

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Detektion und Charakterisierung tumorassoziierter Zellen und Zellcluster im Blut von
Brustkrebspatientinnen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Paula Maria Bergengruen

geboren am 20.06.1993 in Hamburg

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

Gutachter*innen:

- Frau Prof. Isabell Witzel, Hamburg
- Frau Prof. Pauline Wimberger, Dresden

02.02.2021

19.07.2021

Referat

Zielsetzung: Die Liquid Biopsy – und mit ihr auch die Erforschung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) – nimmt einen zunehmend hohen Stellenwert in der onkologischen Forschung ein. Ziel dieser Arbeit ist zum einen die Testung einer neuen Methode zur Isolierung zirkulierender tumorstämmiger Zellen und Zellcluster aus dem Blut. Zum anderen soll eine Analyse der isolierten Zellcluster erfolgen. Bei der Etablierung des Protokolls soll dabei besonders auf Veränderungen im Zuge der Epithelial-Mesenchymalen Transition eingegangen werden.

Material und Methodik: Für diese Arbeit wurde zur Isolierung von CTCs aus dem Blut ein neuartiger Mikrofilter verwendet und passend dazu ein maßgeschneidertes Protokoll etabliert. Die fluorochromgefärbte Antikörpermixtur enthielt neben Antikörpern gegen epitheliale Oberflächenantigene (EpCam, Keratine und E-Cadherin) auch solche gegen mesenchymale Oberflächenantigene (Vimentin und N-Cadherin) sowie den Ausschlussantikörper gegen das leukozytäre CD45 und Dapi. Es wurde in dieser Arbeit das Blut von 35 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom untersucht, sowie eine Korrelation mit klinischen Daten und eine molekulargenetische Analyse angefertigt.

Ergebnisse: Eine orientierende Gütetestung des Mikrofilters fiel durchweg zufriedenstellend aus. Bei der Aufarbeitung der 35 Patientinnenproben waren bei 9 von 35 epitheliale CTCs detektierbar. Bei 15 von 35 Proben waren stark mesenchymalmarker-positive aber epithelialmarker-negative Zellen und Cluster auffindbar.

Ein Log-Rank-Test ergab keine signifikante Korrelation zwischen der Präsenz von CTCs oder der beschriebenen mesenchymalen Zellpopulation und dem Gesamtüberleben. Zur weiteren Abklärung des Ursprungs der besagten Zellpopulation wurde das Genom dieser Zellen sequenziert mit der Frage nach Copy Number Aberrations (CNAs). Mit dieser Untersuchung konnte ein tumoröser Ursprung der Zellen und Cluster bislang nicht bewiesen werden.

Schlussfolgerung: Der CellSieve-Mikrofilter ist eine effektive Methode zur Detektion von CTCs, da sowohl CTCs als auch andere Zellpopulationen durch die größenbasierte Mikrofiltration aus dem Blut isoliert werden können. Im Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom sind durch diesen Mikrofilter neben CTCs auch stark mesenchymalmarker-positive Cluster detektierbar, die sich durch eine starke Heterogenität der Größe auszeichnen. Die Frage nach dem Ursprung beziehungsweise der Aussagekraft der Präsenz dieser Cluster im Blut kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinlänglich beantwortet werden.

Bergengruen, Paula Maria: Detektion und Charakterisierung tumorassoziierter Zellen und Zellcluster im Blut von Brustkrebspatientinnen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 52 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	II
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung	2
1.1.3 Histologie und Grading	3
1.1.4 Immunhistochemie und molekulare Subtypen	4
1.1.5 Therapie	5
1.2 Metastasierung	6
1.3 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)	7
1.4 Epithelial-mesenchymale Transition	8
1.5 Detektion	10
1.6 Zirkulierende tumorstämmige Zellcluster	12
2 Zielstellung	14
3 Material und Methodik	15
3.1 Material	15
3.2 Methodik	17
3.2.1 Zellkultur	17
3.2.2 Färbung	17
3.2.3 Spiking-Experimente	18
3.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie und Bildakquisition	18
3.2.5 Blutentnahme	19
3.2.6 CellSieve™ Microfilter	19
3.2.7 CellSieve™ Filtration und Färbung	19
3.2.8 Zellenentnahme	21
3.2.9 Whole Genome Amplification und Sequenzierung (FastSeqS)	21
4 Ergebnisse	22
4.1 Etablierung der Färbung	22
4.2 Ergebnisse der Spikingexperimente	23

4.2.1 Spikingexperimente mit dem Cellsieve™ Microfilter	23
4.2.2 Spikingexperimente mit dem Isopore™ Filter (10µm Poren).....	24
4.3 Ergebnisse mit Patientinnenproben	24
4.3.1 Ergebnisse der Aufarbeitung der Patientinnenproben	24
4.3.2 Ergebnisse der Mikroskopie.....	26
4.3.3 Vergleiche von Cellsieve™ Mikrofilter mit dem CellSearch-System.....	29
4.4 Ergebnisse der molekulargenetischen Charakterisierung	30
4.5 Ergebnisse der klinischen Korrelation.....	32
5 Diskussion	34
5.1 Methodische Aspekte	35
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	37
5.3 Ursprung der Zellcluster	40
5.4 Ausblick.....	42
6 Zusammenfassung	44
7 Literaturverzeichnis	45
8 Thesen	52

Verzeichnis der Abkürzungen

BET	Brusterhaltende Therapie
CAF	Cancer-associated Fibroblasts, tumorassoziierte Fibroblasten
CAML	Cancer-Associated Macrophage-Like Cell
CNA	Copy Number Aberrations
CRC	Colorektales Karzinom
CSC	Cancer Stem Cell; Tumorstammzelle
CTC	Circulating Tumor Cells, zirkulierende Tumorzellen
ctDNA	zellfreie Tumor-DNA
DCIS	duktales Carzinoma in Situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EMT-TFs	Epithelial-mesenchymale Transition Transkriptionsfaktoren
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FDA	Food and Drug Administration der USA
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MRD	Minimal Residual Disease, minimale Resterkrankung
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
NST	No Special Type, invasives Karzinom vom nicht-spezialen Typ
OT	Objektträger
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
SFPB	Serum-Free Protein Block
TBS	Tris-Buffered Saline (Puffer)
tECs	Tumor Derived Endothelial Cells; Tumorendothelzellen
TFs	Transkriptionsfaktoren
WGA	Whole Genome Amplification; Genomamplifikation
WHO	World Health Organisation; Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit über 70.000 Neuerkrankungen (2013) in Deutschland pro Jahr die häufigste Krebserkrankung der Frau. Die Sterberate lag im selben Jahr bei ungefähr einem Viertel der Neuerkrankungen. Nur etwa 1 % der Neuerkrankungen treten bei Männern auf. Das relative 5-Jahres Überleben in Deutschland bei Frauen beträgt 88 % (2013), das relative 10-Jahres-Überleben 82 % (Barnes, 2016). Die Mortalität ist seit den 1990er Jahren in westlichen Ländern (zum Beispiel den USA) rückläufig (DeSantis et al., 2017). Im Gegensatz dazu ist die Morbidität in Deutschland durch den demographischen Wandel altersadaptiert steigend (Lenk et al., 2005; Weis und Domann, 2006).

