in der Brustkrebsforschung als auch im klinischen Alltag gewinnt die Liquid Biopsy zunehmend an Bedeutung. Bereits im Jahre 2004 konnte anhand der Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom gezeigt werden, dass das Vorliegen \geq 5 CTCs in 7,5 ml Blut vor Beginn der Therapie mit einem geringeren progressionsfreien und Gesamt-Überleben assoziiert ist (Cristofanilli et al. 2004). Im Verlauf

11

der Studie zeigte sich, dass das Erreichen des prognostischen Grenzwerts während der Therapie ein Indikator für eine raschere Tumorprogression ist (Cristofanilli et al. 2005; Hayes et al. 2006). Zahlreiche weitere Studien bestätigen den hohen prognostischen Wert der CTC-Anzahl für Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs (Budd et al. 2006; Nolé et al. 2008; Bidard et al. 2014, Pierga et al. 2012). Die Studienlage zur Bedeutung von CTCs beim frühen, nicht metastasierten Brustkrebs ist limitiert. Riethdorf et al. (2017) untersuchten im Rahmen der GeparQuattro-Studie das Blut von 213 Brustkrebspatientinnen auf zirkulierende Tumorzellen und stellten fest, dass die Detektion von CTCs vor Durchführung einer neoadjuvanten Therapie mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist, während erhöhte CTC-Zahlen nach neoadjuvanter Behandlung keinen prognostischen Wert besitzen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen vorheriger Studien überein (Pierga et al. 2008; Bidard et al. 2010).

Die Charakterisierung von CTCs nimmt in der Forschung einen hohen Stellenwert ein, da sie zu einem besseren Verständnis der Tumorbiologie, Tumorheterogenität und möglichen Therapiemechanismen beiträgt (Joosse et al. 2015). Der HER2-Status der zirkulierenden Tumorzellen stimmt häufig nicht mit dem Status des Primärtumors überein (Pestrin et al. 2009; Riethdorf et al. 2010; Fehm et al. 2010), welches die Tumorheterogenität selbst innerhalb einer untersuchten Patientin verdeutlicht. Es können demnach theoretisch sowohl Patientinnen mit HER2-positivem als auch negativem Primärtumorstatus von einer HER2-gerichteten Therapie profitieren (Riethdorf et al. 2010). Da sich der HER-Status der Tumorzellen zusätzlich im Therapieverlauf ändern kann, könnte es vorteilhaft sein, diesen mittels serieller Blutabnahmen regelmäßig zu überprüfen (Munzone et al. 2010). In einer Metaanalyse mitinsgesamt 6712 Patientinnen wurde analysiert, ob die CTC-Zahl als ein nützlicher Surrogatmarker für die Wirksamkeit einer Therapie dienen könnte (Yan et al. 2017). Nach der Durchführung einer (neo-) adjuvanten, medikamentösen und/oder Kombinationstherapie wurde eine signifikante Abnahme der CTC-positiven Rate beobachtet, weswegen die Möglichkeit besteht, dass der CTC-Status als geeigneter Indikator für das Therapieansprechen dienen könnte (Yan et al. 2017). Eine entscheidende, offene Frage hinsichtlich der klinischen Relevanz zirkulierender Tumorzellen besteht darin, ob die Detektion dieser seltenen Zellen das Kriterium der "clinical utility", des klinischen Nutzens, erreicht und damit also eine klinische Intervention auf Basis von CTCs gerechtfertigt werden kann, ggf. unter welchen Bedingungen. Während es in anderen Entitäten wie dem Prostatakarzinom bereits vielversprechende Daten zu dieser Frage gibt (Pantel et al. 2019), laufen noch entsprechende Studien beim Mammakarzinom. Die Frage, inwieweit Patientinnen von einer Therapieänderung profitieren, die aufgrund eines positiven CTC-Befundes veranlasst wird, wird in der DETECT III-Studie untersucht (Hagenbeck et al. 2012). Hier wird die Wirksamkeit von HER2-gerichteter Therapie (Lapatinib) bei Patientinnen untersucht, die zwar einen HER2-negativen, metastasierenden Primärtumor aufweisen, jedoch mindestens eine HER2-positive zirkulierende Tumorzelle besitzen (Hagenbeck et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Studie werden ab 2021 erwartet.

1.7.2 CTC-Anreicherungsmethoden

Aufgrund der Seltenheit von CTCs innerhalb der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von 1/10⁶-10⁸, ist die Anreicherung dieser Tumorzellen eine entscheidende Voraussetzung für ihre Detektion (Alix-Panabières et al. 2012; Joosse et al. 2015). Mittlerweile existieren zahlreiche Methoden zur Anreicherung, die in Oberflächenmarker-abhängige und unabhängige Verfahren eingeteilt werden (Joosse et al. 2015). Die Oberflächenmarkerabhängige Anreicherung beruht auf Unterschieden in den biologischen Eigenschaften der Tumorzellen und der umgebenden Blutzellen (Alix-Panabières und Pantel 2014). Hierbei werden in der Regel Antikörper eingesetzt, die gegen Tumor-assoziierte oder epitheliale Antigene, wie z. B. EpCAM, gerichtet sind und diese markieren (positive Selektion) (Alix-Panabières und Pantel 2021). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit zur negativen Selektion über Antikörper, die an das Leukozyten-spezifische Antigen CD45 binden (Pantel et al. 2009; Alix-Panabières und Pantel 2021). Ein EpCAM-basiertes Nachweisverfahren ist das CellSearch-System, welches den Goldstandard der CTC-Detektionssysteme darstellt und von der FDA für die Detektion zirkulierender Tumorzellen bei metastasierten Prostata-, Brust- und Kolonkarzinomen zugelassen wurde (Riethdorf et al. 2018). Beim CellSearch-System erfolgt der Nachweis von Tumorzellen epithelialen Ursprungs aus 7,5 ml peripherem Blut anhand von EpCAM-Antikörpern, die an mikroskopische Eisenpartikel (Ferrofluide) gebunden sind (Riethdorf et al. 2007). Mit diesen bilden CTCs Komplexe aus, welche mittels eines starken Magneten von den restlichen Blutbestandteilen isoliert werden können. Nach der immunomagnetischen Bindung werden die isolierten Zellen per fluoreszierender Antikörper gegen 4',6-Diamidino-2phenylindol (DAPI), CD45 und Zytokeratin 8,18 angefärbt (Riethdorf et al. 2007). Je nach Tumorentität können zudem Marker für weitere Oberflächenstrukturen wie z. B. HER2 eingesetzt werden. Der CellTracks Analyser scannt daraufhin automatisiert die Probe und erstellt Bildergalerien potentieller Tumorzellen. Diese werden von speziell geschultem Personal als CTC definiert, sofern sie \geq 4 µm Durchmesser haben, DAPI⁺, pan-keratin⁺ und CD45⁻ sind (Joosse et al. 2015). Nach der Auswertung der Anzahl an CTCs besteht die Möglichkeit zur weiteren molekularen Untersuchung einzelner Zellen, gewonnen durch Mikromanipulation, oder der gesamten verbliebenen Zellfraktion per Polymerase-Kettenreaktion (PCR)/Immunzytochemie (ICC) oder FISH (siehe Herstellerangabe). Der Nachteil des Cell-Search Ansatzes besteht darin, dass nur EpCAM-positive Tumorzellen angereichert und detektiert werden können (Joosse et al. 2015). Aufgrund der Tatsache, dass einige Zellen eine EMT durchlaufen, die durch den Abbau epithelialer und die Überexpression mesenchymaler Marker gekennzeichnet ist, bedarf es weiterer Detektionsmethoden, die nicht von Oberflächenmolekülen abhängig sind (Joosse et al. 2015).

An dieser Stelle ist das Parsortix-System der Firma ANGLE zu nennen, welches eine neuartige CTC-Anreicherungsmethode darstellt, die auf Größen- und Verformbarkeitsunterschieden der zirkulierenden Tumorzellen im Vergleich zu den restlichen Blutkomponenten basiert (Hvichia et al. 2016) und im Hinblick auf verschiedene Tumorentitäten bereits vielversprechende Ergebnisse lieferte (Xu et al. 2015; Chudziak et al. 2016; Hvichia et al. 2016; Gorges et al. 2019; Koch et al. 2020). Durch die Erzeugung eines konstanten Flüssigkeitsstroms durch eine spezielle austauschbare Kassette können CTCs aus 7,5 ml peripheren Blut festgehalten und für die weitere molekulare und funktionelle Untersuchungen zugänglich gemacht werden (siehe 2.2.7) (Hvichia et al. 2016). Darüber hinaus ermöglicht das Parsortix-System die Isolierung von seltenen CTC-Clustern (Gkountela et al. 2019; Koch et al. 2020) und die Gewinnung lebensfähiger Zellen im Anschluss an die Anreicherung für weitere Analysen (Hvichia et al. 2016; Franken et al. 2019; Koch et al. 2020).

1.8 Cancer-ID

Meine Arbeit ist Teil des Cancer-ID-Projekts, welches von einer europäischen Arbeitsgemeinschaft, bestehend aus 36 Partnern aus 13 Ländern, im Jahre 2015 initiiert wurde und Experten aus der klinischen und akademischen Forschung, biotechnologischen Firmen und der pharmazeutischen Industrie zusammenführt. Das Hauptziel des Konsortiums ist die Entwicklung von Standard-Protokollen zur Einführung von blutbasierten Biomarkern wie z. B. CTCs, ctDNA und miRNA im Rahmen einer Liquid Biopsy in den klinischen Alltag. Obgleich in den letzten Jahren einige EpCAM-unabhängige Technologien entwickelt wurden und diese vielversprechende Ergebnisse lieferten, mangelte es an standardisierten Protokollen, um Methodenabläufe zu optimieren und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Das Cancer-ID-Konsortium (cancer-id.eu), welches von der European Innovative Medicine Initiative (IMI) finanziert wird, zielt darauf ab, diese Lücke zu schließen und innovative CTC-Detektions-Methoden für klinische Studien zu validieren. Die Methodenentwicklung erfolgt anhand der Tumorentitäten Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom und HER2-positives Mammakarzinom, welches nicht auf zielgerichtete Therapien anspricht. Parallel zur Etablierung von Standard-Protokollen sollen Mechanismen untersucht werden, welche für eine Resistenz gegenüber HER2-gerichteter Therapie ursächlich sein könnten. Die Standardisierung neuer Technologien und Arbeitsabläufe ist essentiell dafür, dass CTCs als potentielle Indikatoren für die Entwicklung eines Tumors in der Klinik an Bedeutung gewinnen.

1.9 Fragestellung

In der Krebsforschung wird heutzutage ein großes Augenmerk auf zielgerichtete Therapien gelegt, welche das Wachstum von Tumoren aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften hemmen. Die Therapieentscheidung beim Mammakarzinom wird anhand immunhistochemischer Marker wie dem Hormonrezeptor- und HER2-Status getroffen. Bei ca. 30 % der Mammakarzinom-Patientinnen liegt eine Amplifikation des HER2-Rezeptors vor, die mit einem kürzeren Gesamtüberleben und einer höheren Rezidivrate einhergeht.

Um aufwendige Biopsien zu vermeiden und aktuelle Informationen über den histologischen Status zu gewinnen, bedienten wir uns der molekularen Analyse blutbasierter Biomarker wie z. B. CTCs und/oder ctDNA im Rahmen einer Liquid Biopsy und charakterisierten diese hinsichtlich ihres HER2-Status. Für die Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen, welche Voraussetzung für die weitere molekulare Analyse ist, nutzten wir neben dem bereits etablierten CellSearch-System (Menarini Silicon Biosystems) die Marker-unabhängige Parsortix-Technologie (ANGLE) und stellten die Ergebnisse beider Systeme gegenüber. Da für das Parsortix-System bislang keine etablierte Methode zur sicheren Detektion HER2-positiver Tumorzellen existiert ist, war es unser Ziel, ein geeignetes HER2-Färbeprotokoll zu entwickeln. Des Weiteren testeten wir das hochauflösende Mikroskop Xcyto 10 (Chemometec), um wie für das CellSearch- auch für das Parsortix-System die Möglichkeit einer automatisierten Auswertung zu schaffen, die reproduzierbare Ergebnisse liefert und eine Zeitersparnis im Vergleich zur momentan üblichen manuellen Auszählung darstellt.

Die Etablierung eines geeigneten HER2-Färbeprotokolls und die Validierung einer automatisierten Auswertungsplattform könnten in Zukunft dazu dienen, neue Erkenntnisse über Resistenzmechanismen gegenüber einer HER2-gerichteten Antikörpertherapie zu erlangen, die Therapie entsprechend zu adaptieren und letztlich die Prognose der betroffenen Patientinnen zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der Geräte, Materialien und Chemikalien etc.

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte

Geräteliste	Hersteller
Analoger Rollenmischer RS-TR5	Phoenix Instrument, Garbsen
Automatic-Sarpette®	Sarstedt, Nümbrecht
Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen
CellSearch®	Menarini-Silicon Biosystems, Bologna, Italien
CELLTRACKS® ANALYZER II®	Menarini-Silicon Biosystems, Bologna, Italien
CELLTRACKS® AUTOPREP®	Menarini-Silicon Biosystems, Bologna, Italien
CELLTRACKS® AUTOPREP® System	Menarini-Silicon Biosystems, Bologna, Italien
CO2-Zellkulturinkubator HERAcell®150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Färbekammer Typ M920-1	Simport, Beloeil, Canada
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Heraeus™ Megafuge 8 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus [™] Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Microcentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERA- safe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
Parsortix TM Technology	Angle, Philadelphia, USA
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Qiagen, Hilden
QIAvag Connecting System	Qiagen, Hilden
Qubit® Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Research Pipetten (0,1-2,5µl /0,5-10 µl / 2-20 µl /20-200 µl /100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg

Geräteliste	Hersteller
Thermo Mixer C	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Rotofix 32	Hettich, Tuttlingen
Ultratiefkühlgerät TSX Series -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vacuum Pump	Qiagen, Hilden
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad GFL-1012	GFL, Großburgwedel
Xcyto 10 Quantitative Cell Imager	Chemometec, Allerod, Dänemark

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Materialien

Material	Hersteller
CellSave Preservative Tubes	Menarini-Silicon Biosystems, Bologna, Italien
CELLSTAR Tubes	Greiner bio-one, Kremsmünster, AU
Cellstar® Cell Culture Dishes	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Deckgläser 24x32 mm	Carl Roth GmBH, Karlsruhe
Eppendorf Safe-Lock Gefäße 0,5-2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon TM Zentrifugationsröhrchen (15ml, 50ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Fixogum-Kleber	Marabu, Tamm
Nunc TM CryoTube TM -Vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parsortix Cell Separation Cassette	Angle, Philadelphia, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
ProLong TM Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sarstedt Serological Pipette (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
S-Monovette EDTA KE/ 7,5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
TC-Flasche T25	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Vacutainer K2E (EDTA)	BD, Plymouth, UK

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Fetal Bovine Serum Mycomplex (FBS) 10 %	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
AB-Serum	Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich
DAKO Protein Block Serum-Free	DAKO Corporation, CA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAN TM -Biotech, Aidenbach
Ethanol 99 % vollvergällt	Chemsolute, Warschau, Polen
Ficoll-Paque TM Plus	GE Healthcare, Chicago, USA
Flow Cytometry Human Lyse Buffer (10x)	RD-Systems, Minneapolis, USA
Gibco® Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Life Technologies, Paisley, UK
Gibco® L-Glutamine (200mM)	Life Technologies, Paisley, UK
Gibco® Penicillin-Streptomycin Mix (0,5 %)	Life Technologies, Paisley, UK
Gibco® Trypsin-EDTA (0,25 %)	Life Technologies, Paisley, UK
Isopropanol (2-Propanol rein)	Chemsolute, Warschau, Polen
Saponin	Keine Herstellerangaben
The Blocking Solution	Candor Bioscience GmbH, Wangen
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Merck, Darmstadt

2.1.4 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	
	4 g PFA	
4 % Paraformaldehyd	Ad 100 ml PBS	
	Ad 6 Tropfen 1 M NaOH	
10.07 AD DDC	10 ml AB-Serum	
10 /0 AD-PDS	Ad 90 ml DPBS	

2.1.5 Kits

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits

Kit	Hersteller
QIAamp Circulating nucleic acid kit (50)	Qiagen, Hilden
Qubit™dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CellSearch® Circulating Tumor Cell Kit (Epi- thelial)	Menarini-Silicon Biosystems, Bologna, Italien

Für die genauere Zusammensetzung der einzelnen Kits siehe in den Herstellerangaben.

2.1.6 Zelllinien

Tabelle 7: Übersicht über Zelllinien

Zelllinie	Тур	Medium
SKBR3	Duktales Mammakarzinom	DMEM
MCF-7	Adenokarzinom der Brust	DMEM
MDA-MB-231	Duktales Mammakarzinom	DMEM
MDA-MB-468	Adenokarzinom der Brust	DMEM

2.1.7 Antikörper und Färbesubstanzen

Тур	Herkunft	Antikörper	Klon	Konzentra- tion	Firma
Primär- antikörper	nicht bekannt (n. b.)	Anti- HER2/neu (Conj. Dye 488)	NB3	1,01mg/ml	Siemens, Mün- chen, Germany
Primär- antikörper	Hase	Anti-ErbB2	EPR19547-12	0,662 mg/ml	Abcam, Cambridge, UK
Primär- antikörper	Hase	Anti- HER2/ErbB2	29D8	n. b.	Cell Signaling Technology, USA
Primär- antikörper	Maus	Anti-ErbB2 (HER2)	N24	1 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Primär- antikörper	n. b.	Anti- HER2/neu (Tumor Pheno- typing Reagent)	n. b.	0,0008 %	CellSearch, Me- narini-Silicon Biosystems, Italiy
Primär- antikörper	Maus	Anti-ErbB 2	3B5	0,2 mg/ml	Abcam, UK
Primär- antikörper	Maus	DAPI	n. b.	n. b.	Abcam, UK
Primär- antikörper	Maus	Anti-human CD45-APC	REA747	n. b.	Miltenyi Biotec, Bergisch Glad- bach
Primär- antikörper	Maus	Anti-Pan- Keratin (C11) directly labelled with Alexa 488	C11	n. b.	Cell Signaling Technology, USA
Primär- antikörper	Maus	Anti-Pan- Cytokeratin directly labelled with Alexa 488	AE1AE3	0,5 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Primär- antikörper	Maus	Anti-Pan- Cytokeratin directly labelled with Alexa 570	AE1AE3	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Sekundär- antikörper	Ziege	Anti-rabbit Alexa 546 con- jugated	n. b.	2 mg/ml	Thermo Fisher Scientifc, USA

Tabelle 8: Übersicht über Antikörper und Färbesubstanzen

2.1.8 Verwendete Software

- 1. Xcyto View 1.0.98.0
- 2. AxioVision Se 64 Rel.4.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Im Rahmen der Färbeetablierung und als Kontrolle für die Auswertung der Patientenproben wurden Zytospins der Zellkulturlinien SKBR3 und MCF-7 hergestellt. Die beiden Brustkrebszelllinien wurden in T25er-Flaschen bei 37 °C und 10 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert und bei 70 – 80 % Konfluenz passagiert, um ein bestmögliches Wachstum zu garantieren. Zur Überführung wurde das Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)- Medium (10 % Fetal bovine serum (FBS), 1 % 200 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) abgegossen und ein Waschschritt mit 1x Phosphate buffered saline (PBS) durchgeführt. Um die adhärenten Zellen in Lösung zu bringen, wurde 1 ml 0,25 % Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) hinzugegeben und 3 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in einen neuen 15 ml Falcon überführt worden waren, wurde dieses 3 min bei 1200 revolutions per minute (rpm) (310 g) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet je nach Fragestellung und Zellwachstum in einer 1:5-Verdünnung resuspendiert. 1 ml der Zelllösung wurde in eine neue T25er-Flasche überführt, in die zuvor 7 ml des DMEM vorgelegt worden war.

2.2.2 Ficoll-Aufarbeitung von Blutproben für Zytospins

Um Zytospins für die Färbeetablierung herzustellen, wurde die Blutprobe eines gesunden Donoren (EDTA-Röhrchen, 7,5 ml) in ein 50 ml Falcon überführt und 750 µl der Zellkultursuspensionen der Tumorzelllinien SKBR3 oder MCF-7 hinzugefügt. Diese waren zuvor mithilfe von 0,25 % Trypsin-EDTA in Lösung gebracht worden waren und lagen in einer 1:5-Verdünnung mit DMEM-Medium vor (siehe 2.2.1). Das Falcon wurde bis auf 30 ml mit PBS aufgefüllt. 20 ml Ficoll-Lösung wurden daraufhin mit der gespikten Blutprobe vorsichtig überschichtet. Nachdem 30 min bei 1400 rpm (420 g) zentrifugiert worden war, wurde eine Phasentrennung sichtbar. Die Plasmaphase wurde verworfen, während die Interphase, welche die mononukleären des peripheren Blutes (PBMC) inklusive der Tumorzellen enthielt, in ein neues 50 ml Falcon überführt wurde. Es wurde erneut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 1400 rpm (420 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 20 ml PBS resuspendiert.

Um eine definierte Zellzahl (ca. 500.000 Zellen) auf dem Zytospin zu erhalten, wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer die durchschnittliche Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.3) und das daraus kalkulierte Volumen auf den Objektträger mit Trichter gegeben. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm (310 g) wurde der Überstand verworfen und der Zytospin über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Zytospins wurden für die weitere Verwendung bei - 80 °C gelagert.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Um die Konzentration an Zellen in einer mittels des Ficoll-Protokolls aufgearbeiteten Blutprobe (siehe 2.2.2) zu bestimmen, wurde die Zellsuspension in einer 1:2-Verdünnung mit Trypanblau auf einer Mikrotiterplatte gemischt und hiervon 10 µl mit einer Pipette in die Neubauer-Zählkammer übertragen. Anschließend wurde die Anzahl an Zellen in jedem der vier großen Eckquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und ein Mittelwert bestimmt. Die Zellkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

Mittelwert x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellen / ml

Um auf dem Zytospin eine durchschnittliche Zellzahl von 500.000 Zellen zu erhalten, wurde das Volumen der Zellkultursuspension bestimmt, welches mithilfe des Trichters auf den Objektträger aufgetragen werden musste.

2.2.4 Spiken von Tumorzellen zu Blutspendeproben

Im Rahmen der Färbeetablierung wurden Blutproben gesunder Spender mit einer bestimmten Zellzahl an Tumorzellen der Zelllinien SKBR3 oder MCF-7 versehen. Zunächst wurde unsteriles DMEM-Medium in eine Zellkulturschale vorgelegt und die jeweilige Zellkultur auf den Boden der Schale aufgetragen. Die gewünschte Anzahl an Tumorzellen wurde mit einer Pipette unter dem Lichtmikroskop aufgenommen und zu der Blutprobe hinzugegeben. Im Anschluss daran wurde die Probe mittels des Parsortix (ANGLE, Guildford, UK) aufgearbeitet (siehe 2.2.7) und nach entsprechendem Protokoll angefärbt (siehe 2.2.9).

2.2.5 Patientenproben

Für diese Arbeit wurden Blutproben von der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) und der Klinik für Gynäkologie des Marienkrankenhauses (MK) in Hamburg bereitgestellt. Die Proben stammten von 29 HER2-positiven Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs und wurden im Zeitraum von zwei Jahren (zwischen 2016 und 2018) entnommen. Pro Patientin wurden zwei EDTA-Röhrchen (7,5 ml) abgenommen: ein Röhrchen für die Aufarbeitung mittels der Parsortix-Technologie (siehe 2.2.7); das zweite für die Plasma-Isolierung (siehe 2.2.8). Bis März 2018 fanden zum CTC-Nachweis neben dem Parsortix- auch CellSearch-Läufe statt. Ab September 2018 wurde die Probenentnahme auf 12 Patientinnen beschränkt, bei denen zirkulierende Tumorzellen im Verlauf detektiert worden waren. Die neu eingehenden Blutproben dieser Patientinnen wurden anstatt mittels Parsortix-, mithilfe des CellSearch-Systems aufgearbeitet (siehe 2.2.6). Die klinischen Daten der Patientinnen wurden mithilfe von Soarian Clinicals erhoben.

2.2.6 CellSearch-System

Im Rahmen der Dissertation wurde von 40 Patientinnen der Klinik für Gynäkologie des UKE und der Klinik für Gynäkologie des MK 7,5 ml Vollblut in CellSave Preservative Tubes abgenommen und mittels des CellSearch Systems innerhalb von 96 h auf Tumorzellen untersucht. Das CellSearch-System stellt den Goldstandard der CTC-Detektionsmethoden dar und ist als einziger Assay von der FDA für die Detektion zirkulierender Tumorzellen im Prostata-, Brustund Kolonkarzinom zugelassen (Cristofanilli et al. 2004; Bono et al. 2008). Es reichert epitheliale Zellen mittels EpCAM-gekoppelter Ferrofluide an und ermöglicht daraufhin den Nachweis dieser Zellen mittels Antikörpern gegen Panzytokeratine (K8, K18 und K19), CD45 und DAPI⁺. Die Durchführung am CellTracks-AutoPrep-System und die anschließende Auswertung am CellSpotter-Analyzer wurden von speziell geschultem und ausgebildetem Personal übernommen.

2.2.7 ParsortixTM-Technologie

Die Parsortix[™]-Technologie der Firma ANGLE ist ein mikrofluides System zur Gewinnung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut und basiert auf Unterschieden in den physikalischen Eigenschaften der Zellen. Im Vergleich zu anderen Blutkomponenten sind zirkulierende Tumorzellen in der Regel größer und weniger verformbar und können daher in einer speziellen austauschbaren Kassette, durch die ein konstanter Flüssigkeitsstrom fließt, angereichert werden. Die Kassette, in Größe eines Objektträgers, leitet die Zellen graduell auf einen 6,5 µm großen Spalt zu, an welchem die CTCs festgehalten werden, während kleinere Blutbestandteile (z. B. Erythrozyten) diesen passieren und verworfen werden. Indem man den Flüssigkeitsstrom umkehrt, können die CTCs daraufhin aus der Kassette gespült und für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden ("harvest"): FISH, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), Sequenzierung der nächsten Generation (NGS), ICC. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in der Literatur (Hvichia et al. 2016).

Ein Vorteil der ParsortixTM-Technologie ist, dass sie im Gegensatz zu vielen anderen Anreicherungsmethoden unabhängig von Oberflächenmarkern ist und es theoretisch ermöglicht, sowohl CTCs epithelialer als auch mesenchymaler Natur anzureichern. Für die Aufarbeitung der Patientenproben wurde das S50F-Programm verwendet (Separationsdruck von 50 mbar). Die angereicherten Zellen wurden mithilfe eines Trichters direkt auf einen Objektträger übertragen (siehe Herstellerangabe). Nach einem 7-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm (310 g), wurde der Überstand verworfen, der Objektträger über Nacht getrocknet und anschließend bei -80 °C bis zur Anfärbung mittels des HER2-Färbeprotokolls eingefroren. Insgesamt wurden Zytospins von 85 Patientenproben hergestellt, von denen 64 aus der Tagesklinik des UKE und 21 aus der Gynäkologie des MK stammten.

2.2.8 Plasmaaufarbeitung

Das zweite EDTA-Röhrchen wurde für die Isolierung des Blutplasmas verwendet. Hierbei wurde das Röhrchen bei 1160 rpm (300 g) 10 min (Beschleunigung 9, Bremse 1) zentrifugiert und das Plasma in ein 15 ml Falkon überführt. Anschließend fand ein weiterer 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 7740 rpm (2000 g) (Beschleunigung 9, Bremse 1) statt. Die Plasma-Überstände über dem Zellpellet wurden mithilfe einer Pipette vorsichtig in Kryoröhrchen übertragen und diese bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.9 Färbeetablierung

Im Rahmen der Dissertation wurde zunächst anhand der Zytospins von Zellkulturlinien (MCF-7 und SKBR3) eine geeignete HER2-ICC etabliert. Die Methode der ICC beruht auf der Bindung von Antikörpern an ihre entsprechenden Epitope. Zur Anfärbung des HER2-Rezeptors wurden sechs verschiedene anti-HER2-Antikörper ausgetestet und unterschiedliche Färbeprotokolle etabliert (siehe Tabelle 9; Tabelle 10) Bei allen immunzytochemischen Färbungen wurde der Objektträger zunächst mit PFA (je nach Antikörper 0,5 % oder 4 %) für 10 min fixiert, um das Gewebe zu stabilisieren. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde ein Permeabilisierungsschritt durchgeführt, der dazu diente, die Zellen aufzuschließen, um intrazelluläre Bestandteile anzufärben. Nach erneuten Waschschritten mit PBS fand eine Blockierung statt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Bei den beiden Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling) wurden im Laufe der Färbeetablierung verschiedene Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen ausgetestet (siehe Tabelle 11; Tabelle 12).

Auf die Blockierung folgte die Auftragung der Primärantikörper (1 h, RT). Von den sechs Antikörpern, die wir austesteten, waren zwei bereits fluoreszenzmarkiert (HER2-Antikörperklon NB3 (Siemens) und Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch)) und konnten somit direkt detektiert werden (direkte Immunfluoreszenz). Bei den vier weiteren Antikörpern musste jeweils ein passender mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Sekundärantikörper zum Einsatz kommen, der für 45 Minuten aufgetragen wurde. Nach der Inkubation mit Primär- bzw. Sekundärantikörpern wurde ein Antikörpercocktail mit DAPI, Zytokeratin und CD45 für 1 h aufgetragen. Um überschüssigen, ungebundenen AK zu entfernen, wurde nach der Inkubation jedes Antikörpers mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurde der Objektträger eingedeckelt und konnte mithilfe des Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet werden.