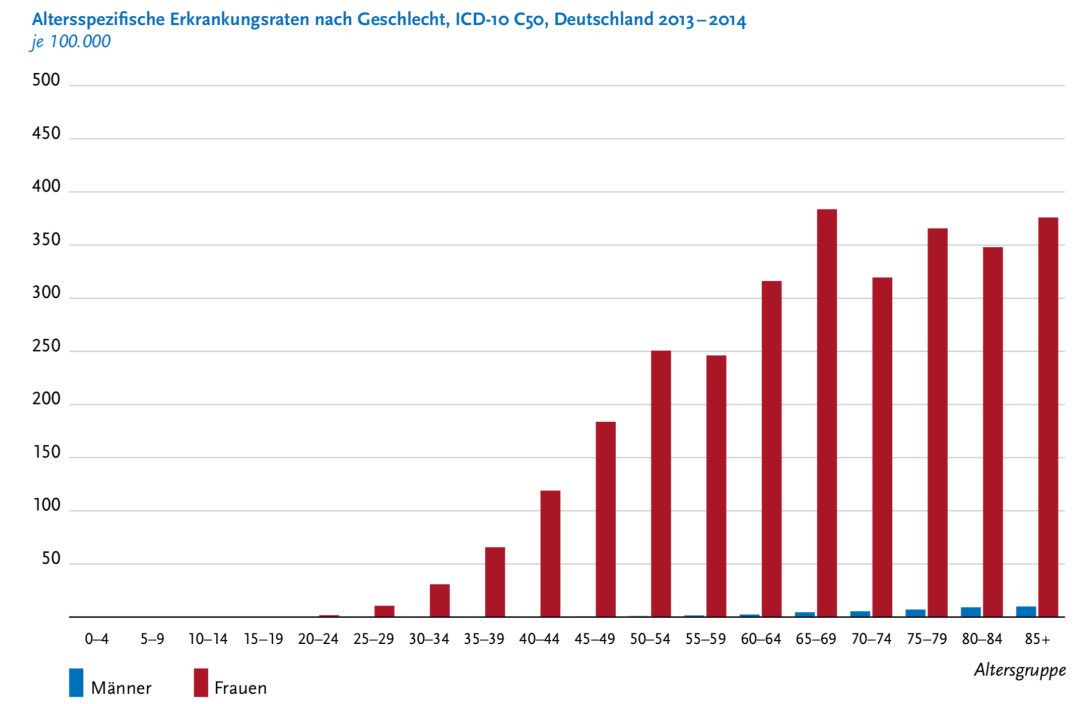


Abbildung 1: Brustkrebsinzidenz Deutschland nach Alter laut Robert-Koch-Institut

In Deutschland haben seit 2005-2009 (je nach Region) alle Frauen zwischen 50 und 69 Jahren gesetzlichen Anspruch auf eine Röntgenuntersuchung der Brustdrüse im Abstand von zwei

Jahren als Brustkrebsfrüherkennung (Mammographie-Screening). Die vermehrte Früherkennung führt zu einer zunehmenden Inzidenz des Mammakarzinoms in früheren Tumorstadien, der Einfluss auf die Mortalität ist allerdings erst für die kommenden Jahre zu erwarten (Barnes, 2016).

Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms sind eine frühe Menarche und eine späte Menopause, lebensstilbezogene Faktoren wie Bewegungsarmut, Übergewicht und hoher Alkoholkonsum, sowie lange andauernde Hormonersatztherapien beschrieben. Protektiv wirken frühe, sowie mehrfache Schwangerschaften und Stillzeiten (Singletary, 2003).

Die meisten Mammakarzinome treten sporadisch auf. Nur ca. 5-10 % liegen genetische Ursachen zugrunde (Mavaddat et al., 2010; Stratton und Rahman, 2008).

1.1.2 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung

Die sogenannte TNM-Klassifikation basiert auf folgenden drei Hauptmerkmalen: der Tumorgröße (T), der Anzahl und Lokalisation der befallenen Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). In Tabelle 1 ist die daraus entstehende Codierung aufgeführt. Die sich daraus ergebende Einteilung in Klinische Stadien kann aus Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation

T1	Tumorgröße: <2cm T1a: ≤0,5cm T1b: >0,5cm und ≤1cm T1c: >1cm und ≤2cm
T2	Tumorgröße: >2cm und ≤5cm
T3	Tumorgröße: >5cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut oder Brustwand Inflammatorisches Mammakarzinom

N1	Axilläre Lymphknoten beweglich	pN1	pN1a: 1-3 axilläre Lymphknoten pN1b: Sentinel-Lymphknoten entlang A. mammaria interna (mikroskopisch erkennbar, klinisch nicht erkennbar) pN1c: pN1a + pN1b
N2	N2a: Axilläre Lymphknoten fixiert N2b: Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna in Abwesenheit axillärer Lymphknoten	pN2	pN2a: 4-9 axilläre Lymphknoten pN2b: Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (klinisch erkennbar) ohne axilläre Lymphknoten
N3	N3a: Infraklavikuläre Lymphknoten N3b: Axilläre Lymphknoten u. Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna N3c: Supraklavikuläre Lymphknoten	pN3	pN3a: ≥ 10 axilläre oder infraklavikuläre Lymphknoten pN3b: Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (klinisch erkennbar) + min. 1 axillärer Lymphknoten oder Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (aber klinisch nicht erkennbar) + mehr als 2 axilläre Lymphknoten pN3c: Supraklavikuläre Lymphknoten
M1	Fernmetastasen		

Tabelle 2: Stadieneinteilung Mammakarzinom nach der UICC

Stadium 0		Tis	N0	M0
Stadium I	A	T1	N0	M0
	B	T0, T1	N1mi	M0
Stadium II	A	T0, T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	B	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Stadium III	A	T0, T1, T2	N2	M0
		T3	N1, N2	M0
	B	T4	N0, N1, N2	M0
	C	Alle T	N3	M0
Stadium IV		Alle T	Alle N	M1

1.1.3 Histologie und Grading

Maligne Neubildungen der Brust können von den Drüsengängen (duktales Karzinom) oder von den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) ausgehen.