Tabelle 9: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone NB3 (Siemens), EPR19547-12 (Abcam) und 3B5 (Abcam)

Antikörper Färbeablauf	Siemens- HER2/neu (NB3)	Abcam-Anti- ErbB2 antibody (EPR19547-12)	Abcam-Anti- ErbB2 antibody (3B5)	
(1) Fixierung (10 min)	4 % PFA			
(2) Waschschritte	1 x 3 min PBS			
(3) Permeabilisierung(10 min)	0,1 % Triton-X 100			
(4) Waschschritte	2 x 3 min PBS			
(5) Blockierung (20 min)	10 % AB-PBS			
(6) Primärantikörper (60 min)	1:100			
(7) Waschschritte	3 x 3 min PBS			
(8) Sekundärantikörper (45 min)	- Alexa Fluor 546 goat Anti-rabbit IgG (1:200)			
(9) Waschschritte	-	3 x 3 min PBS		
(10) Antikörpercocktail (60 min)	Pan Cytokeratin, Alexa Fluor 570, Clone: AE1/AE3 (1:300) CD 45-APC, Clone: REA 747(1:200) DAPI (1:1000)	Pan Cytokeratin, Alexa Fluor 488, Clone AE1/AE3 (1:300) CD 45-APC, Clone: REA 747(1:200) DAPI (1:1000)		
(11) Waschschritte		3 x 3 min PBS		

Tabelle 10: Färbeprotokolle für die HER2-Antikörperklone N24 (Thermo Fisher), Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)

Antikörper Färbeablauf	Thermo Fisher ErbB2 (HER2) Monoclonal Antibody (N24)	CellSearch Anti- HER2/neu (Tumor Phenotyp- ing Reagent)	Cell Signaling HER2/ErbB2 (29D8)	
(1) Fixierung (10 min)	4 % PFA	0,5 % PFA		
(2) Waschschritte	1 x 3 min PBS	3 x 3 min PBS		
(3) Permeabilisierung (10 min)	0,1 % Triton-X 100	0,3 % Saponin		
(4) Waschschritte	2 x 3 min PBS	3 x 3 m	in PBS	
(5) Blockierung (20 min)	10 % AB-PBS	The Blocking Solution, Candor Biosci- ence		
(6) Primärantikörper (60 min)	1:100	1:50	1:100	
(7) Waschschritte	3 x 3 min PBS			
(8) Sekundärantikörper (45 min)	Alexa Fluor 546 goat Anti-rabbit IgG (1:200)	-	Alexa Fluor 546 goat Anti-rabbit IgG (1:200)	
(9) Waschschritte	3 x 3 min PBS	- 3 x 3 min I		
(10) Antikörpercocktail (60 min)	Pan Cytokeratin, Alexa Fluor 488, Clone: AE1/AE3 (1:300) CD 45-APC, Clone: REA 747(1:200) DAPI (1:1000)	Pan Cytokeratin, Alexa Fluor 570, Clone: AE1/AE3 (1:300) CD 45-APC, Clone: REA 747(1:200) DAPI (1:1000)	Pan Cytokeratin, Alexa Fluor 488, Clone: AE1/AE3 (1:300) Pan-Keratin (C11), Mouse mAb (Alexa (R488 Conjugate))(1:300) CD 45-APC, Clone: REA 747(1:200)	
(11) Waschschritte	3 x 3 min PBS	3 x 3 min PBS		
	Getestete Permeabilisierungen			
---	-------------------------------	--------------------	-------------	--------------------------------------
HER2-Antikörperklone	0,1 % Triton- X 100	0,3 % Sapon- in	1 % Saponin	CellSearch Permeabilisie- rung
Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch)	Х	Х	Х	Х
29D8 (Cell Signaling)	Х	Х		

Tabelle 11: Austestung verschiedener Permeabilisierungen mit den HER2-Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)

Tabelle 12: Austestung verschiedener Blockierungen in Kombination mit den HER2-Antikörperklonen Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch) und 29D8 (Cell Signaling)

	Getestete Blockierungen			
HER2-Antikorperklone	10.0/ AD DDS	The Blocking Solu-	DAKO Protein	
	10 /0 AD-FD3	tion	Block Serum-Free	
Tumor Phenotyping Reagent (CellSearch)	Х	Х	Х	
29D8 (Cell Signaling)	Х	Х		

2.2.10 Auswertung der Patientenproben mithilfe des Fluoreszenzmikroskops

Die zuvor angefärbten Objektträger wurden mithilfe des Mikroskops Axioplan 2 Imaging auf Tumorzellen untersucht. Als zirkulierende Tumorzellen wurden diejenigen Zellen bezeichnet, welche sowohl ein positives Signal im DAPI- als auch Zytokeratin-Kanal besaßen und CD45 negativ waren. Bilder wurden mithilfe der AxioVision-Software erstellt (siehe 2.1.8).

2.2.11 Automatisierte Auswertung von Objektträgern mittels Xcyto 10

Im Rahmen der Dissertation wurde das hochsensitive Mikroskop Xcyto 10 der Firma Chemometec ausgetestet, welches qualitative Mikroskopie mit einer semi-automatisierten Auswertung ähnlich der Standarddurchflusszytometrie kombiniert. Nachdem Zytospins mithilfe des Parsortix-Systems (siehe 2.2.7) hergestellt und mit dem HER2-Antikörperklon 29D8 (Cell Signaling) (siehe Tabelle 10) angefärbt wurden, wurde der Objektträger von dem Gerät in einem ca. 10-minütigen Scanprozess erfasst. Als Resultat erhielt man 68 Aufnahmen in 4x-Vergrößerung von allen Bereichen des Objektträgers und konnte anhand der verschiedenen Fluoreszenz (DAPI-positiv, Zytokeratin-positiv, ggf. HER2-positiv) Tumorzellen detektieren. Diese wurden nochmals in 20x-Vergrößerung aufgenommen, um den Tumorzellstatus zu bestätigen. Mithilfe des Plot Managers der Xcyto-View Software wurden verschiedene Parameter in einem Graphen gegeneinander aufgetragen und die Lage der Tumorzellen in diesen Plots bestimmt. Es wurden Bereiche eingegrenzt, in denen die Tumorzellen mit vermehrter Häufigkeit vorlagen (Gating), um diese auf andere Patientenproben zu übertragen und die zirkulierenden Tumorzellen leichter zu orten (siehe 3.5.1).

Insgesamt verglichen wir die Ergebnisse von 27 Proben von 16 Patientinnen zwischen automatisierter Zellidentifikation mittels Xcyto 10 und der manuellen Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop.

2.2.12 Isolierung von Einzelzellen

Um detektierte Tumorzellen für die weitere molekulare Analyse zu gewinnen, wurde zunächst das Deckgläschen von dem entsprechenden Objektträger vorsichtig abgelöst und ein Tropfen PBS hinzugegeben, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen. Die Lage der Tumorzellen war im Vorfeld mithilfe eines New England Finders bestimmt worden, welches ein Objektträger ist, bei dem die Fläche mittels Buchstaben und Zahlen in unterschiedliche Bereiche eingeteilt ist. Nachdem man unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging eine Tumorzelle detektiert hatte, tauschte man den Tumorzell-Objektträger gegen den New England Finder aus und konnte so der Tumorzelle eine eindeutige Position zuordnen. Dies erleichterte das Fokussieren der Tumorzelle unter dem inversen Mikroskop Axiovert 200 für die Isolierung der Einzelzellen. Mittels einer Mikrokapillare, die an einem steuerbaren Mikromanipulator befestigt war, wurden die Tumorzellen vom Objektträger abgelöst und in Eppendorfgefäße übertragen, in die 1 µl PBS vorgelegt worden war. Die gepickten Zellen wurden bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.13 cfDNA-Gewinnung aus Plasma

Im Blutplasma bzw. Serum liegen häufig kurze DNA- (<1000 bp) und RNA-Fragmente (<1000 nt) vor, die als freie-zirkulierende Nukleinsäuren bezeichnet werden. Die Konzentration von frei-zirkulierender DNA (cfDNA) im Plasma von Patientenproben ist sehr gering und liegt zwischen 1-100 ng/ml (siehe QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook), weswegen es sehr sensitiver Aufreinigungsmethoden bedarf. Zur Gewinnung der cfDNA aus Plasma wurde das Circulating nucleic acid kit (50) der Firma Qiagen genutzt. Der Aufbau des QIAvac 24 Plus und das Ansetzen der Puffer und carrier RNA wurden entsprechend des QIAamp Circulating Nucleid Acid Handbuchs durchgeführt. Da die meisten Plasmaproben in einem Volumen von 1,8 ml vorlagen, kam das Protokoll für die Aufarbeitung von 2 ml Plasma zur Anwendung (siehe QIAamp Circulating Nucleid Acid Handbuch).

Das Elutionsgefäß wurde bis zur cDNA-Konzentrationsbestimmung mittels des Qubit® dsDNA HS Assay Kits (siehe 2.2.14) bei 7 °C im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.14 cfDNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der cfDNA wurde mithilfe des Qubit Fluorometers und des Qubit ds-DNA HS Assay Kits durchgeführt. Die cfDNA-Konzentrationsbestimmung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Kit misst Konzentrationen zwischen 10 pg/µl und 100 ng/µl mit großer Genauigkeit (siehe Herstellerangabe). Zunächst wurde eine Qubit Arbeitslösung hergestellt, indem man das Qubit dsDNA HS Reagenz mit dem Qubit dsDNA HS Puffer in einer 1:200-Konzentration verdünnte.

Pro Probe wurde 1 µl der cDNA-Elution mit 199 µl der Arbeitslösung gemischt. Für die Herstellung der beiden Standards wurden 10 µl der jeweiligen Standardreagenzien (Komponente C und D) zu 190 µl der Arbeitslösung hinzugegeben.

Mittels des Qubit Fluorometers wurden zunächst die beiden Standardlösungen eingelesen und anschließend die Konzentration der cDNA-Elution bestimmt.

3 Ergebnisse

Ziel war es, das Blut HER2-positiver Mammakarzinom-Patientinnen auf CTCs zu analysieren und hinsichtlich ihres HER2-Status zu charakterisieren. Dies sollte mittels zwei unterschiedlicher CTC-Anreicherungsverfahren geschehen, um die Chance der Detektion zu erhöhen. Identifizierte CTCs sollten weiterführenden molekularen Analysen zugeführt werden, um sie auf Resistenzmechanismen gegenüber HER2-gerichteten Therapien wie Trastuzumab zu untersuchen.

3.1 Auswertung der CellSearch-Patientenproben

Im Rahmen der Dissertation wurden 80 Proben von 40 Mammakarzinom-Patientinnen, die im Zeitraum von 2016 bis 2018 abgenommen worden waren, mithilfe des CellSearch-Systems ausgewertet (siehe 2.2.5; 2.2.6). Bei 22 dieser Patientinnen war im Vorfeld ein HER2-positiver Primärtumor histologisch gesichert worden.



Abbildung 3: Anteil der Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor an der analysierten Kohorte

72,5 % der analysierten Proben (58/80 Proben) stammten von Patientinnen mit einem diagnostizierten HER2-positiven Primärtumor (siehe Abbildung 3). Bei 36,25 % aller Proben (29/80 Proben) konnten zirkulierende Tumorzellen mittels des CellSearch-Systems festgestellt werden; diese 29 Proben stammten von 21 verschiedenen Patientinnen (21/40 Patientinnen= 52,5 %). 65,52 % der CTC-positiven Proben waren von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor (19/29 Proben) (siehe Abbildung 4). Bei 8 dieser 19 Proben wurden mehr als eine zirkulierende Tumorzelle (42,11 %) und bei 4 dieser Proben mehr als 5 CTCs diagnostiziert (21 %), welches den prognostischen Cut-off von \geq 5 CTCs/7.5 ml Vollblut bei Mammakarzinom-Patientinnen erfüllte (Cristofanilli et al. 2004) (siehe Tabelle 13).



Abbildung 4: Anteil der CTC-positiven Proben von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2positiven Primärtumor an allen CTC-positiven Proben

Patient	Probe	Anzahl CTCs	
1	А	3	
1	В	9	
2	А	1	
3	А	1	
	А	8	
	В	1	
4	С	1	
	D	2	
	Е	2	
5	А	1	
	В	1	
6	А	1	
7	А	1	
8	А	14	
	В	1	
	С	5	
9	А	1	
10	А	16	
11	А	1	

Tabelle 13: Übersicht über die CTC-positiven Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor Um die detektierten Tumorzellen näher auf HER2-Resistenzmechanismen untersuchen zu können, müssen sie anschließend molekularen Analysen zugänglich gemacht werden. Hierfür werden die CellSearch-Kassetten nach erfolgreichem Lauf ausgespült und die Zellen auf Objektträger übertragen von denen sie per Mikromanipulation "gepickt" werden können. Aufgrund der Tatsache, dass nach dem Auswaschen der CellSearch-Cartridge in der Regel etwa 10 % der ursprünglich vorhandenen Zellen wiedergewonnen werden können, wird bei einer zu geringen Anzahl von detektierten Tumorzellen ($\leq 10-20$ CTCs) üblicherweise hierauf verzichtet (Peeters et al. 2013). Für die weitere molekulare Analyse wurden daher lediglich aus einer Probe, die von einer Patientin mit HER2-positivem Primarius stammte, zwei einzelne Tumorzellen isoliert (siehe 2.2.12).

3.2 Auswertung der Parsortix-Patientenproben

3.2.1 Eruierung geeigneter Antikörperklone

Die CTC-angereicherte Zellfraktion, welche mittels des Parsortix-Systems aus dem Vollblut von Mammakarzinom-Patientinnen gewonnen wurde, wurde standardmäßig auf Objektträgern gesammelt, welche bis zu Ihrer Auswertung bei – 80 °C stabil gelagert wurden (siehe 2.2.7). Um die auf diesen Objektträgern vorliegenden CTCs zu identifizieren und hinsichtlich ihres HER2-Status zu charakterisieren, wurde eine geeignete immunzytochemische Färbung etabliert. Hierfür wurden Zytospins der etablierten Zellkulturlinien SKBR3 (HER2-positiv), MCF-7, MDA-231 und MDA-468 (HER2-negativ) herangezogen. Diese Zelllinien bieten aufgrund ihres definierten HER2-Status ideale Kontrollen zur Etablierung des immunozytochemischen HER2-Nachweises. Zur sicheren Bestimmung der Tumorzellen wurden die Zytospins ebenfalls mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) als DNA-Marker, Antikörpern gegen bestimmte pan-Zytokeratine (z. B. AE1/AE3, C11) und CD45 als Ausschlussmarker für Leukozyten angefärbt (siehe 2.2.9). Insgesamt wurden für die Etablierung sechs verschiedene anti-HER2-Antikörper getestet und unterschiedliche Färbeprotokolle angewandt (siehe Tabelle 9; Tabelle 10).

HER2-Antikörperklon NB3 (Siemens)

Der Antikörperklon NB3 (1,01 mg/dl) zeigte ein intensives Fluoreszenzsignal (Alexa 488 – grün) und färbte spezifisch die HER2-positiven SKBR3-Tumorzellen an (siehe Abbildung 5 A und B). Auf dem MCF-7-Zytospin als Negativkontrolle war im HER2-Kanal kein Signal erkennbar (siehe Abbildung 5 C).



Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Antikörpersklons NB3 (Siemens), Konzentration 1,01 mg/ml, in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 %
AB-PBS als Blockierung. Anfärbung der HER2-positiven Tumorzellen (A) und des Leukozyten-Hintergrunds
(B) auf der SKBR3-Positivkontrolle. (C) Keine Färbung des NB3-Klons auf der MCF-7-Negativkontrolle

HER2-Antikörperklon EPR19547-12 (Abcam)

Im Vergleich zum Siemens-Antikörper zeigte der Antikörperklon EPR19547-12 (0,662 mg/ml) ein schwächeres HER2-Signal (Alexa 546 – orange) der SKBR3-Tumorzellen (siehe Abbildung 6 A). Sowohl auf der Positiv- als auch der Negativkontrolle waren unspezifische Signale sichtbar (siehe Abbildung 6 B und C), weswegen die Entscheidung gegen die Verwendung des Abcam-Antikörpers fiel.



Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des EPR19547-12-Klons (Abcam), Konzentration 0,662 mg/ml, in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung. Anfärbung der HER2-positiven Tumorzellen (A) und des Leukozyten-Hintergrunds (B) auf der SKBR3-Positivkontrolle (C) Unspezifische Färbung des EPR19547-12-Klons auf der MCF-7-Negativkontrolle

HER2-Antikörperklon 3B5 (Abcam)

Die HER2-positiven SKBR3-Tumorzellen wurden mithilfe des 3B5-Klons (0,2 mg/ml) intensiv angefärbt (Alexa 546 – orange), die Tumorzellen zeigten jedoch eine angegriffene Morphologie (siehe Abbildung 7 A). Letztere ist vermutlich auf die schlechte Qualität der Kontroll-Zytospins zurückzuführen. Aufgrund der Tatsache, dass der Klon zusätzlich unspezifische Bindungen mit HER2-negativen Tumorzellen (siehe Abbildung 7 C) und dem Leukozytenhintergrund (siehe Abbildung 7 B) einging, wurde auf eine erneute Färbung mit dem Antikörper verzichtet.



Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des 3B5-Antikörperklons (Abcam), Konzentration 0,2 mg/ml in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung. Darstellung der HER2-positiven Tumorzellen (A) und des Leukozyten-Hintergrunds (B) auf der SKBR3-Positivkontrolle (C) Unspezifische Färbung der HER2-negativen Tumorzellen mit dem 3B5-Klon auf der MCF-Negativkontrolle

HER2-Antikörperklon N24 (Thermo Fisher)

Nach Anfärbung mit dem Antikörperklon N24 erschienen die HER2-positiven SKBR3-Tumorzellen intensiv fluoreszierend (Alexa 546 – orange) (siehe Abbildung 8 A). Es traten jedoch unspezifische Signale sowohl bei Leukozyten als auch bei HER2-negativen Tumorzellen (MDA-468) auf (siehe Abbildung 8 B und C). Zusätzlich wirkten die Umrisse einiger Zellen ausgefranst (siehe Abbildung 8 A)



Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Antikörperklons N24 (Thermo Fisher) in Kombination mit 4 % PFA als Fixierung, 0,1 % Triton als Permeabilisierung und 10 % AB-PBS als Blockierung. Anfärbung der Tumorzellen (A) und des Leukozyten-Hintergrunds (B) auf SKBR3-Positivkontrollen. (C) Unspezifische Färbung des Antikörpers auf der MDA-468-Negativkontrolle

HER2-Antikörperklon CellSearch Anti-HER2/neu

Auf dem SKBR3-Objektträger zeigte der Antikörper (Alexa 488 – grün) ein eindeutiges, stark leuchtendes Signal (siehe Abbildung 9 A). Der Leukozyten-Hintergrund wurde sowohl beim SKBR3-, als auch MCF-7-Zytospin leicht mit angefärbt (siehe Abbildung 9 B und C).



Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch in Kombination mit 0,5 % PFA als Fixierung und 10 % AB-PBS als Blockierung. Anfärbung der HER2positiven Tumorzellen (A) und des Leukozyten-Hintergrunds (B) auf der SKBR3-Positivkontrolle. (C) Unspezifisches Signal des Antikörpers auf der MCF-7-Negativkontrolle

3.2.2 CellSearch-Antikörper-ICC-Etablierung

Um eine geeignete Endkonzentration des CellSearch-eigenen HER2-Antikörpers zu ermitteln, wurde der Antikörper zunächst anhand Kontroll-SKBR3-Zytospins, die mittels des Ficoll-Protokolls im Vorfeld hergestellt worden waren (siehe 2.2.2), in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet.



Abbildung 10: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch in unterschiedlichen Konzentrationen anhand von SKBR3-Kontrollobjektträgern (keine Angabe des Herstellers zur Konzentration). (A) 1:10-Verdünnung (B) 1:20-Verdünnung (C) 1:50-Verdünnung (D) 1:100-Verdünnung (E) 1:200-Verdünnung

Mit steigender Verdünnung sank, wie zu erwarten, die Fluoreszenzintensität des Färbesignals (siehe Abbildung 10 A-E). Um Antikörper und damit verbundene Kosten zu sparen, fiel die Entscheidung, die weiteren Kontroll-Zytospins mit einer 1:100-Verdünnung des CellSearch-Antikörpers anzufärben (siehe Abbildung 10 D).

Um zu überprüfen, ob sich die gewählte Antikörperkonzentration im Folgenden auf tatsächliche Patientenproben übertragen lässt, wurden Blutproben gesunder Spender mit SKBR3oder MCF-7-Tumorzellen versetzt, über das Parsortix-System aufgearbeitet und anschließend angefärbt (siehe 2.2.4, 2.2.7, 2.2.9).



D



Abbildung 11: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch in unterschiedlichen Konzentrationen anhand von Parsortix-SKBR3-Objektträgern. (A) 1:10-Verdünnung (B) 1:20-Verdünnung (C) 1:50-Verdünnung (D) 1:100-Verdünnung

Anhand der Färbeergebnisse (siehe Abbildung 11) wurde eine 1:50-Konzentration für die anschließende Färbung von Patientenproben ausgewählt, da hier eine deutlichere Markierung HER2-positiver Tumorzellen zu beobachten war (siehe Abbildung 11 C) Sowohl auf den Ficoll-Objektträgern als auch auf den Objektträgern nach Parsortix-Anreicherung machten die Zellmembranen der Tumorzellen nach der HER2-Anfärbung häufig einen ausgefransten Eindruck (siehe Abbildung 11 C). Um dies zu beheben, wurde der Antikörper in einem zusätzlichen Schritt vor dem restlichen Antikörpercocktail aus DAPI und Zytokeratinen aufgetragen (siehe Tabelle 10).



Abbildung 12: Austestung des CellSearch-Antikörpers in 1:50-Verdünnung anhand von Parsortix-Objektträgern (A) Auftragung des Antikörpers in einem Cocktail (B) Getrennte Auftragung des HER2-Antikörpers vom restlichen Antikörpercocktail (DAPI, Zytokeratin, CD45)

Nach der getrennten Auftragung der Antikörper zeigten die Tumorzellen eine intaktere Morphologie (siehe Abbildung 12 B), weswegen der zusätzliche Färbeschritt ins Protokoll aufgenommen wurde.

Um das Fluoreszenzsignal weiter zu verstärken und Hintergrundsignale abzuschwächen, wurden für diesen Antikörper verschiedene Substanzen zur Permeabilisierung und Blockierung ausgetestet (siehe Tabelle 11; Tabelle 12).







С



D



Abbildung 13: Austestung verschiedener Permeabilisierungssubstanzen in Kombination mit dem Cell-Search-Antikörper (A) Triton 0,1 % (B) 0,3 % - Saponin (C) 1 % - Saponin (D) CellSearch-Permeabilisierung Die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton führte zu keiner sichtbaren Verstärkung des Fluoreszenzsignals (siehe Abbildung 13 A). Im Gegensatz hierzu führte der Einsatz von Saponin zu einem intensiveren HER2-Signal, jedoch gleichzeitig zu einer stärkeren Anfärbung des Leukozyten-Hintergrunds (siehe Abbildung 13 B und C). Die CellSearch-Permeabilisierung zeigte ebenfalls eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals und des Leukozyten-Hintergrunds (siehe Abbildung 13 D).

Da die Einführung einer zusätzlichen Permeabilisierung allein nur eine geringe Auswirkung auf die Qualität der Anfärbung hatte, wurden im folgenden Schritt Triton 0,1 % und Saponin 0,3 % anstatt mit AB-PBS in Kombination mit zwei weiteren Blockierungssubstanzen getestet: Casein (Dako Protein Block Serum Free) und The Blocking Solution von Candor (siehe Abbildung 14). Es wurde jeweils ein SKBR3- und MCF-7-Zytospin angefärbt, die vorher über das Ficoll-Protokoll erstellt worden waren (siehe 2.2.2).



D



Abbildung 14: Austestung verschiedener Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen in Kombination mit dem CellSearch-Antikörper. (A) Triton 0,1 % als Permeabilisierung und 0,1 % Casein als Blockierung (B) Triton 0,1 % als Permeabilisierung und The Blocking Solution von Candor als Blockierung (C) Saponin 0,3 % als Permeabilisierung und Casein als Blockierung (D) Saponin 0,3 % als Permeabilisierung und The Blocking Solution als Blockierung Triton 0,1 % in Kombination mit Casein als Blockierung zeigte ein schwach ausgeprägtes fluoreszierendes Signal (siehe Abbildung 14 A). Die Verwendung von The Blocking Solution führte zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal, bei niedrigerer Hintergrundfärbung (siehe Abbildung 14 B). Größere Zellen mit schwächerer HER2-Intensität wurden im Vergleich zum AB-Serum deutlicher angefärbt. Saponin lieferte zwar das stärkere Fluoreszenzsignal, jedoch nahm auch die Anfärbung des Leukozyten-Hintergrunds deutlich zu (siehe Abbildung 14 C und D), weswegen es als Permeabilisierungssubstanz in Kombination mit diesem Antikörperklon ausgeschlossen wurde.

3.2.3 Cell Signaling-Antikörper-ICC-Etablierung

Wie auch beim CellSearch-Antikörper wurden verschiedene Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen anhand von Ficoll-Zytospins ausgetestet, um das Fluoreszenzsignal weiter zu verstärken und unspezifische Bindungen zu minimieren (siehe Tabelle 11, Tabelle 12).



D



Abbildung 15: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von Cell Signaling in Kombination mit verschiedenen Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen anhand von SKBR3-Zytospins. Färbung mit DAPI, CD45 (**A**) Permeabilisierung mit Triton 0,1 %, Blockierung mit AB-PBS (**B**) Permeabilisierung mit Triton 0,1 % und The Blocking Solution als Blockierung (**C**) Permeabilisierung mit Saponin 0,3 %, Blockierung: AB-PBS (**D**) Permeabilisierung mit Saponin 0,3 %, Blockierung: The Blocking Solution Der Objektträger, bei dem Triton 0,1 % als Permeabilisierung und The Blocking Solution als Blockierung eingesetzt worden waren, zeigte die besten Ergebnisse (siehe Abbildung 15 B). Das HER2-Signal war stark und eindeutig gegenüber dem Leukozyten-Hintergrund abzugrenzen. Triton in Kombination mit AB-Serum zeigte etwas mehr Hintergrund als in Kombination mit The Blocking Solution (siehe Abbildung 15 A). Beim Einsatz von Saponin 0,3 % als Permeabilisierung war sowohl in Kombination mit The Blocking Solution als auch mit dem AB-Serum deutlich mehr Leukozyten-Hintergrund erkennbar (siehe Abbildung 15 C und D).

3.2.4 Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch bzw. Cell Signaling in Kombination mit verschiedenen Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen

Um die getesteten Permeabilisierungen und Blockierungen auch auf spätere Patientenproben anwenden zu können, wurden realistischere Zellzahlen mittels der neu etablierten Protokolle prozessiert. Hierfür wurden 100 SKBR3-Tumorzelllinienzellen in Spenderblut gespiked (siehe 2.2.4), mithilfe der Parsortix-Technologie angereichert (siehe 2.2.7), auf Zytospins aufgetragen und anschließend mittels der etablierten Protokolle angefärbt (siehe 2.2.9).

Der anti-HER2-Antikörper von CellSearch zeigte ein intensives Signal, welches jedoch im Vergleich zur Fluoreszenzintensität des Antikörpers von Cell Signaling unter diesen realistischeren Probenbedingungen deutlich schwächer ausgeprägt war (siehe Abbildung 16). Der Cell Signaling-Antikörper zeigte in Kombination mit Triton 0,1 % und The Blocking Solution viele defekte ausgefranste Zellen. Das Fluoreszenzsignal war jedoch stark und der Hintergrund wurde kaum mit angefärbt (siehe Abbildung 16 B). Die besten Ergebnisse lieferte der Antikörper von Cell Signaling in Kombination mit 0,3 % Saponin als Permeabilisierung und The Blocking Solution seine Solution als Blockierung. Hier zeigten die SKBR3-Tumorzelllinienzellen die intakteste Morphologie (siehe Abbildung 16 C). Jedoch wurde auch in dieser Kombination ein geringer Anteil angegriffener Zellen beobachtet, weswegen im folgenden Schritt Parsortix-Zytospins ohne den Permeabilisierungsschritt mit Saponin angefärbt wurden. Saponin 0,3 % (siehe Abbildung 17 B) zeigte eine deutlichere Anfärbung der großen SKBR3-Tumorzellen, weswegen eine Permeabilisierung für 10 min mit Saponin 0,3 % ins Färbeprotokoll aufgenommen wurde. (Für das finale Färbeprotokoll für die Patientenproben mit dem anti-HER2-Antikörper von Cell Signaling siehe 2.2.9, Tabelle 10)



Abbildung 16: Austestung des anti-HER2-Antikörpers von CellSearch bzw. Cell Signaling in Kombination mit verschiedenen Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen anhand von Parsortix-Objektträgern. (A) Antikörper: CellSearch, Permeabilisierung: Triton 0,1 %, Blockierung: The Blocking Solution (B) Antikörper: Cell Signaling, Permeabilisierung: Triton 0,1 %, Blockierung: The Blocking Solution, (C) Antikörper: Cell Signaling, Permeabilisierung: Saponin 0,3 %, Blockierung: The Blocking Solution





Abbildung 17: Austestung des Cell Signaling-Antikörpers mit (A) und ohne (B) Permeabilisierung mit Saponin 0,3 % anhand von SKBR3-Parsortix-Zytospins.

3.2.5 Auswertung der Patientenblutproben mithilfe der Parsortix-Technologie

Nach erfolgreicher Etablierung des ICC-Färbeprotokolls zur HER2-Detektion (Cell Signaling, Klon 29D8) (siehe 2.2.9, Tabelle 10) wurden insgesamt 82 mittels Parsortix-angereicherte klinische Mammakarzinomproben angefärbt und ausgewertet. 61 Proben wurden im Zeitraum von 2016 bis 2018 zu unterschiedlichen Zeitpunkten von 26 Patientinnen abgenommen. Von diesen 26 wiesen 20 Patientinnen einen histologisch bestätigten HER2-positiven Primärtumor auf. 83,6 % (51/61) der Proben stammten von Patientinnen mit einem HER2-positiven Status (siehe Abbildung 18).



Abbildung 18: Anteil der Proben von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positivem Status an allen Proben



Abbildung 19: Anteil der CTC-positiven Proben an allen Proben

Bei 9,76 % (8 Proben) der insgesamt 82 Proben wurden CTCs detektiert (siehe Abbildung 19). 4 der 26 Patientinnen (15,4 %) waren CTC-positiv, während bei 84,6 % der Patientinnen keine zirkulierenden Tumorzellen festgestellt werden konnten (siehe Abbildung 20).



Abbildung 20: Anteil CTC-positiver Patientinnen an allen 26 Patientinnen



Abbildung 21: Anteil der CTC-positiven Proben von Patientinnen mit gesichertem HER2-positivem Status an allen CTC-positiven Proben

Tabelle 14: Übersicht der CTC-positiven Patientenproben. Rote Markierung: Proben von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positiven Primarius, blaue Markierung: Proben von Patientinnen mit HER2-negativen Primärstatus, grüne Markierung: unklarer Status

Patientennummer	Anzahl der CTCs Fluoreszenzmikroskop	
UKE-1	2	
UKE-2	1	
UKE-3	42	
UKE-4 (1)	6	
UKE-4 (2)	14	
UKE-5	7	
UKE-6 (1)	4	
UKE-6 (2)	5	
UKE-7	1	
UKE-8	1	

Nach Einsicht in die Patientendaten stellte sich heraus, dass 2 der 8 CTC-positiven Proben (25 %) tatsächlich von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positiven Primärtumor stammten (siehe Abbildung 21). 4 der 8 CTC-positiven Proben wurden Patientinnen zugeordnet, bei denen kein HER2-positiver Primarius vorlag. Bei 2 CTC-positiven Proben war der Status der Patientinnen noch unklar. Tabelle 14 zeigt eine Übersicht über die 8 Proben, bei denen CTCs festgestellt wurden. Bei 2 der 4 Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor lagen jeweils 2 Objektträger zu einem Abnahmezeitpunkt vor (siehe UKE-4 (1), UKE-4 (2), UKE-6 (1), UKE-6 (2)).