Nach der Klassifikation der WHO von 2012 werden die invasiven Tumoren der Mamma in zwei Kategorien unterteilt. Das invasive Karzinom ohne speziellen Typ (invasive carcinoma of no special Type, NST), welches ehemals als invasiv-duktales Karzinom bezeichnet wurde, macht dabei 75 % aller Mammakarzinome aus, das invasive Karzinom mit speziellem Typ, wozu auch das invasiv-lobuläre Karzinom gehört, 25 % (Sinn und Kreipe, 2013).

Bis zum Durchbrechen der Basalmembran spricht man von einem duktalem (DCIS) beziehungsweise einem lobulären Karzinom in situ (LCIS).

Wie bei vielen anderen Tumorentitäten ist außerdem die histologische Gradierung (G1-G3) von prognostischer Bedeutung. Diese erfolgt auf Grundlage des Systems von Bloom, Richards und Scarff, modifiziert nach Ellis.

1.1.4 Immunhistochemie und molekulare Subtypen

Eine weitere Unterteilung von Mammakarzinomen erfolgt anhand des Hormonrezeptorstatus (Progesteron- und Östrogenrezeptoren) und des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Typ 2 (Her2/neu; HER2).

Der Expressionsindex des nukleären Proteins Ki67, welches in proliferierenden Zellen exprimiert wird, wird immunhistochemisch bestimmt. Die Rate positiver Zellen ≤ 13 % wird in der Klassifikation des molekularen Subtyps (siehe unten) als niedrige Proliferation definiert. Allerdings ist das Ergebnis untersucherabhängig und es fehlt eine internationale Standardisierung zur Definition von hoher beziehungsweise niedriger Rate (Varga et al., 2012).

Durch Genexpressionsprofile können verschiedene molekulare Subtypen des Mammakarzinoms unterschieden werden. Zur Identifizierung dieser Subtypen werden immunhistochemische Surrogatparameter herangezogen (Coates et al., 2015). Eine Übersicht über die Subtypen wird in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3: *Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms*

Molekularer Subtyp	Untergruppe	Definition und Surrogatparameter
Luminal A		ER und PR positiv HER2 negativ Ki67 niedrig
Luminal B	Her2 negativ	ER positiv und ein weiteres Kriterium -PR negativ -Ki67 hoch
	Her2 positiv	ER positiv HER2 überexprimiert oder amplifiziert Ki67 niedrig oder hoch
Her2 enriched		HER2 überexprimiert oder amplifiziert ER und PR negativ
Basal like		ER und PR negativ HER2 negativ

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich nach verschiedenen Faktoren, allen voran nach der Positivität prädiktiver Marker wie ERalpha und HER2 sowie nach dem Stadium der Erkrankung. Die Therapie erfolgt in der Regel multimodal. Grundlage der Therapieplanung bildet die Entscheidung einer interdisziplinären Tumorkonferenz und die Einbindung der Patientin bei der Entscheidungsfindung. Als Orientierung der Behandlung dient die S3 Leitlinie. Die Therapieoptionen umfassen Operation, Bestrahlung und medikamentöse Tumorthherapie.

In den meisten Fällen ist die operative Entfernung des Tumors essenzieller Bestandteil der Behandlung. Diese Entfernung kann als brusterhaltende Therapie (BET) als Brustteilresektion oder als Mastektomie (auch Ablatio) erfolgen.

Medikamentöse Therapieoptionen umfassen zum einen verschiedene Chemotherapie-Schemata, die sowohl neoadjuvant als auch adjuvant verabreicht werden können. Zum anderen gehören antihormonelle Therapien, die bei positivem Hormonrezeptorstatus indiziert sind, und Antikörpertherapien, wie den gegen das Oberflächenprotein HER2 gerichteten Antikörper Trastuzumab, zu den medikamentösen Therapieoptionen. Aber auch weitere zielgerichtete Therapieoptionen finden besonders bei fortgeschrittenem Tumorstadium ihre Anwendung. Beispiele hierfür sind die Gabe von VEGF-Antikörpern und Zellzyklus-Inhibitoren.

Die Radiotherapie beim Mammakarzinom erfolgt stadienabhängig als adjuvante Bestrahlung der Brust und Brustwand. Diese kann als konventionelle oder hypofraktionierte Bestrahlung erfolgen. Auch eine Bestrahlung der Lymphabflusswege nach operativer Lymphonodektomie kann zur Verbesserung des krankheitsfreien und des Gesamtüberlebens durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Version 4.3, 2020).

1.2 Metastasierung

Unter dem Begriff Metastasierung (von altgriechisch μετάστας, „Wanderung“) ist die Absiedelung von Tumorzellen eines bösartigen Primärtumors in entferntem Gewebe zu verstehen, die dort sogenannte Metastasen (Tochtergeschwülste) bilden. Diese sogenannte Metastasierung kann auf hämatologischem Weg (über die Blutbahn) oder lymphatischen Weg (über das Lymphsystem) erfolgen. Die Bildung von Metastasen ist eine der Eigenschaften, die einen malignen von einem benignen Tumor unterscheiden. Somit ist nicht der primäre Tumor, sondern vielmehr die anschließende Metastasierung bei vielen Tumorentitäten, zum Beispiel beim Mammakarzinom, Hauptursache krankheitsbedingter Mortalität (Nguyen et al., 2009).

Seit über einem Jahrhundert postulieren Tumorbiologen, dass die Metastasierung eines Tumors aus einem Zusammenspiel von freien, sich im Blut befindlichen Tumorzellen und einem Zielgewebe resultiert (Gupta und Massague, 2006). Immer wieder wurden neue Modelle entwickelt, die den genauen Zusammenhang erklären sollen. Bereits 1889 verfasste Paget die „seed versus soil“-Hypothese. Nachdem er beobachtet hatte, dass Brustkrebs in spezifische Organsysteme metastasiert, stellte er die Hypothese auf, dass disseminierte Tumorzellen (=seeds) sich nur in Organsystemen ansiedeln, die eine geeignete Mikroumgebung für deren Vermehrung bieten (=soil) (Paget, 1889). Auch klinische Beobachtungen legen nahe, dass das Metastasierungsmuster verschiedener Tumorentitäten nicht alleine durch die Anatomie der Leitungsbahnen zu erklären ist (Fidler, 2003).

Beim Mammakarzinom, welches typischerweise in Lunge, Knochen, Gehirn und Leber metastasiert (Meng et al., 2004), liegt die Inzidenz an Neuerkrankungen mit bereits evidenten Fernmetastasen bei 3-7 % (Pagani et al., 2010).