3.3 Vergleich zwischen Parsortix- und CellSearch-Patientenproben

Von den 29 analysierten Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positiven Primärtumor, konnten bei 19 Proben von 12 Patientinnen entweder über das CellSearch- und/oder über das Parsortix-System \geq 1 CTCs festgestellt werden. Von den 19 CTC-positiven Proben, die mithilfe des CellSearch-Systems bearbeitet worden waren (siehe 2.2.6) und von Patientinnen mit einem histologisch gesichertem HER2-positivem Primärtumor stammten, überschritten 27 % (5/19) den prognostisch relevanten Grenzwert \geq 5 CTCs/ 7,5 ml Blut., welcher eine Aussage über das progressionsfreie und Gesamtüberleben der Patientinnen zulässt (Cristofanilli et al. 2004).

Im Gegensatz zu den CellSearch-prozessierten Proben wurden lediglich bei 3,9 % der Parsortix-angereicherten Proben (siehe 2.2.7) von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor (2/51) Tumorzellen festgestellt. Die Anzahl der CTCs innerhalb der einzelnen Proben war zudem sehr gering (1 und 2 Tumorzellen). 27 Proben HER2-positiver Patientinnen wurden gleichzeitig mittels CellSearch- und Parsortix-System ausgewertet. Bei einer Probe konnten mithilfe beider Anreicherungsmethoden CTCs festgestellt werden. Während mittels Cell-Search-System 9 CTCs detektiert wurden, lag die Anzahl beim Parsortix bei 2. Bei 6 der 27 Proben wurden nur mittels des CellSearch-Systems CTCs festgestellt. 20 der miteinander verglichenen Proben waren sowohl beim CellSearch- als auch Parsortix-System CTC-negativ.

3.4 CTC-Verläufe vor dem Hintergrund laufender Therapien

Unter Berücksichtigung der klinischen Daten wurden die Krankheitsverläufe von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor zusammen mit den mittels Parsortix- und CellSearchermittelten CTC-Zahlen auf einem Zeitstrahl aufgetragen. Im Folgenden wurden exemplarisch die Verläufe von 2 Patientinnen dargestellt.

Patientin 1 zeigte einen Progress des metastasierenden Brustkrebses, weswegen eine Chemotherapie mit Paclitaxel begonnen wurde (siehe Abbildung 22). Zu diesem Zeitpunkt lag mit 14 CTCs eine hohe Tumorzellzahl vor. Im Rahmen der Therapie nahm zwar die CTC-Zahl ab, jedoch zeigte sich ein klinischer Progress, weswegen die Chemotherapie auf T-DM1 umgestellt wurde. Über einen Zeitraum von 1 ½ Jahren waren keine CTCs mehr detektierbar, bis im Februar 2018 via CellSearch 5 Tumorzellen festgestellt werden konnten. Klinisch zeigte sich kein Voranschreiten des Krebses, weswegen die T-DM1-Therapie weitergeführt wurde.



Abbildung 22: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 1 in Kombination mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen, CS=CellSearch, P=Parsortix

Bei Patientin 2 wurde Anfang 2016 ein Progress des Krebsgeschehens festgestellt, weswegen eine Chemotherapie mit Doxorubicin-Hydrochlorid (Caelyx) eingeleitet wurde (siehe Abbildung 23). Unter dieser Therapie zeigte sich eine Abnahme der CTC-Zahl von ursprünglich acht auf eine eine zirkulierende Tumorzelle. Im August 2016 wurde ein Voranschreiten des Tumors beobachtet, welches zu einer Therapieumstellung auf Paclitaxel führte. Jedoch konnte auch mit diesem Chemotherapeutikum keine Regression des Tumors erreicht werden, weswegen die Therapie im Mai 2017 nochmals abgeändert wurde. Zu diesem Zeitpunkt konnten via CellSearch- und Parsortix-System keine CTCs ausgemacht werden. Im Laufe der folgenden Monate schwankte die CTC-Zahl zwischen null und zwei, bis im Februar 2018 ein klinischer Progress festgestellt worden war. Daraufhin wurde im Mai 2018 eine Carboplatin-Behandlung begonnen. Zu dieser Zeit konnten mittels Parsortix keine CTCs detektiert werden.



Abbildung 23: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 2 in Kombination mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen, CS=CellSearch, P=Parsortix

3.5 Automatisierte Auswertung von Objektträgern mittels Xcyto 10

Im Rahmen der Dissertation wurde das hochsensitive Mikroskop Xcyto 10 der Firma Chemometec verwendet, um eine automatisierte Auswertung der mittels der Parsortix-Technologie hergestellten Zytospins zu ermöglichen. Im Gegensatz zum CellSearch- existiert für das Parsortix-System bislang keine validierte Auswertungsplattform, die die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen zulässt. Zu diesem Zweck wurden Gating-Protokolle anhand von gespikten Tumorzelllinien-Blutproben gesunder Spender erstellt, um zwischen Tumorzellen (pan-keratin^{hoch}/CD45^{niedrig}) und den umgebenden PBMCs (pankeratin^{niedrig}/CD45^{hoch}) zu unterscheiden und die Tumorzellen hinsichtlich ihres HER2-Status zu charakterisieren (siehe Abbildung 24). Das Ziel war die Übertragung der Gatings auf sämtliche metastasierende Brustkrebs-Patientenproben und der Vergleich der Xcyto-CTC-Zahlen mit denen der manuellen Auszählung per Fluoreszenzmikroskop.

3.5.1 Etablierung der Gatings

Zur Unterscheidung pan-Keratin-positiver Tumorzellen und CD45-positiver PBMCs wurde die APC-Intensität (CD45) einzelner Zellen gegen die Alexa-Fluor-488-Intensität (pan-keratin) in biexponentieller Skalierung aufgetragen. Zellen mit niedriger CD45- und hoher pan-Keratin-Intensität wurden im Gate eingegrenzt und als Tumorzellen klassifiziert (siehe Abbildung 24 A). Diese konnten in einer Bildergalerie angezeigt und mittels 20facher-Vergrößerung erneut aufgenommen werden, um falsch positive CTCs auszuschließen (siehe Abbildung A.5). Die Etablierung des HER2-Gatings (siehe Abbildung 24 B) erfolgte analog zum Zytokeratin-Gating. Hierbei wurde die APC-Intensität (CD45) einzelner Zellen gegen die Alexa-Fluor-555-Intensität (HER2) aufgetragen. Das Gating stellte hierbei eine Herausforderung dar, da die HER2-positiven Zellen aufgrund ihrer Unterschiede in den Intensitäten eine große Streuung aufwiesen. Um präzise Ergebnisse bezüglich der HER2-Intensität zu erhalten, wurden Objektträger mittels Ficoll-Aufreinigung hergestellt (siehe 2.2.2) und eingescannt, auf denen sich sowohl MCF-7 als auch SKBR3-Tumorzellen befanden. Hierbei wurde die Alexa-Fluor-488-Intensität (Pan-Keratin) gegen die Alexa-Fluor-555-Intensität (HER2) aufgetragen (siehe Abbildung 24 C). Aufgrund der Tatsache, dass SKBR3-Tumorzelllinien eine sehr viel höhere Dichte an HER2-Rezeptoren (Intensität: +3) im Vergleich zu MCF-7-Zelllinien (Intensität: +1) aufweisen, konnte mithilfe dieses Gatings eine Aussage über die HER2-Intensität der Tumorzellen der mBC-Patientenproben gemacht werden.





Abbildung 24: Etablierung von Gatings mithilfe des sogenannten "Plot-Managers" der Xcyto-View-Software. (A) Darstellung des Plots zur Etablierung des Zytokeratin-Gatings, um zwischen Tumorzellen und PBMCs zu differenzieren. APC-Intensitäten (CD45 auf Leukozyten) werden gegen AlexaFluor 488-Intensitäten (pan-Keratin auf CTCs) aufgetragen. Zellen mit niedriger APC-Intensität (CD45) und hoher Alexa Fluor 488-Intensität (pan-Keratin) werden als Tumorzellen klassifiziert (Gate P2). (B) Darstellung des Plots zur Etablierung des HER2-Gatings, um HER2-positive Tumorzellen zu detektieren. APC-Intensitäten (CD45 auf Leukozyten) werden gegen Alexa Fluor 555 (HER-2) aufgetragen. Zellen mit niedriger APC-Intensität (CD45) und hoher Alexa Fluor 555-Intensität (HER2) werden als HER2-positive Tumorzellen klassifiziert (Gate P3). (C) Darstellung der Plots zur Etablierung des HER2-Intensitäts-Gatings. Alexa Fluor 488-Intensitäten (Pan-Keratin auf CTCs) werden gegen Alexa Fluor 555-Intensitäten (HER2 auf CTCs) aufgetragen. P2: MCF-7 Gating. Zellen mit hoher AF-488-Intensität und niedriger AF 555-Intensität

3.5.2 Übertragung der Gatings auf mBC-Patientenproben

Insgesamt wurden 27 Zytospins von 16 Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs, die im Vorfeld mithilfe der Parsortix-Technologie angereichert (siehe 2.2.7) und dem Anti-HER2-Antikörper vom Klon 29D8 (Cell Signaling) angefärbt worden waren (siehe 2.2.9, Tabelle 10), in einem 10-minütigen Scanprozess erfasst und mittels Übertragung der Gatings die Anzahl an CTCs bestimmt. Im Vergleich zur manuellen Auszählung zeigte das Xcyto 10 ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Bildauflösung und Signalintensitäten in den unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (siehe Abbildung 25). 63 % (17/27) der Proben waren mittels beider Auswertungsmöglichkeiten CTC-negativ. Bei 37 % der Proben (10/27) konnten sowohl mittels manueller Auszählung als auch mit dem Scanmikroskop CTCs detektiert werden (siehe Tabelle 15). Insgesamt wurden mittels manueller Auszählung 83 CTCs festgestellt, während die Xcyto-Auswertung 77 CTCs ergab. Bei den meisten Proben (92,6 %, 25/27) wurden mittels beider Mikroskope die gleichen CTC-Zahlen ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Xcyto 10 die Möglichkeiteines guten, standardisierten Detektionssystems bietet, weswegen es in unsere Publikation aufgenommen wurde (Koch et al. 2020).

Tabelle 15: Übersicht über CTC-positive Patientenproben und deren mittels manueller und automatisierter Auswertung ermittelten CTC-Zahlen. Charakterisierung der Tumorzellen hinsichtlich ihres HER2-Status.

Probennummer	Proben-ID	Anzahl der CTCs (manuelle Auswertung)	Anzahl der CTCs (Xcyto 10)	HER2- Intensität
1	mBCa_38	2	2	HER2 1+; HER2 3+
2	mBCa_39	1	1	HER2 3+
3	mBCa-40	42	38	4 HER2 1+
4	mBCa_15 (1)	6	6	4 HER2 1+; 1 HER2 3+
5	mBCa_15 (2)	14	14	12 HER2 1+; 1 HER2 3+
6	mBCa_42	7	5	6 HER2 1+; 1 HER2 3+
7	mBCa_27 (1)	4	4	4 HER2 1+
8	mBCa_27 (2)	5	5	5 HER2 1+
9	mBCa_41	1	1	HER2 1+
10	mBCa_43	1	1	HER2 1+
Gesam detektier	tanzahl ter CTCs	83	77	



Abbildung 25: Vergleich der CTC-Aufnahmen von Fluoreszenzmikroskop (A, C, E) und Xcyto 10 (B,D,F) in 20-fach Vergrößerung. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt, der Tumorzellmarker Pan-Keratin-Alexa Fluor 488 wurde verwendet (grün), der HER2-Marker-Alexa Fluor 555 wurde verwendet (gelb) und CD45 (rot) als negativer Selektionsmarker für PBMCs

4 Diskussion

Im Rahmen der Dissertation analysierten wir das Blut von HER2-positiven Mammakarzinom-Patientinnen auf zirkulierende Tumorzellen – mit besonderem Hinblick auf deren HER2-Status. Hierzu bedienten wir uns zweier CTC-Anreicherungsmethoden, die sich durch ihre verschiedenen Ansätze komplementieren und somit die Chance auf Detektion von Tumorzellen erhöhen. Im Gegensatz zum etablierten CellSearch- ist das Parsortix-System noch nicht ausreichend validiert, weswegen wir die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen.

4.1 Detektion von CTCs mittels CellSearch bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Das von der FDA zugelassene CellSearch-System stellt derzeit den Goldstandard für die Detektion von CTCs bei metastasierendem Brust-, Darm- und Prostatakrebs dar (Riethdorf et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass die Detektion von mehr als 5 CTCs in 7,5 ml peripherem Blut mit einem geringeren progressionsfreien- und Gesamt-Überleben bei diesen Patientenkollektiven assoziiert ist (Cristofanilli et al. 2005). Bei 36,25 % (29/80) der von uns analysierten Proben von Brustkrebspatientinnen konnten zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden (siehe 3.1). Von diesen 29 CTC-positiven Proben stammten 66 % (19/29) von Patientinnen mit einem histologisch gesicherten HER2-positiven Primärtumor (siehe Abbildung 4). Lediglich 21 % dieser 19 Proben (4/19) zeigten eine CTC-Zahl von mehr als 5 CTCs in 7,5 ml peripherem Blut, womit der Anteil an Patientenproben, die den prognostisch relevanten Grenzwert erreichten, im Vergleich zu vorherigen Studien geringer war (Giuliano et al. 2011; Bidard et al. 2014; Banys-Paluchowski et al. 2017). In diesen Arbeiten wurde ebenfalls das Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom auf CTCs untersucht, jedoch anhand größerer Patientenkollektive, weswegen wir uns in Bezug auf unserer Projekt dazu entschieden, die Probensammlung fortzusetzen, um eine höhere Verwertbarkeit unserer Ergebnisse zu erzielen. Neben der geringen Stichprobengröße könnte der Zeitpunkt der Datenerfassung ursächlich für die niedrigen CTC-Zahlen sein. Während in den o.g. Studien vor allem Baseline-CTC-Werte vor Einleitung der Erstlinientherapie erhoben wurden, wurden die CTC-Zahlen unseres Projekts zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Behandlungsverlauf erfasst (siehe 3.4). Im Hinblick auf unsere Patientenproben fiel auf, dass jene 4 Proben, die den prognostisch relevanten Grenzwert erreichten, zu Zeitpunkten abgenommen wurden, an denen sich ein klinischer Progress des Mammakarzinoms zeigte (siehe 3.4). Nach Einleitung systemischer

Therapien lag die CTC-Zahl bei diesen Patientinnen unter dem prognostischen Grenzwert, was auf eine Remission bzw. Stabilisierung der Erkrankung hindeuten könnte (Hayes et al. 2006). Eine Metaanalyse aus 50 Studien mit 6712 Brustkrebspatientinnen ergab, dass die Durchführung systemischer Therapien zu einer signifikanten Abnahme der CTCpositiven Rate führe, welche möglicherweise als Indikator für die Effektivität einer Behandlung dienen könne (Yan et al. 2017). Riethdorf et al. (2017) untersuchten im Rahmen der Gepar-Quattro-Studie den prognostischen Wert von CTCs vor und nach der Durchführung einer neoadjuvanten Therapie. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mittels CellSearch detektierte CTCs vor der Durchführung einer neoadjuvanten Behandlung Aussagen über das krankheitsfreie und Gesamt-Überleben zulassen, während CTC-Zahlen nach neoadjuvanter Therapie keinen prognostischen Wert besitzen (Riethdorf et al. 2017). Es gilt in Zukunft anhand weiterer Studien zu überprüfen, inwieweit mithilfe des CellSearch erhobene CTC-Zahlen Aufschluss über den Therapieerfolg geben und in die Therapieentscheidung einbezogen werden können. Für die weitere molekulare Analyse isolierten wir von einer Probe, die von einer Patientin mit histologisch gesichertem HER2-positivem Primärtumor stammte und bei der im Vorfeld mittels des CellSearch-Systems 9 CTCs detektiert worden waren, zwei einzelne Zellen (siehe 3.1). Für das manuelle Picken bedarf es des Auswaschens der CellSearch-Cartridge. Hierbei können erfahrungsgemäß nur ca. 10 % der Zellen aus der Cartridge gewonnen werden, weswegen bei niedrigen CTC-Zahlen auf die Isolierung von Einzelzellen verzichtet wird (Peeters et al. 2013). Die geringe Anzahl von CTCs im peripheren Blut wird als häufiges Hindernis bei der Detektion und Charakterisierung der Tumorzellen gehandelt; so beträgt das Verhältnis von CTCs zu peripheren Blutzellen (PBMCs) nur 1/106-107, was die Bedeutung von CTC-Anreicherungsmethoden, wie dem CellSearch-System, unterstreicht (Joosse et al. 2015). Der Nachteil dieses Systems ist die Abhängigkeit vom Oberflächenmarker EpCAM, dessen Expression im Rahmen der EMT verringert wird und somit nicht mehr als Zielstruktur für die immunmagnetische Bindung von Antikörpern zur Verfügung steht (Gorges et al. 2012). Aus diesem Grund wird mittlerweile vermehrt ein Augenmerk auf jene Anreicherungsmethoden gelegt, welche die Tumorzellen Marker-unabhängig und aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften von den umgebenden PBMCs isolieren und für weitere molekulare Analysen zugänglich machen.