Die genauen Mechanismen, die zur Bildung von Metastasen führen, sind ein Feld, auf dem intensive Forschung betrieben wurde und wird. Aber auch trotz zahlreicher Publikationen und Erkenntnisse bleiben weiterhin Fragen offen.

1.3 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

Eine entscheidende Rolle im Prozess der Metastasierung spielen nach derzeitigem Wissenstand im Blut zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells; CTCs) (N. Aceto et al., 2015).

CTCs sind Zellen eines Primärtumors, die in die Blutbahn eintreten und diese in abgelegenen Gewebe wieder verlassen. Dort bilden sie den Grundstein zur Metastasenentstehung. Ob die Intra- und die Extravasation, also der Ein- und Austritt in das Gefäßsystem, durch aktive Migration oder passiv erfolgt, bleibt nach heutigem Wissensstand sowohl im klinischen als auch im wissenschaftlichen Kontext eine offene Frage (Simon A. Joosse und Pantel, 2013). Über die Halbwertszeit der CTCs im Blut ist wenig bekannt. Bei Brustkrebs wurde sie auf zwischen einer und 2,4 Stunden geschätzt, und es wurde die Vermutung geäußert, dass die Anzahl an lebensfähigen Tumorzellen im Blut durch die fortlaufende Ausschüttung neuer Zellen konstant gehalten wird (Meng et al., 2004).

Sowohl bei Brustkrebs als auch bei anderen Tumorentitäten, wie dem Prostatakarzinom und dem Kolorektalen Karzinom, wurde eine prognostische und prädiktive Relevanz von CTCs im Blut beschrieben (Cohen et al., 2008; Massimo Cristofanilli et al., 2005; de Bono et al., 2008; Rack et al., 2014; L. Zhang et al., 2012). Dies gilt nicht nur für Patienten in höheren Stadien. Es häufen sich auch Publikationen, die darüber berichten, dass sich CTCs auch bei Krebspatienten finden lassen, deren Tumoren sich in früheren Stadien befinden und die keine klinischen oder radiologischen Hinweise auf Metastasen aufweisen (Pantel und Alix-Panabieres, 2012; L. Zhang et al., 2012).

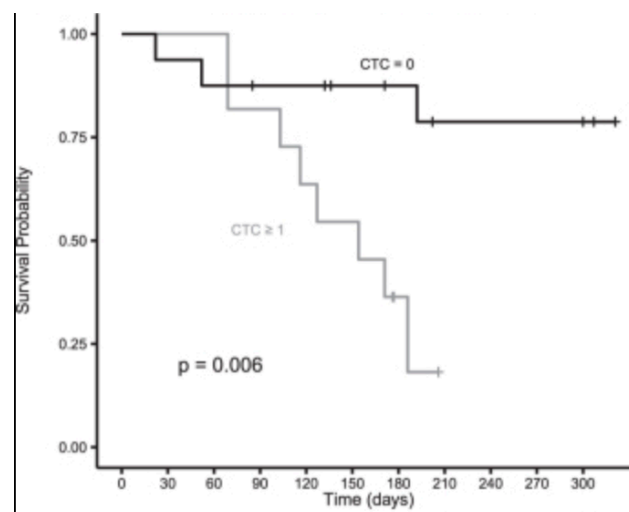


Abbildung 2: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben bei Präsenz von CTCs (de Wit et al., 2015)

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von CTCs im Blut von Brustkrebspatientinnen vor der neoadjuvanten Therapie eine prognostische Relevanz besitzt (Bidard et al., 2018; Riethdorf et al., 2017).

1.4 Epithelial-mesenchymale Transition

Eng im Zusammenhang mit Metastasenentstehung und Tumorprogression steht die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Unter diesem Begriff versteht man einen biologischen Prozess, der es den polaren epithelialen Zellen, die normalerweise mit einer Basalmembran interagieren, ermöglicht, in einen eher mesenchymalen Phänotyp überzugehen. Dies geschieht durch die Hochregulation mesenchymaler und die Herabregulation epithelialer Marker, was zum Verlust von Zell-Zell-Adhäsion und zur Veränderung des Zytoskeletts führt (Thiery et al., 2009). Epitheliale Marker sind zum Beispiel EpCam, E-Cadherin und Zytokeratine. Zu den mesenchymalen Markern gehören N-Cadherin und Vimentin. Der mesenchymale Phänotyp geht mit einem erhöhten Migrationspotential, einer gesteigerten Invasivität und einer vermehrten Apoptoseresistenz einher (Kalluri und Neilson, 2003).

Induziert wird die EMT durch die Expression von Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs wie Snail, Twist, Slug und andere) und von bestimmten miRNAs zusammen mit epigenetischen und posttranslatorischen Veränderungen (Nieto et al., 2016). Die genauen Auslöser dieser Prozesse bleiben nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung.

Eine bekannte Rolle spielt die EMT in sehr unterschiedlichen Prozessen, in denen Migration oder Plastizität von Zellen von Bedeutung ist. So werden drei Typen unterschieden. Die Typ 1 EMT, die auch die am besten erforschte darstellt, spielt an vielen Punkten in der embryonalen Entwicklung eine Rolle. So ist sie zum Beispiel bei der Entstehung des Mesoderms, der Implantation des Embryos und der Plazentaformation beteiligt (Vićovac und Aplin, 1996).

Die Typ 2 EMT wird in Abgrenzung dazu in den Zusammenhang mit Gewebsregeneration und Organfibrose gebracht. Diese EMT, die im Rahmen einer Regeneration erfolgt, ist meist Folge eines Traumas oder eines inflammatorischen Prozesses und generiert Fibroblasten. Bleibt der Trigger aber bestehen, kann es zu einer Fibrose und damit zur Zerstörung des Gewebes kommen (Kalluri und Neilson, 2003).

Im Gegensatz dazu findet die Typ 3 EMT bei den Zellen eines Primärtumors statt und macht es ihnen möglich zu disseminieren, indem Polarität und Zellkontakte aufgehoben werden (Suhail et al., 2019). Dabei ist die EMT als ein dynamisches Modell mit vielen Zwischenstufen zu sehen (Bednarz-Knoll et al., 2012; Nieto et al., 2016). Zirkulierende Tumorzellen mit vermehrt mesenchymalen Eigenschaften werden, besonders bei Brustkrebs, mit höheren Stadien, Metastasierungsneigung und Resistenzbildung gegenüber verschiedenen Therapieformen in Verbindung gebracht (Mego et al., 2012; Santamaria et al., 2019).

In der Peripherie findet der umgekehrte Prozess statt: die mesenchymal-epitheliale Transition (MET). Dieser Prozess ermöglicht den Zellen erst die Metastasenbildung (Shibue und Weinberg, 2017). So wurde gezeigt, dass Tumorzellen, die im mesenchymalen Zustand verweilen, nicht fähig sind, Metastasen zu bilden (Kang und Pantel, 2013).

Inwieweit es sich dabei aber um sich bedingende oder parallel auftretende, jedoch unabhängige Eigenschaften der Tumorzellen handelt, bleibt umstritten (Alix-Panabières et al., 2017; Ledford, 2011).

Außerdem ist ein Zusammenhang zwischen epithelial-mesenchymaler Plastizität und Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells; CSCs) bekannt (Mani et al., 2008). Diese besitzen Stammzeleigenschaften und damit die Möglichkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung. Die EMT und damit die Verschiebung zu mesenchymaleren Phänotypen geht mit vermehrten Stammzeleigenschaften der Tumorzellen einher, während der umgekehrte Prozess, die MET, die Rückführung in einen proliferativen Zustand der Zellen erlaubt und zu Rückfällen und Metastasenwachstum führt (Brooks et al., 2015).

1.5 Detektion

Aufgrund der sehr niedrigen Konzentration von CTCs im Blut, die bei den meisten betroffenen Patientinnen zwischen 1 und 10 CTCs pro Milliliter Blut beträgt (Alix-Panabières und Pantel, 2014), besteht ein Bedarf an effizienten Anreicherungsmethoden und äußerst sensitiven Detektionsverfahren, die die Isolation der CTCs ermöglichen. Eine Vielzahl an geeigneten Methoden existiert bereits und es werden laufend neue Verfahren entwickelt (S. A. Joosse et al., 2015).

Bei den meisten bisher etablierten Verfahren zur Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen macht man sich entweder deren biologische oder deren physikalische Eigenschaften zunutze.

Verfahren, die auf den biologischen Eigenschaften der CTCs aufbauen, sind antikörperbasiert. Diesen Verfahren liegt der Gedanke zugrunde, dass zirkulierende Tumorzellen im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen, spezielle Oberflächenproteine exprimieren, gegen die gezielt Antikörper gerichtet werden können. Für die meisten Karzinome bedeutet der epitheliale Ursprung des Tumors, dass sie im Gegensatz zu den eher mesenchymalen Blutzellen, epitheliale Marker exprimieren (Pantel und Alix-Panabieres, 2013). Daher sind epitheliale Marker die am häufigsten verwendete Zielstruktur dieser Verfahren, allen voran das Epithelial Cell Adhesion Molecule EpCAM. Ein Ferrofluid-gekoppelter EpCAM-Antikörper wird auch von dem einzigen CTC-Detektionsverfahren, das von der FDA (der Food and Drug Administration der USA) für die Klinik zugelassen worden ist, dem CellSearch™ System verwendet (Pantel und Alix-Panabieres, 2007, 2010). Cellsearch™ kann als Goldstandard der CTC Detektion bezeichnet werden.

Weitere Beispiele für biologische Verfahren sind Technologien, die mit magnetisch-gelabelten Antikörpern arbeiten und das erste in-vivo Verfahren, der CellCollector®, ein mit EpCAM-Antikörpern beschichteter Draht, der es ermöglicht, durch eine Kanüle eingeführt, die Tumorzellen direkt aus dem Blutstrom zu isolieren (Theil et al., 2016).

Kritisch im Bezug auf diese epithelialen markerbasierten Verfahren ist zu bemerken, dass die Abwesenheit von epithelialen Markern, zum Beispiel im Zuge der epithelial-mesenchymalen Transition (siehe 1.5) zu falsch negativen Ergebnissen führen kann (Rao et al., 2005). So besteht ein Bedarf an weiteren Markern zur Identifikation zirkulierender Tumorzellen (Alix-Panabières und Pantel, 2014).

Auf der anderen Seite stehen die Verfahren, die sich die physikalischen Eigenschaften der Tumorzellen zunutze machen. Zu diesen Eigenschaften gehören zum Beispiel die sich von

hämatopoetischen Zellen unterscheidende Größe, Dichte, sowie die elektrischen Eigenschaften. Methoden aus dieser Kategorie sind unter anderem Dichtegradient-basierte Verfahren, größenbasierte Chips und viele weitere (H. W. Hou et al., 2013; Sollier et al., 2014). Die Tatsache, dass CTCs im Durchschnitt als größer und weniger verformbar als Blutzellen beschrieben wurden, macht sich auch die größenbasierte Mikrofiltration zunutze (Hvichia et al., 2016; H. K. Lin et al., 2010). Bisher wurde die Isolierung von CTCs in vielen Studien durch Mikrofiltration mit Hilfe von Track-Etch-Mikrofiltern erzielt. Dabei handelt es sich um Membranen, die zufällig verteilte Poren eines bestimmten Durchmessers aufweisen. Dabei konnten in einigen Studien sogar bessere Detektionsraten verglichen mit dem Cellsearch System erzielt werden (Huebner et al., 2018).

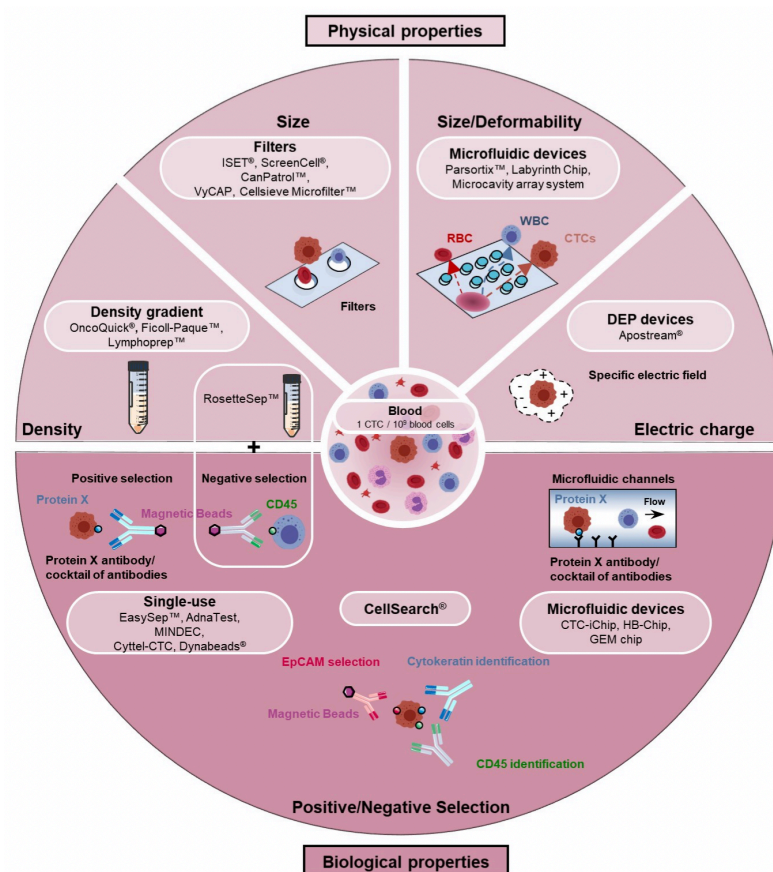


Abbildung 3: Detektionsmethoden zirkulierender Tumorzellen (Genna et al., 2020)