4.2 Detektion von CTCs mittels Parsortix bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Das Parsortix-System stellt eine vielversprechende Marker-unabhängige CTC-Anreicherungsmethode dar, die auf Größen- und Verformbarkeitsunterschieden der Tumorzellen beruht und die Isolation von lebensfähigen CTCs und CTC-Clustern (Gkountela et al. 2019) für molekulare und funktionelle Analysen ermöglicht (Xu et al. 2015; Hvichia et al. 2016; Koch et al. 2020).

4.2.1 Eruierung geeigneter Antikörperklone

Im Vergleich zum etablierten CellSearch-System war die CTC-Anreicherung mittels Parsortix bislang nicht standardisiert. Dies äußerte sich z. B. in der Verwendung unterschiedlicher Arbeitsprotokolle zur CTC-Anreicherung und erschwerte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen und Studien (Koch et al. 2020). Des Weiteren beschränkten sich die bereits veröffentlichten Färbeprotokolle des Parsortix-Systems auf die sogenannte "Basisfärbung" aus DAPI, Zytokeratinen und CD45 (Hvichia et al. 2016; Chudziak et al. 2016), während die Anfärbung weiterer Marker bisher Benutzer-definiert war (Miller et al. 2018).

Unser Ziel bestand darin, eine einheitliche, optimierte Färbemethode für die Identifizierung von HER2-positiven CTCs mithilfe des Parsortix-Systems zu entwickeln. Zu diesem Zweck testeten wir sechs verschiedene anti-HER2-Antikörper aus und etablierten geeignete Färbeprotokolle (siehe Tabelle 9 und 10). Die besten Ergebnisse erzielten wir mit dem Antikörper-Klon NB3 (Siemens). Dieser überzeugte mit hoher Spezifität und intensivem Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 5 A). Die direkte Konjugation des Antikörpers machte die Verwendung eines Sekundärantikörpers überflüssig und führte daher zu einer deutlichen Zeitersparnis bei der Durchführung des Färbeprotokolls. Es zeigte sich kein unspezifisches HER2-Signal auf der Negativkontrolle (MCF-7 Tumorzellen) (siehe Abbildung 5 C). Bislang ist dieser Antikörper nicht kommerziell erhältlich, weswegen wir weitere Antikörperkandidaten evaluierten.

Die Klone EPR19547-12 (Abcam), 3B5 (Abcam Biotin) und N24 (Thermo Fisher) wurden für die weitere Anfärbung der Patientenproben ausgeschlossen, da sie unspezifische Bindungen mit Leukozyten bzw. HER2-negativen Tumorzellen eingingen (siehe Abbildung 6-8). Sowohl der anti-HER2-Antikörper von CellSearch als auch der von Cell Signaling (Klon 29D8) zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal bei HER2-positiven Tumorzellen (SKBR3) (siehe Abbildung 9 A und 15). Wie bereits der Antikörperklon NB3 (Siemens) war auch der CellSearch-Antikörper direkt fluoreszenzmarkiert, während beim Cell Signaling-Antikörper ein zusätzlicher Färbeschritt mit einem Sekundärantikörper durchgeführt werden musste (siehe Tabelle 9 und 10). Beide Antikörperklone zeigten auf den Positivkontrollen (SKBR3) eine dezente Anfärbung des Leukozyten-Hintergrunds (siehe Abbildung 5 und 15), woraufhin Abänderungen im Färbeprotokoll im Hinblick auf Permeabilisierungs- und Blockierungssubstanzen vorgenommen wurden (siehe Abbildung 14 und 15). Erfahrungsgemäß ist die Morphologie der Tumorzellen aus Patientenblut im Vergleich zu den Kontrollen mit Tumorzelllinien aus der Zellkultur angegriffener. Ursächlich hierfür sind zum einen die Scherkräfte und Kollisionen mit anderen Blutzellen, denen die CTCs bereits im Voraus im Blutstrom des Patienten/der Patientin ausgesetzt waren (Joosse et al. 2015). Zum anderen werden die Tumorzellen durch laufende Therapien angegriffen und im besten Fall zerstört, was sich in der Reduktion der CTC-positiven Rate widerspiegelt (Yan et al. 2017). Eine weitere Ursache für die angegriffene Morphologie ist, dass die CTCs während des Parsortix-Durchlaufs, insofern sie nicht fixiert sind, einem bestimmten Druck ausgesetzt werden (Koch et al. 2020). Dies unterstreicht die Relevanz einer eindeutigen Färbung der Tumorzellen auf den Kontrollobjektträgern für die erfolgreiche Übertragung auf spätere Patientenproben.

Als Permeabilisierungssubstanzen wurden Triton 0,1 %, Saponin 0,3 und 1 % sowie die Cell-Search-Permeabilisierung (siehe Tabelle 11), als Blockierungssubstanzen AB-PBS, Casein (Dako Protein Block Serum Free) und The Blocking Solution von Candor ausgetestet (siehe Tabelle 12). Die Kombination von 0,1 % Triton als Permeabilisierung und the Blocking Solution als Blockierung überzeugte auf den Kontrollobjektträgern aufgrund der Stärke des HER2-Fluoreszenzsignals des Cell Signaling-Antikörpers und der Abnahme der unspezifischen Signale im Hintergrund (siehe Abbildung 15 B). Besonders größere Tumorzellen mit schwächerer HER2-Intensität wurden deutlicher angefärbt und konnten gut vom Leukozyten-Hintergrund abgegrenzt werden.

Um die Färbeergebnisse von den Ficoll-Objektträgern auch auf die späteren Patientenproben zu übertragen, wurden die zuvor selektierten Färbeprotokolle auf Parsortix-Objektträgern getestet. Für die Herstellung wurden im Vorfeld SKBR3-Zellen in gesundes Patientenblut gespiked und über die Plattform angereichert (siehe 2.2.4; 2.2.7). Im direkten Vergleich der beiden Antikörper wurde besonders deutlich, dass das Fluoreszenzsignal des Cell Signaling deutlich stärker als das des CellSearch-Antikörpers ausgeprägt war, weswegen wir uns für die weitere Verwendung dieses Antikörpers entschieden (siehe Abbildung 16 B und C). Im Gegensatz zu den Ficoll-Kontrollen überzeugte bei den gespikten Parsortixproben die Kombination aus 0,3 %-Saponin als Permeabilisierung und The Blocking Solution von Candor als Blockierung (siehe Abb. 16 C), woraufhin wir diese Substanzen in das finale Färbeprotokoll aufnahmen und für die Anfärbung der Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom verwendeten (siehe Tabelle 10).

4.2.2 Analyse der Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mittels Parsortix

Im Rahmen der Dissertation analysierten wir 82 Blutproben von Brustkrebspatientinnen, die mithilfe des Parsortix-Systems angereichert und anschließend gefärbt worden waren (siehe 2.2.7, 2.2.9). Bei 9,8 % (8/82) der Proben konnten zirkulierende Tumorzellen identifiziert werden (siehe Abbildung 19), von denen 25 % (2/8) von Patientinnen mit einem histologisch gesicherten HER2-positiven Primärtumor stammten (siehe Abbildung 21). Unglücklicherweise lag bei diesen beiden Proben ähnlich zum CellSearch-System eine geringe Anzahl von CTCs vor, weswegen auf die Isolierung der Einzelzellen für die weitere molekulare Untersuchung verzichtet wurde. Eine Ursache hierfür ist, dass mittels beider Anreicherungsverfahren ein Verlust an Tumorzellen verzeichnet werden kann. Die Patientenproben, welche für die Anreicherung mittels des Parsortix-Systems vorgesehen waren, wurden in EDTA-Blutröhrchen gesammelt. Im Gegensatz zum CellSearch-System unterliegen die Zellen hierbei keiner unmittelbaren Fixierung, weswegen sie anfälliger für Schäden sind (Koch et al. 2020). Mittlerweile konnte anhand von Spiking-Experimenten mit der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-468 gezeigt werden, dass die Verwendung von TransFix- im Vergleich zu EDTA-Röhrchen unter den gleichen Bedingungen zu einer höheren CTC-Auffangrate führt (TransFix: 64 %, EDTA: 60,7 %) (Koch et al. 2020). Diese Ergebnisse lagen jedoch zum Zeitpunkt der Probenentnahme für unser Projekt noch nicht vor.

Die mittels Parsortix-ermittelten CTC-Zahlen sind wie beim CellSearch abhängig vom jeweiligen Patienten, dem vorliegenden Krankheitsstatus und den laufenden Therapien. Des Weiteren kann auch das Weiterverarbeiten der Probe, wie zum Beispiel die Zytospin-Zentrifugation, Färbeprozesse und Waschschritte zu einer Ablösung der Zellen vom Objektträger führen.

4.3 Vergleich beider Anreicherungs- und Detektionssysteme

Anhand der 27 Proben von Brustkrebspatientinnen mit histologisch gesichertem HER2positivem Primärtumor, welche mittels beider Anreicherungsmethoden bearbeitet worden waren, konnte gezeigt werden, dass in unseren Experimenten das CellSearch- dem Parsortix-System in der Erfassung der zirkulierenden Tumorzellen überlegen war (siehe 3.3). Bei einer Probe lagen sowohl beim CellSearch- als auch Parsortix-System CTCs vor, jedoch unterschied sich die Anzahl an detektierten Zellen (CellSearch: 9 CTCs, Parsortix: 2 CTCs). 6 Proben wurden nur mithilfe der CellSearch-Technologie als CTC-positiv erkannt. Obwohl bei 33 % (2/6) dieser Proben der prognostisch relevante Grenzwert von \ge 5 CTCs / 7,5 ml Blut überschritten wurde, waren auf den Parsortix-Objektträgern keine Tumorzellen detektier bar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu vorherigen Studien, in denen kein signifikanter Unterschied in der Zellerfassung beider Anreicherungsmethoden festgestellt worden war (Hvichia et al. 2016; Chudziak et al. 2016). In diesen Publikationen lieferte das Parsortix-System in der Detektion EpCAM-positiver Tumorzellen vergleichbare CTC-Zahlen wie das CellSearch-System. Es überzeugte jedoch gegenüber dem CellSearch-System in der Anreicherung EpCAM-negativer oder schwach-exprimierender Tumorzellen, was den Vorteil einer Marker-unabhängigen Anreicherungsmethode wie dem Parsortix-System unterstreicht (Chudziak et al. 2016).

Das CellSearch-System wurde bislang für Patienten mit metastasierten Mamma-, Prostata- und Kolorektal-Karzinomen von der FDA zugelassen, da bei diesen Tumorentitäten der Nachweis von CTCs mit einem geringeren progressionsfreien und Gesamt-Überleben einhergeht (Miller et al. 2010). Im Hinblick auf andere Tumorentitäten, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, lieferte das CellSearch-System niedrige CTC-Detektionsraten, weswegen Janning et al. (2019) das Parsortix-System bei dieser Tumorerkrankung austesteten. Hierbei überzeugte die Parsortix- im Vergleich zur CellSearch-Technologie mit einer erhöhten CTC-Sensitivität (Janning et al. 2019), was dafür spricht, dass der Nutzen beider Anreicherungsmethoden Entitätenabhängig ist. Es ist naheliegend, dass bei Tumorentitäten, die vermehrt mesenchymale Marker exprimieren, mittels des Parsortix-Systems höhere CTC-Zahlen ermittelt werden könnten. Mithilfe der Anfärbung zusätzlicher mesenchymaler Marker und der Anwendung weiterer Fluoreszenzkanäle könnte die CTC-Detektionsrate in Zukunft gesteigert werden. Auf den CTCs von Patientinnen mit metastasiertem HER2-positivem Brustkrebs könnte vermehrt der EpCAM-Oberflächenmarker exprimiert werden (Soysal et al. 2013), was eine Erklärung dafür wäre, weswegen das CellSearch- dem Parsortix-Systems im Hinblick auf diese Entität überlegen ist. Aufgrund der Tatsache, dass unser Patientenkollektiv recht klein war, konnten leider keine statistischen Signifikanzen berechnet werden.

Einige Forschungsarbeiten beschäftigten sich bereits mit der Frage, ob die gemessene CTC-Anzahl ein Indikator für die Tumorprogression und/oder den Therapieerfolg sein könnte (Cristofanilli et al. 2004; Müller et al. 2012). Bislang sprechen die meisten Studien dafür, dass die Detektion von CTCs mit einer höheren Progressionswahrscheinlichkeit der Tumorerkrankung einhergeht (Hartkopf et al. 2011; Yan et al. 2017). Aus diesem Grund stellten wir in unserer Arbeit, wenn möglich, die mittels Parsortix und/oder CellSearch ermittelten CTC-Zahlen von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor den jeweiligen Krankheitsverläufen gegenüber, um Informationen über den prognostischen Wert der zirkulierenden Tumorzellen zu erhalten (siehe 3.4). Kongruent zum klinischen Progress des metastasierenden Brustkrebses zeigte sich bei Patientin 1 eine hohe CTC-Zahl (14 Tumorzellen)(siehe Abbildung 22). Die Einleitung der Chemotherapie mit Paclitaxel führte zur Abnahme der CTC-Zahl, jedoch war klinisch weiterhin eine Ausbreitung des Tumors sichtbar, weswegen die Therapie auf Trastuzumab-Emtansin umgestellt wurde. Unter diesem Regime waren über 1 1/2 Jahre keine CTCs detektierbar, bis im Februar 2018 mithilfe des CellSearch-Systems 5 zirkulierende Tumorzellen festgestellt wurden. Klinisch zeigte sich jedoch kein Progress, weswegen die Therapie mit T-DM1 im Juni 2018 fortgeführt wurde. Dies wirft die Frage auf, ob die festgestellte CTC-Anzahl als ein erstes Anzeichen für das Fortschreiten des Tumors bei der Patientin gewertet werden kann. Hayes et al. (2006) konnten zeigen, dass die Detektion von erhöhten CTC-Zahlen zu beliebigen Therapiezeitpunkten mit vermehrter Progression und Mortalität der Patientinnen mit metastasierenden Brustkrebs einhergeht. Auch Wülfing et al. (2006) belegten, dass das Vorliegen von HER2positiven CTCs mit einem geringeren Gesamtüberleben korreliert. Um zu klären, ob die CTC-Zahl auch bei unserer Patientin ein Indikator für das Therapieansprechen ist, bedarf es weiterer CTC-Verlaufspunkte mit besonderem Hinblick auf die Krebsentwicklung, weswegen wir uns dazu entschieden, weitere Proben von CTC-positiven Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positivem Primärtumor zu sammeln und diese mithilfe des CellSearch-Systems zu analysieren, da wir uns mit dieser Anreicherungs- und Detektionsmethode aufgrund der in 3.4 vorliegenden Ergebnisse höhere Detektionsraten als mit der Parsortix-Technologie versprachen. Die Probensammlung läuft derzeit weiter und es sind molekulare Analysen angedacht, um Resistenzentwicklungen im Krankheitsverlauf betrachten zu können.