1.6 Zirkulierende tumorstämmige Zellcluster

Während zirkulierende Tumorzellen seit den 1990er Jahren im Fokus intensiver Forschung stehen und ihre Rolle im Prozess der Metastasenentstehung und als Biomarker allgemein anerkannt ist, ist weitaus weniger über zirkulierende Tumorzellcluster bekannt. Erst in den letzten Jahren sind auch sie erneut Gegenstand großen wissenschaftlichen Interesses geworden (Yupeng Hong et al., 2016). Zirkulierende Tumorzellcluster (auch CTC-Cluster, Tumor-Mikroemboli) sind definiert als ein Verband von zwei oder mehr zusammenhängenden Tumorzellen, die gemeinsam im Blutstrom zirkulieren (J.-M. Hou et al., 2012). In klinischen Experimenten wurde bisher gezeigt, dass solche Cluster bis zu 100 Tumorzellen beinhalten können (Yu et al., 2013).

Interessanterweise ist der Beginn der CTC-Cluster-Forschung bis in die 1950er Jahre zurückzudatieren. Damals konnte von Watanabe gezeigt werden, dass in Mäuse injizierte, bronchiogene Tumorzellcluster im Gegensatz zu einzelnen Zellen zur Metastasenbildung fähig waren (Watanabe, 1954). In den 1970er Jahren unterstützten dann eine Reihe präklinischer Experimente diese These (Fidler, 1973; Liotta et al., 1974; Liotta et al., 1976; Thompson, 1974). Danach stagnierte allerdings die Clusterforschung, was auf den für lange Zeit bestehenden Mangel an Detektionsmethoden zurückzuführen ist, die auf Cluster und nicht auf einzelne CTCs zugeschnitten waren (Y. Hong, F. Fang, et al., 2016).

Die meisten gängigen Detektionsverfahren sind auf einzelne CTCs zugeschnitten. So sind zum Beispiel Antikörper-basierte Verfahren (s.o.) weniger für die Cluster-Isolation geeignet, da sie aufgrund des ungünstigeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses und der eventuell abweichenden Proteinexpression der Cluster weniger effizient sind (Yupeng Hong et al., 2016). Außerdem besteht bei Verfahren, die eine turbulente Strömung verwenden (z.B. einige Chipverfahren) die Gefahr, dass sowohl die Anzahl als auch die Größe existierender Cluster beeinträchtigt werden (Sarioglu et al., 2015). Die meisten bisher detektierten Cluster sind daher als zufälliger Nebenbefund der CTC-Detektion aufgetreten. Es wird vermutet, dass ihre Konzentration im Blut stark unterschätzt wird (Y. Hong, F. Fang, et al., 2016).

Über CTC-Cluster ist bekannt, dass sie seltener als einzelne CTCs im Blut vorkommen, aber mit erhöhter Malignität in Verbindung gebracht werden. Beim Mammakarzinom konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass CTC-Cluster ein 23- bis 50-fach erhöhtes metastatisches Potential verglichen mit einzelnen CTCs besitzen (Nicola Aceto et al., 2014).

Des Weiteren konnte eine Assoziation zwischen vermehrter Expression von mesenchymalen Markern und CTC-Clustern im Vergleich zu einzelnen migratorischen Zellen gezeigt werden.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die epithelial-mesenchymale Transition auch im Bezug auf CTC-Cluster eine Rolle spielt (Yu et al., 2013).

Wie genau zirkulierende Tumorzell-Cluster entstehen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Mindestens drei Szenarien sind dabei denkbar: Erstens das Verlassen des Tumors bereits als bestehendes Cluster in die Blutbahn, zweitens die Bildung eines Clusters in der Blutbahn durch die Proliferation einzelner CTCs im Blutstrom und drittens die Aggregation einzelner CTCs im Blutstrom zu Clustern (Y. Hong, Z. Li, et al., 2016). Anhand von Mausmodellen konnten das zweite und das dritte Szenario ausgeschlossen werden, indem Mäusen unterschiedlich markierte einzelne Zellen und Cluster injiziert wurden und die daraufhin entstehenden Metastasen, CTCs und Cluster auf ihre Markerexpression untersucht wurden (Nicola Aceto et al., 2014).

Proteine, die mit der Clusterentstehung in Zusammenhang gebracht werden können, werden derzeit zu identifizieren versucht. Bisher scheinen zumindest bei Brustkrebs Plakoglobin und Keratin 14 eine Rolle zu spielen. Beide Proteine sind mit Desmosomen und Hemidesmosomen assoziiert und ihre Inhibierung führt zu verminderter CTC-Clusterbildung und geringerer Metastasenanzahl (Nicola Aceto et al., 2014; Cheung et al., 2016). Es ist weiterhin denkbar, dass Cluster unterschiedlichen Ursprungs oder unterschiedlicher Zusammensetzung unterschiedliche biologische Eigenschaften besitzen (Yupeng Hong et al., 2016).

Was die Zusammensetzung von Clustern betrifft, wird davon ausgegangen, dass es sich entweder um Tumorzellen mit oder ohne zusätzliche Nicht-Tumorzellen handelt. Als Nicht-Tumorzellen konnten bisher unter anderem Fibroblasten (CAFs), Immunzellen und Thrombozyten identifiziert werden (Ao et al., 2015; Laubli et al., 2006).

2 Zielstellung

Die gängigen Anreicherungsverfahren zellulärer tumorstämmiger Blutbestandteile im Rahmen der ‚Liquid Biopsy‘ sind auf einzelne im Blut zirkulierende Tumorzellen (CTCs) nicht aber CTC-Cluster zugeschnitten. Daher soll eine neuartige größenbasierte Filtrationsmethode auf ihre Eignung sowohl zur Detektion von CTCs als auch von tumorstämmigen Zellclustern aus dem Blut getestet werden. Diese Testung erfolgt bei Brustkrebspatientinnen mit metastasierter Erkrankung.