4.4 Automatisierte Auswertung von Objektträgern mittels Xcyto 10

An fast alle CTC-Anreicherungsmethoden schließt sich bisher eine manuelle Auszählung der Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop an, welche zeitaufwendig ist (ca. 20 min pro Objektträger) und zu Untersucher-abhängigen Ergebnissen führt (Koch et al. 2020). Aus diesem Grund ist es schwierig, die Resultate verschiedener Arbeitsgruppen miteinander zu vergleichen. Um den erstrebten Einsatz der neuen CTC-Detektionsmethoden im klinischen Alltag zu ermöglichen, bedarf es daher neben standardisierter Anreicherungs- und Färbeprotokolle auch möglichst automatisierter Auswertungsverfahren, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen (Koch et al. 2020). In diesem Zusammenhang testeten wir das hochsensitive Mikroskop Xcyto 10 der Firma Chemometec, welches eine semiautomatisierte Auswertung der mittels Parsortix-hergestellten Zytospins ermöglichte. Hierbei wurde der Objektträger in einem 10minütigen Scanprozess vollständig erfasst, welches eine große Zeitersparnis im Vergleich zur manuellen Auszählung bedeutete und die Anzahl der CTCs anhand zuvor erstellter Gatings bestimmt.

Ähnlich wie mithilfe des CellSearch-Analysers ermöglichte die Bildergalerie der Xcyto-View-Software einen Überblick über die erfassten potentiellen CTCs, wodurch der Untersucher die Möglichkeit erhielt, Ergebnisse zu kontrollieren und ggf. bestimmte Gating-Parameter anzupassen, um die Detektion von falsch-positiven "Hits" zu verhindern (siehe Abbildung A.5). Die Aufnahmen der CTCs in 4-facher bzw. 20-facher Vergrößerung überzeugten in ihrer Auflösung und entsprachen in ihrer Qualität den Aufnahmen, die mittels des Fluoreszenzmikroskops aufgenommen worden waren (siehe Abbildung 25). Bei 27 Proben, die von 15 Brustkrebspatientinnen stammten, zeigten die manuelle und semiautomatisierte Auswertung große Übereinstimmungen (siehe Tabelle 15), weswegen das Xcyto 10 als nützliche CTC-Screening-Plattform angesehen werden kann.

Neben dem Zytokeratin-Gating (siehe Abbildung 24 A), welches CTCs aus Patientenproben zuverlässig erfasste, gelang es uns anhand von Zellkulturlinien ein HER2-Gating zu entwickeln, mithilfe dessen die HER2-Intensität der zirkulierenden Tumorzellen eindeutig bestimmt werden konnte (siehe Abbildung 24 C). Bislang wurde in der klinischen Praxis zur Feststellung des HER2-Status eine Gewebeprobe des Primärtumors entnommen und diese mittels FISH oder ICC auf HER2-Expression untersucht (Zarbo und Hammond 2003). Riethdorf et. al. (2010) konnten jedoch zeigen, dass auch bei Patientinnen mit HER2-negativen Primärtumoren zirkulierende Tumorzellen mit einem HER2-positiven Status vorliegen, was vermuten lässt, dass auch bei diesen Patientinnen eine zielgerichtete HER2-Therapie von Nutzen sein könnte. Folglich bedarf es in Zukunft weiterer Screening-Methoden, die den aktuellen HER2-Status der zirkulierenden Tumorzellen wiedergeben, um einen Therapieerfolg mit Trastuzumab zu garantieren. Für das von der FDA zugelassene CellSearch-System wurde bereits ein Klassifikationssystem für die HER2-Intensitätsbestimmung entwickelt (0=HER2-negativ, 1+=HER2negativ, 2+= fraglich HER2-positiv, 3+=stark HER2-positiv) (Riethdorf et al. 2010). Da das CellSearch-System nur epitheliale Tumorzellen erfasst, bestand die Notwendigkeit, auch für Marker-unabhängige Anreicherungsmethoden wie dem Parsortix-System automatisierbare Techniken zur HER2-Intensitätsbestimmung zu entwickeln, weswegen das von uns erstellte Gating in der Detektion und Charakterisierung von HER2-positiven Tumorzellen einen vielversprechenden Fortschritt darstellt.

Das Xyto 10 überzeugte in der Darstellung und zuverlässigen Erfassung zirkulierender Tumorzellen, weswegen die Ergebnisse meiner Arbeit in eine wissenschaftliche Publikation aufgenommen wurden (Koch et al. 2020).

4.5 Ausblick

Um aussagekräftige Ergebnisse von einer größeren Patienten-Stichprobe zu erhalten, werden weiterhin Proben von Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor abgenommen.

Ein besonderes Augenmerk soll auf jene Patientinnen gelegt werden, bei welchen im Verlauf bereits zirkulierende Tumorzellen entweder mittels CellSearch oder Parsortix festgestellt worden waren. Die erfassten CTC-Zahlen sollen in Verbindung mit den Patientendaten Aufschluss darüber geben, ob sich die CTC-Zahl als Verlaufsparameter für die Tumorentwicklung beim HER2-positiven Mammakarzinom eignet und Rückschlüsse auf die Entstehung von Resistenzmechanismen gegenüber Therapien zulässt. Bei unseren Studien konnte mit der Cell-Search-Technologie im Vergleich zum Parsortix-System eine höhere Anzahl von Tumorzellen ermittelt werden, weswegen weitere HER2-positive Brustkrebsproben für dieses Projekt mit dieser Anreicherungsmethode bearbeitet werden sollen.

Unabhängig davon ist die Austestung des Parsortix-Systems momentan fester Bestandteil der Forschung, da es viele Vorteile gegenüber anderen Methoden bietet, wie z. B. die Markerunabhängige Anreicherung von Tumorzellen, die Isolation lebensfähiger CTCs für weitere molekulare und funktionelle Analysen sowie eine hohe Reinheit der erfassten CTCs (Hvichia et al. 2016). In unserer Veröffentlichung vom Februar 2020 präsentierten wir bereits standardisierte Arbeitsprotokolle und optimierte Verfahrenstechniken zur verbesserten CTC-Anreicherung, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Forschungsgruppen zu erzielen (Koch et al. 2020). In Zukunft bedarf es weiterer Studien, um den klinischen Nutzen dieser standardisierten Protokolle auch im Hinblick auf andere Tumorentitäten zu überprüfen (Koch et al. 2020).

Bei jeder gesammelten Patientenblutprobe wird in diesem Projekt nach wie vor Plasma gewonnen, um die Probe hinsichtlich der zirkulierenden freien Tumor-DNA (cfDNA) zu analysieren. Diese soll entweder mittels der Verwendung eines definierten Gen-Panels oder anhand von Digital Droplet PCR auf Resistenz-vermittelnde Mutationen untersucht werden. In einer aktuellen Publikation betonen Taveira et al. (2017) die Notwendigkeit weiterer Mutationsanalysen, da neben der PI3K-Mutation, welche seit längerem mit der Resistenzentwicklung gegenüber Trastuzumab in Zusammenhang gebracht wird, bei vielen Patientinnen signifikante Veränderungen in den Genen EGFR, BRAF und KIT vorliegen, die die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges vermitteln. Da die Stichprobe bezüglich dieser Mutationen bislang sehr klein ist, erhoffen wir uns anhand unserer Proben neue Aufschlüsse über die Frequenz von Mutationen zu erhalten, welche eine Resistenz gegenüber Trastuzumab vermitteln. Ein gutes Verfahren, um DNA hinsichtlich seltener Mutationen zu analysieren, ist das Verfahren der Digital Droplet PCR, welches die Quantifizierung von Nukleinsäuren ermöglicht. Mithilfe einer Wasser-Öl-Emulsion wird die Probe in ca. 20.000 Nanoliter-große Tropfen aufgeteilt, welches dazu dient, die einzelnen Zielstrukturen voneinander in verschiedene Reaktionskammern zu separieren. Nachdem die PCR-Amplifikation in jedem dieser Tropfen stattgefunden hat, wird die Anzahl von Fluoreszenzsignalen der Zielmoleküle bestimmt (Hindson et al. 2011). Da diese proportional zu der Gesamtzahl der in Probe vorliegenden Moleküle ist, kann mithilfe der Poisson-Verteilung die Konzentration der Zielsequenz in der Ausgangsprobe bestimmt werden. Die Vorteile der Digital Droplet PCR sind, dass sie eine höhere Sensitivität und Spezifität als die quantitative PCR (qPCR) aufweist, da Störfaktoren, wie zum Beispiel Inhibitoren und Hintergrund-DNA, eine zu vernachlässigende Rolle spielen. Mithilfe der Digital Droplet PCR kann selbst aus kleinen Probenvolumina eine Aussage über DNA/RNA-Konzentrationen und das Vorliegen von seltenen Mutationen gemacht

werden. (Hindson et al. 2011).
5 Zusammenfassung

Die Unterteilung in molekulare Subtypen anhand von immunhistochemischen Markern wie z. B. Hormon- und HER2-Rezeptoren ist für eine sinnvolle Therapieentscheidung essentiell. Bei 20-30 % der Brustkrebspatientinnen liegt eine Amplifikation des HER2-Rezeptors vor, welche durch eine aggressivere Tumorbiologie, höhere Rezidivrate und ein kürzeres Gesamtüberleben gekennzeichnet ist. In der Klinik wird der HER2-Status bislang anhand von Gewebeproben aus Biopsien bestimmt. Da die Entnahme der Probe für die Patientinnen ein invasives, zeitintensives Verfahren darstellt, wird mittlerweile der Fokus vermehrt auf blutbasierte Biomarker wie z. B. CTCs und ctDNA im Rahmen einer Liquid Biopsy gelegt. Weiterhin kann sich der HER2-Status im Laufe der Jahre verändern und mittels Blutanalysen kann diese Tumorevolution in individuellen Patientinnen verfolgt werden.

In diesem Zusammenhang analysierten wir das Blut von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs auf CTCs mittels zweier Anreicherungsmethoden, dem CellSearch-System (Menarini Silicon Biosystems) und der Parsortix-Technologie (ANGLE), und versuchten, die Proben hinsichtlich ihres HER2-Status zu charakterisieren.

36,25 % der 80 Proben, die mithilfe des CellSearch-Systems bearbeitet worden waren, zeigten CTCs. Bei 4 der 19 Proben, die von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2positivem Status stammten, konnte der prognostisch relevante Wert \geq 5 CTCs/7,5 ml Blut ermittelt werden; bei einer dieser 4 Proben isolierten wir Einzelzellen für die weitere molekulare Untersuchung.

Im Gegensatz zum CellSearch-System existiert für das Marker-unabhängige Parsortix-System bislang keine gute Methode für die Identifizierung HER2-positiver CTCs, weswegen wir ein geeignetes Färbeprotokoll etablierten, indem wir sechs verschiedene anti-HER2-Antikörper austesteten und Färbesubstanzen sowie Permeabilisierungen und Blockierungen anpassten. Mithilfe des Parsortix-Systems konnten wir bei 9,76 % der 82 Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom CTCs detektieren. 2 der 8 CTC-positiven Proben stammten von Patientinnen mit histologisch gesichertem HER2-positiven Primärtumor. Da die Anzahl an vorliegenden Tumorzellen sehr gering war, verzichteten wir auf die Isolierung von Einzelzellen.

Bei den 27 Proben, die mittels beider Anreicherungsmethoden bearbeitet worden waren, zeigte sich, dass das CellSearch- dem Parsortix-System in der Detektion der zirkulierenden Tumorzellen überlegen ist, da sechs Blutproben nur mithilfe dieser Technologie als CTC- positiv erkannt wurden. Auch die Anzahl an erfassten Tumorzellen schien mittels des Cell-Search-Systems höher zu sein.

Um eine automatisierte Auswertung der Parsortix-Zytospins zu ermöglichen, testeten wir das Scanmikroskop Xcyto 10 (Chemometec), indem wir 27 Objektträger, welche im Vorfeld mithilfe des Parsortix-Systems angereichert und anhand unseres Protokolls angefärbt worden waren, einscannten und die Ergebnisse der automatisierten Auswertung mit denen der manuellen Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop verglichen. Mithilfe der von uns etablierten Gatings konnten Tumorzellen anhand verschiedener Parameter detektiert und Aussagen über die HER2-Intensität gemacht werden. Das Xcyto überzeugte sowohl in der Detektion als auch in der Darstellung der Tumorzellen in 4- und 20-facher Vergrößerung, weswegen unsere Ergebnisse in eine Publikation aufgenommen wurden (Koch et al. 2020).

Bei jeder Probe von Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs wurde zusätzlich Plasma isoliert, mit dem Ziel, zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) zu gewinnen und diese in Zukunft anhand von Gen-Paneln bzw. Digital Droplet PCR im Hinblick auf bestimmte Mutationen zu untersuchen, die mit Resistenzmechanismen gegenüber HER2-gerichteter Antikörpertherapie in Zusammenhang gebracht werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass mithilfe unserer Ergebnisse die Grundlagen für weitere molekulare und funktionelle Analysen geschaffen wurden, um zukünftig neue Erkenntnisse über die Entstehung von Resistenzen gegenüber HER2-gerichteter Antikörpertherapie zu erlangen.