Neben einer Testung des Filters ist Ziel dieser Arbeit, eine immunzytochemische Färbung der angereicherten Zellen durchzuführen, die sowohl gängige epitheliale als auch mesenchymale Oberflächenantigene sichtbar macht. Dadurch sollen auch Zellen und Cluster, die im Zuge der epithelial-mesenchymalen Transition ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, detektiert werden. Um diese Färbung zu ermöglichen, soll ein passendes Protokoll mit geeigneter Fluoreszenzfärbung entwickelt werden.

Je nach Ergebnis in den Versuchen mit klinischen Proben soll daraufhin eine weitere Analyse sowohl der klinischen Korrelation der detektierten Zellen/ Zellcluster erfolgen als auch eine weitere Charakterisierung, zum Beispiel molekulargenetischer Art.

3 Material und Methodik

3.1 Material

Fertigkits	Hersteller
Cell Sieve™ Enumeration Kit	Creatv Microtech
Ampli1™ WGA Kit	Menarini Silicon Biosystems
NucleoSpin™ Gel- und PCR-Reiniger	Macherey-Nagel

Reagenzien

DPBS 1X	Gibco
DMEM Medium	Pan Biotech
Pen Strep (10000u, 10000u)	Gibco
L-Glutamin (100x)	Gibco
0.25 % Trypsin-EDTA (1x)	Gibco
FBS 10270	Gibco
Serum-Free Protein Block	Dako
Antibody Diluent Reagent Solution	Life Technologies
Dako-Pen	Dako
Mounting Medium	Dako
PFA 0,5 2	Dako
Triton 100 X	Sigma-Aldrich
TBS	Dako
Formaldehyd 10 %	Merck

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zentrifuge Rotospin 32	Hettich Zentrifugen
Axioplan 2 Imaging	Zeiss
HXP120 (Lampe)	Zeiss
Axiocam MRm	Zeiss
Objective Plan Neofluor 40x 20x (Obj)	Zeiss

Axiovert 200	Zeiss
Transferman NK2	Eppendorf
LEJ 100 isolated	Hofstra
CellTram® Vario	Eppendorf
Axiostar plus (zählen)	Zeiss
Pipetus	Hirschmann
Spritzenpumpe	KD Scientific
Cellstar Tubes, 15 und 50ml	Greiner Bio-One
Serological Pipette 2.5, 5 and 10ml	Sarstedt
Super Frost/Plus Objektträger (75x25mm)	Karl Hecht Assistent
Deckgläser	Roth
Petri Dish 100x15mm	Falcon
60ml Syringe Luer Locker Tip	BD
Omnifix 30ml Syringe Luer Lock	Braun
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Laboratory
PCR Tubes Sapphire 8er Streifen	Greiner Bio-One
PCR Tubes Sapphire Deckelkette 8er	Greiner Bio-One
Isopore™ Membran	Merck
Nanodrop™ 1000	Peqlab
Falcon™ Zentrifugenröhrchen 50 ml	Fisher Scientific
Falcon™ Zentrifugenröhrchen 15 ml	Fisher Scientific

3.2 Methodik

3.2.1 Zellkultur

Sowohl für die anfänglichen Färbeversuche zur Etablierung eines Antikörpercocktails als auch für die Spiking-Experimente wurden Zellen verschiedener Zelllinien verwendet. Im Folgenden sind die Zellkulturarbeiten detailliert aufgeführt. Alle Schritte erfolgten in einer sterilen Werkbank.

Zum Ansetzen des Mediums wurden unter sterilen Bedingungen von einer 500 ml-Flasche DMEM 50 ml abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde die Mediumflasche mit 50 ml fetalem Kälberserum, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 5ml L-Glutamin aufgefüllt.

Nachdem 0.25 % Trypsin-EDTA und PBS im Wasserbad auf 37° erhitzt und alle Materialien desinfiziert wurden, die unter der Zellkulturbank lagen, wurden die Zellen aus dem Brutschrank geholt und das Medium abpipettiert. Mit 5 ml PBS wurden die Zellen gewaschen, bevor das PBS erneut abpipettiert wurde. Nun wurden 1-2 ml Trypsin-EDTA (je nach Größe der Kulturflasche) auf die Zellen gegeben. Nach kurzer Inkubationszeit und nachdem sich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst hatten, erfolgte die Inhibierung des Trypsins mittels 5-7 ml des Mediums mit fetalem Kälberserum. Nun wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1200 U/min bei Raumtemperatur 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Mediumüberstand abpipettiert und die Zellen mit 500 µl Medium resuspendiert. Nun wurden die Zellen auf die neuen Flaschen aufgeteilt, die gewünschte Menge Medium hinzugegeben und nach einer Kontrolle unter dem Mikroskop wurden die neuen Kulturflaschen in den Brutschrank gestellt.

3.2.2 Färbung

Das Anfärben zur Testung bestimmter Antikörper auf Objektträgern mit Zellen verschiedener Zelllinien ist im Folgenden aufgeführt:

Die Objektträger mit der gewünschten Zelllinie wurden mithilfe eines Dako-Pens vorbereitet und in TBS in einer Waschküvette gewaschen. Die gewaschenen Objektträger wurden mit 100µl 0,5%igem PFA für zehn Minuten fixiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschgang mit TBS. Daraufhin erfolgte die zehnminütige Permeabilisierung mit 100 µl 0,1 Triton X. Nach einem weiteren Waschgang wurden 2 Tropfen Serum-Free Protein Block (SFPB) für 15

Minuten auf den OT gegeben. Die anschließende Färbung erfolgte mit insgesamt 100 µl Antikörper-Cocktail: Die Antikörper wurden hierbei in der entsprechenden Konzentration in Antibody-Diluent Reagent Solution aufgelöst. Die Inkubationszeit betrug für Primärantikörper 45 Minuten und für Sekundärantikörper 60 Minuten. Nach einem weiteren Waschgang erfolgte die Anheftung eines Deckglases mit 10 µl Mounting Medium.

3.2.3 Spiking-Experimente

Die Zellen einer Tumorzelllinie wurden gemäß des Protokolls in Kapitel 3.2.1 in einem Petriglas in PBS suspendiert. Unter dem Mikroskop wurden jeweils mit einer 10µl Pipette die gewünschte Menge Zellen aufgenommen. Die Blutprobe eines gesunden Patienten (aus der Blutspende) in einem CellSave Röhrchen wurde geöffnet. Anschließend wurde dieses wieder verschlossen.

3.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie und Bildakquisition

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie macht sich ihre Expression bestimmter Antigene zunutze. CTCs besitzen keine Eigenfluoreszenz und sind durch alleinige Lichtmikroskopie nicht von anderen hämatopoetischen Zellen zu unterscheiden. Aus diesem Grund werden Antikörper verwendet, an die Fluorochrome gekoppelt sind. Durch die Verwendung verschiedener Fluorochromfarben ist es möglich, mehrere Antigene gleichzeitig nachzuweisen.