6 Anhang

Tabelle A.1: Klassifikation der Tumorstadien

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	MO
Ι	T1 (1-20 mm)	N0	MO
IIA	T0, T1	N1 (1-3 LK in der Axilla und/oder ipsi- lateralen Mammaria- Interna-Region)	M0
	T2 (21-50 mm)	N0	MO
IIB	Т2	N1	MO
	T3 (≥ 51 mm)	N0	MO
IIIA	T0, T1, T2	N2 (4-9 LK in der Axilla)	MO
	Т3	N1	MO
IIIB	T4 (Infiltration der Brustwand und/oder Haut und/oder ipsi- laterale Satellitenme- tastasen und/oder inflammatorisches Mammakarzinom)	N0-2	MO
IIIC	alle T	N3 (≥ 10 LK in der Axilla und/oder Befall infra- oder supraclavi- kulärer LK)	MO
IV	alle T	alle N	M1 (Fernmetastasen)

Basierend auf DGHO 2018



Abbildung A.2: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 3 in Kombination mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen, CS=CellSearch, P=Parsortix



Abbildung A.3: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 4 in Kombination mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen, CS=CellSearch, P=Parsortix



Abbildung A.4: Krankheits- und Therapieverlauf von Patientin 5 in Kombination mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CTC-Zahlen, CS=CellSearch, P=Parsortix



Abbildung A.5: Bildergalerie der Xcyto-View Software

7 Literaturverzeichnis

- Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K (2012): Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Annu Rev Med <u>63</u>, 199–215
- Alix-Panabières C, Pantel K (2014): Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. Lab Chip <u>14</u>, 57–62
- Alix-Panabières C, Pantel K (2016): Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. Cancer Discov <u>6</u>, 479-491
- Alix-Panabières C, Pantel K (2021): Liquid biopsy: From Discovery to Clinical Application. Cancer Discov <u>11</u>, 858-873
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A et al. (2003): Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet <u>72</u>, 1117–1130
- Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L (2011): Treatment of HER2positive breast cancer: current status and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol <u>9</u>, 16–32
- Banys-Paluchowski M, Witzel I, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer EF, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Pantel K et al. (2017): Clinical Relevance of Serum HER2 and Circulating Tumor Cell Detection in Metastatic Breast Cancer Patients. Anticancer Res <u>37</u>, 3117–3128
- Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A et al. (2012): Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med <u>366</u>, 109–119
- Beviglia L, Matsumoto K, Lin CS, Ziober BL, Kramer RH (1997): Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast carcinoma: correlation with tumor progression. Int J Cancer <u>74</u>, 301–309
- Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, Cremoux P de, Marty M, Pierga JY (2010): Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. Ann Oncol <u>21</u>, 729– 733
- Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S, Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J et al. (2014): Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. Lancet Oncol <u>15</u>, 406–414
- Bilimoria MM, Morrow M (1995): The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. CA Cancer J Clin <u>45</u>, 263–278
- Blackwell K, Gligorov J, Jacobs I, Twelves C (2018): The Global Need for a Trastuzumab Biosimilar for Patients With HER2-Positive Breast Cancer. Clin Breast Cancer <u>2</u>, 95-113
- Bloom HJG, Richardson WW (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer <u>11</u>, 359–377
- Bono JS de, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LWWM, Pienta KJ, Raghavan D (2008): Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res <u>14</u>, 6302–6309
- Braun S, Vogl F, Naume B, Janni W, Osborne M, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G et al. (2005): A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. N Eng J Med. <u>353</u>, 793-802
- Buchberger W, DeKoekkoek-Doll P, Springer P, Obrist P, Dünser M (1999): Incidental findings on sonography of the breast: clinical significance and diagnostic workup. AJR Am J Roentgenol <u>173</u>, 921–927
- Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen, LWMM (2006): Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res <u>21</u>, 6403-6409
- Cardoso F, Senkus E, Costa A, Papadopoulos E, Aapro M, André F, Harbeck N, Aguilar Lopez B, Barrios CH, Bergh J et al. (2018): 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)[†]. Ann Oncol <u>29</u>, 1634–1657

- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer <u>2</u>, 563–572
- Chandarlapaty S, Sakr RA, Giri D, Patil S, Heguy A, Morrow M, Modi S, Norton L, Rosen N, Hudis C et al. (2012): Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer. Clin Cancer Res <u>18</u>, 6784–6791
- Chudziak J, Burt DJ, Mohan S, Rothwell DG, Mesquita B, Antonello J, Dalby S, Ayub M, Priest L, Carter L et al. (2016): Clinical evaluation of a novel microfluidic device for epitope-independent enrichment of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. Analyst <u>141</u>, 669–678
- Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC et al. (2009): Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol <u>20</u>, 1223–1229
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002): Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. Lancet <u>360</u>, 187–195
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U (1985): Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science <u>230</u>, 1132–1139
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM et al. (2004): Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med <u>351</u>, 781–791
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC et al. (2005): Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol <u>23</u>, 1420–1430
- Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, Dennis PA, Lipkowitz S (2001): Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. Cancer Res <u>61</u>, 4892–4900
- De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, Tortora G, D'Agostino D, Caputo F, Cancello G et al. (2005): A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. Clin Cancer Res <u>11</u>, 4741–4748
- De Melo Gagliato D, Jardim DLF, Marchesi MSP, Hortobagyi GN (2016): Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. Oncotarget <u>7</u>, 64431–64446
- DGHO (2018): Mammakarzinom der Frau. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html; abgerufen am 04.03.2020
- DKG (2020): Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. S3-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLl_S3_Mammakarzinom_2020-02.pdf; abgerufen am 04.03.2020
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2011): Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. The Lancet <u>378</u>, 771–784
- Elston CW, Ellis IO (1991): 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 <u>19</u>, 403-410
- Fehm T, Müller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, Lattrich C, Löhberg CR, Solomayer, E, Rack B et al. (2010): HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. Breast Cancer Res Treat <u>124</u>, 403-412
- Fehm T, Müller V (2018): Systemtherapie des frühen und metastasierten Mammakarzinoms. Dtsch Med Wochenschr <u>143</u>, 1751–1754
- Follain G, Osmani N, Azevedo AS, Allio G, Mercier L, Karreman MA, Solecki G, Garcia L, Maria J, Lefebvre O et al. (2018): Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. Dev Cell <u>45</u> (1), 33-52
- Franken A, Driemel C, Behrens B, Meier-Stiegen F, Endris V, Stenzinger A, Niederacher D, Fischer JC, Stoecklein NH, Ruckhaeberle E et al. (2019): Label-Free Enrichment and Molecular Characterization of Viable Circulating Tumor Cells from Diagnostic Leukapheresis Products. Clin Chem <u>65</u>, 549–558
- Friedl P, Alexander S (2011): Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. Cell <u>147</u>, 992–1009

- Gkountela S, Castro-Giner F, Szczerba BM, Vetter M, Landin J, Scherrer R, Krol I, Scheidmann MC, Beisel C, Stirnimann CU et al. (2019): Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. Cell <u>176</u>, 98-112
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates, AS, Gelber, RD, Thürlimann B, Senn HJ (2011): Strategies for subtypesdealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol <u>8</u>, 1736-1747
- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, Ahsen O von (2012): Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC Cancer <u>12</u>, 178
- Gorges K, Wiltfang L, Gorges TM, Sartori A, Hildebrandt L, Keller L, Volkmer B, Peine S, Babayan A, Moll I et al. (2019): Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. Cancers <u>11</u>, 1-13
- Gøtzsche PC, Jørgensen KJ (2013): Screening for breast cancer with mammography. Cochrane Database Syst Rev <u>6</u>, Art. No.: CD001877
- Giuliano M, Giordano A, Jackson S, Hess KR, Giorgi U de, Mego M, Handy BC, Ueno NT, Alvarez RH, Laurentiis M de et al. (2011): Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. Breast Cancer Res <u>13</u>, R67
- Hagenbeck C, Melcher CA, Janni JW, Schneeweiss A, Fasching PA, Aktas B, Pantel K, Solomayer EF, Ortmann U, Jaeger BAS et al. (2012): DETECT III: A multicenter, randomized, phase III study to compare standard therapy alone versus standard therapy plus lapatinib in patients (pts) with initially HER2negative metastatic breast cancer but with HER2-positive circulating tumor cells (CTC). JCO <u>30</u>, 1146
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990): Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. Science <u>250</u>, 1684–1689
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-674
- Hartkopf AD, Wagner P, Wallwiener D, Fehm T, Rothmund R (2011): Changing levels of circulating tumor cells in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. Anticancer Res <u>3</u>, 979–984
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LWWM (2006): Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. Clin Cancer Res <u>12</u>, 4218–4224
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC et al. (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem <u>83</u>, 8604–8610
- Hofvind S, Ponti A, Patnick J, Ascunce N, Njor S, Broeders M, Giordano L, Frigerio A, Törnberg S, van Hal G et al. (2012): False-positive results in mammographic screening for breast cancer in Europe: a literature review and survey of service screening programmes. J Med Screen <u>19</u> Suppl 1, 57–66
- Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, Janning M, Quidde J, Stein A, Müller V, Loges S, Neves RPL, Stoecklein NH et al. (2016): A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. Int J Cancer <u>138</u>, 2894–2904
- Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearline RV, Cantley LC, Brugge JS (2005): Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. Cancer Res <u>65</u>, 10992– 11000
- Janning M, Kobus F, Babayan A, Wikman H, Velthaus JL, Bergmann S, Schatz S, Falk M, Berger LA, Böttcher LM et al. (2019): Determination of PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of NSCLC Patients and Correlation with Response to PD-1/PD-L1 Inhibitors. Cancers <u>11</u>, 835 1-16
- Joosse SA, Hannemann J, Spötter J, Bauche A, Andreas A, Müller V, Pantel K (2012): Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. Clin Cancer Res <u>18</u>, 993–1003
- Joosse SA, Gorges TM, Pantel K (2015): Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO Mol Med 7, 1–11
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, Sampath D, Sliwkowski MX (2009): Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. Cancer Cell <u>15</u>, 429–440
- Koch C, Joosse SA, Schneegans S, Wilken OJW, Janning M, Loreth D, Müller V, Prieske K, Banys-Paluchowski M, Horst LJ et al. (2020): Pre-Analytical and Analytical Variables of Label-Independent Enrichment and Automated Detection of Circulating Tumor Cells in Cancer Patients. Cancers <u>12</u>, 44

- Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, Straif K (2015): Breast-Cancer Screening--Viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med <u>372</u>, 2353-2358
- Liu L, Shi H, Liu Y, Anderson A, Peterson J, Greger J, Martin AM, Gilmer T (2011): Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells. Mol Cancer Ther <u>10</u>, 518–530
- Luque-Cabal M, García-Teijido P, Fernández-Pérez Y, Sánchez-Lorenzo L, Palacio-Vázquez I (2016): Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. Clin Med Insights Oncol <u>10</u>, 21-30
- Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M (2001): Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). J Natl Cancer Inst <u>93</u>, 1852–1857
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG et al. (2004): Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. NEJM <u>21</u>, 2129–2139
- Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V (2010): Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biol Ther <u>10</u>, 955–960
- Marrugo-Ramírez J, Mir M, Samitier J (2018): Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. IJMS <u>10</u>, 1-21
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM (2000): Breast cancer epidemiology, risc factors, and genetics. BMJ 7261, 624-628
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W et al. (1994): A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. Science <u>266</u>, 66–71
- Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM (2010): Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. J Oncol <u>2010</u>, 617421
- Miller MC, Robinson PS, Wagner C, O'Shannessy DJ (2018): The Parsortix[™] Cell Separation System-A versatile liquid biopsy platform. Cytometry A <u>93</u>, 1234–1239
- Mitchell MJ, King MR (2013): Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress. Front Oncol <u>3</u>, 44
- Moasser MM (2007): The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene <u>26</u>, 6469–6487
- Mohme M, Riethdorf S, Pantel K (2017): Circulating and disseminated tumour cells mechanisms of immune surveillance and escape. Nat Rev Clin Oncol <u>14</u> (3), 155-167
- Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø (2018): Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. N Engl J Med <u>378</u>, 1265–1266
- Müller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer E, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Fehm T (2012): Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System[™] and AdnaTest Breast[™] in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. Breast Cancer Res <u>14</u>, R118
- Munzone E, Nolé F, Goldhirsch A, Botteri E, Esposito A, Zorzino L, Curigliano G, Minchella I, Adamoli L, Cassatella MC et al. (2010): Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. Clin Breast Cancer <u>10</u>, 392-397
- Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT et al. (2004): PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell <u>6</u>, 117–127
- Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Tokuda Y, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT (2012): Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. J Clin Oncol <u>30</u>, 593–599
- Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N et al. (2008): Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. Ann Oncol <u>19</u>, 891–897
- Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S (2009): Cancer micrometastases. Nat Rev Clin Oncol 6, 339-351
- Pantel K, Alix-Panabières C (2019): Liquid biopsy and minimal residual disease latest advances and implications for cure. Nat Rev Clin Oncol <u>7</u>, 409-424

- Pantel K, Hille C, Scher HI (2019): Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. Clin Chem <u>65</u>, 87-99
- Peeters DJE, Laere B de, van den Eynden GG, van Laere SJ, Rothé F, Ignatiadis M, Sieuwerts AM, Lambrechts D, Rutten A, van Dam PA et al. (2013): Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. Br J Cancer <u>108</u>, 1358–1367
- Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, Martino S, Rastogi P, Gralow J, Swain SM et al. (2014): Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. J Clin Oncol <u>32</u>, 3744–3752
- Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, Cappadona S, Biganzoli L, Giannini A, Di Leo A (2009): Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat <u>118</u>, 523–530
- Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, Cremoux P de, Salmon R, Vincent-Salomon A, Marty M (2008): Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. Clin Cancer Res <u>14</u>, 7004–7010
- Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Diéras V, Rolland E, Mignot L, Mathiot C et al. (2012): High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. Ann Oncol <u>23</u>, 618–624
- Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F et al. (2007): Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. Clin Cancer Res <u>3</u>, 920–928
- Riethdorf S, Müller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I et al. (2010): Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. Clin Cancer Res <u>16</u>, 2634–2645
- Riethdorf S, Müller V, Loibl S, Nekljudova V, Weber K, Huober J, Fehm T, Schrader I, Hilfrich J, Holms F et al. (2017): Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells for Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant "Geparquattro" Trial. Clin Cancer Res <u>23</u>, 5384–5393
- Riethdorf S, O'Flaherty L, Hille C, Pantel K (2018): Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. Adv Drug Deliv Rev <u>125</u>, 102–121
- Robert Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID). (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Auflage, Berlin 2019
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA <u>288</u>, 321–333
- Roux PP, Topisirovic I (2018): Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. Cell Mol Biol <u>12</u>, 1-26
- Saitoh M (2018): Involvement of partial EMT in cancer progression. J Biochem 4, 257-264
- Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, Di Cosimo S, Matias-Guiu X, Ramon y Cajal S, Arribas J et al. (2007): Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. J Natl Cancer Inst <u>99</u>, 628–638
- Schnitt SJ, Lakhani SR, Ellis IO (Hrsg.): WHO Classification of Tumours of the Breast. 4. Auflage; World Health Organization, Lyon 2012
- Seidman H, Mushinski MH, Gelb SK, Silverberg E (1985): Probabilities of eventually developing or dying of cancer-united states. CA Cancer J Clin <u>35</u>, 36-56
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235, 177–182
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M et al. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med <u>344</u>, 783–792
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M et al. (2011): Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med <u>365</u>, 1273–1283

- Soysal SD, Muenst S, Barbie T, Fleming T, Gao F, Spizzo G, Oertli D, Viehl CT, Obermann EC, Gillanders WE (2013): EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2(+), basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. Br J Cancer <u>7</u>, 1480–1487
- Taveira MO, Nabavi S, Wang Y, Tonellato P, Esteva FJ, Cantley LC, Wulf GM (2017): Genomic characteristics of trastuzumab-resistant Her2-positive metastatic breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol <u>143</u>, 1255– 1262
- Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2, 442-454
- Uhr JW, Pantel K (2011): Controversies in clinical cancer dormancy. Proc Natl Acad Sci U S A <u>108</u>, 12396– 12400
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M et al. (2002): Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol <u>20</u>, 719–726
- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P et al. (2014): Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. Arch Pathol Lab Med <u>138</u>, 241–256
- Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B (2006): HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. Clin Cancer Res <u>12</u>, 1715–1720
- Xu L, Mao X, Imrali A, Syed F, Mutsvangwa K, Berney D, Cathcart P, Hines J, Shamash J, Lu Y-J (2015): Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System. PLoS ONE <u>10</u>, e0138032
- Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL (2002): Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. Cancer Res <u>62</u>, 4132–4141
- Yan WT, Cui X, Chen Q, Li YF, Cui YH, Wang Y, Jiang J (2017): Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. Sci Rep 7, 43464
- Zarbo RJ, Hammond MEH (2003): Conference Summary, Strategic Science Symposium. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. Arch Pathol Lab Med <u>127</u>, 549-555
- Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW, Xiong Y, Tseng LM, Li SH, Ding Z et al. (2011): Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. Nat Med <u>17</u>, 461–469

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Klaus Pantel, der mir die Durchführung der experimentellen Arbeit am Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg/Eppendorf ermöglicht hat.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Steven Johnsen für die Betreuung der vorliegenden Arbeit sowie die vielen wertvollen Anregungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Elisabeth Hessmann für die zuverlässige Unterstützung bei meiner Promotion.

Nicht zuletzt muss ich zudem Claudia Koch meinen Dank aussprechen, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, große Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen zeigte und auch außerhalb des Labors zu einer engen Vertrauten geworden ist.

Zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie für die angenehme Arbeitsatmossphäre und die Unterstützung während meiner Promotion. Ein besonderer Dank gilt Antje Andreas für die sorgfältige Einarbeitung in die mikrobiologische Methodik.