Ziel der Bildakquisition war der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen durch deren Expression epithelialer Proteine bei gleichzeitiger Kernfärbung. Es erfolgte eine Dokumentation und in einigen Fällen eine Einstellung zur Entnahme (siehe 3.2.8 Zellentnahme).

Die Erregung (Exzitation) des Fluorochroms, die zur anschließenden Emission des Fluoreszenzlichtes führt, erfolgte mithilfe von Licht einer für jede Fluoreszenzfarbe spezifischen Wellenlänge. Um dieses Licht zu erzeugen, wurden Filter verwendet, die die gewünschte Wellenlänge herausfiltern.

3.2.5 Blutentnahme

Für diese Arbeit wurden insgesamt 40 Blutproben von 37 Patientinnen im Jahr 2017 entnommen und untersucht. Alle Patientinnen hatten ein metastasiertes Mammakarzinom. Die Blutentnahme wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Therapie durchgeführt.

Die Blutentnahme erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE, Prof. Dr. Volkmar Müller). Die Therapie der Patientinnen erfolgte gemäß internationaler Richtlinien.

Die Aufklärung und Einwilligung der Patientinnen erfolgte schriftlich und die Blutentnahme wurde durch ärztliches Personal durchgeführt. Die Auswertung der Blutproben erfolgte pseudonymisiert und war von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt.

Nach Einwilligung der Patientinnen erfolgte die Entnahme von 6-14 ml Vollblut, die anschließende Lagerung in CellSave-Tubes und die Verarbeitung innerhalb von 4 Tagen.

3.2.6 CellSieve™ Microfilter

Eine zentrale Rolle in diesem Projekt spielt die Verwendung eines neu entwickelten Mikrofilters, der eine noch effizientere Sortierung der Blutzellen nach Größe erlaubt.

Der CellSieve™-Mikrofilter ist eine aus einem biokompatiblen Polymer bestehende Membran, die sich im Gegensatz zu den in anderen Projekten zur CTC-Detektion verwendeten „track etch“-Membranen durch eine gleichmäßige Porenverteilung und eine regelmäßige Porengröße von 7µm auszeichnet. Entworfen wurde er von der Firma Creatv Microtech, Potomac, MD, USA (Pillai et al., 2017).

Ein Beispiel für eine sogenannte „track etch“-Membran ist die Isopore™-Membran.

3.2.7 CellSieve™-Filtration und Färbung

Das für dieses Projekt etablierte Protokoll, nach dem die Aufarbeitung der klinischen Proben erfolgte, ist im Folgenden aufgeführt.

Um eine Blutprobe aufzubereiten und zu analysieren, wurde sie aus einem CellSave-Röhrchen in ein 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Präfixation mit 10%igem Formaldehyd im Verhältnis 1:40 zum Volumen der

Blutprobe für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Das präfixierte Blut wurde in die Eingangsspritze gegeben. Mit 5ml PBS wurde der Falcon Zentrifugenröhrchen ausgewaschen und die Probe daraufhin mit einer Rate von 5ml/min durch den CellSieve™-Microfilter gepumpt. Anschließend wurde die Eingangsspritze mit 3x 4ml PBS nachgewaschen. Daraufhin wurde sie entfernt und die Membran mit 3x 500µl PBS erneut gewaschen.

Die Fixierung erfolgte mit 300 µl 2%igem PFA, das auf die Membran gegeben wurde und für 15 Minuten belassen wurde. Nachdem das PFA entfernt wurde, erfolgte wieder ein Waschgang mit 3x 500µl PBS. Mit 300µl 0,1%igem Triton X erfolgte die Permeabilisierung für weitere 15 Minuten und anschließend ein weiterer Waschgang mit 3 x 500 µl PBS. Der Proteinblockierung mit 3 Tropfen Serum Free Protein Block für weitere 15 Minuten folgte ein letzter Waschgang mit 3 x 500 µl PBS. Um eine optimale Färbung der sich auf der Membran befindlichen Zellen zu gewährleisten wurde die Membranhalterung samt der Membran daraufhin von der Abfallspritze gelöst. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µl Antikörpercocktail für eine Stunde.

Der endgültige Antikörpercocktail bei der Analyse klinischer Proben enthielt die folgenden Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen:

Keratin AE1/AE3 grün	1:200
Epcam VU1D9 grün	1:100
Vimentin V9 rot	1:200
N-Cadherin 13A9 rot	1:100
CD45 Rea747 farred	1:50
Dapi	1:500

Nach einem letzten Waschgang mit 5 x 500 µl PBS wurde die Membran aus der Membranhalterung auf einen Objektträger platziert und ein Deckglas mit 30 µl PBS fixiert und alles mithilfe von handelsüblichem Nagellack luftdicht verschlossen.

3.2.8 Zellenentnahme

Ergänzend zur Mikroskopie erfolgte in einigen Fällen eine Entnahme und Überführung einzelner Zellen in ein PCR Tube. Das Aufnehmen der Zellen und Zell-Cluster erfolgte mithilfe einer angeschliffenen Kapillare, die in den Mikromanipulator CellTram® Vario eingespannt war. Mit der Steuereinheit TransferMan® NK2 wurde diese bewegt. Die Kapillare wurde vor der Zellaufnahme mit UV-Licht bei 3500J/cm² sterilisiert wurde.

Der befestigende Nagellack wurde mithilfe von Aceton gelöst und das Deckglas entfernt. Die sich auf dem Objektträger befindende Membran wurde anschließend mit PBS befeuchtet.

Unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop wurde mithilfe des Mikromanipulators die gewünschte Zelle von der Membran abgelöst und in ein PCR-Tube überführt. Anschließend lagerten die Zellen bei -81°C um für eine spätere molekulargenetische Analyse erhalten zu bleiben.

3.2.9 Whole Genome Amplification und Sequenzierung (FastSeqS)

Zur Amplifizierung der DNA wurden die Zellen aufgetaut. Die PCR erfolgte gemäß der Empfehlungen des Herstellers des Ampli1 Kits.

Nach der Amplifizierung wurde das Material mithilfe des NucleoSpin™ Gel- und PCR-Reiniger gemäß dem bereitgestellten Protokoll gereinigt. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop 1000 Spektrophotometers gemessen.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse sowohl der Versuche zur Etablierung der Färbung und der Methode als auch die Ergebnisse der klinischen Proben aufgeführt. Die Blutproben wurden von 35 Brustkrebspatientinnen im Stadium 4 – also von Patientinnen mit evidenten Fernmetastasen – entnommen.

4.1 Etablierung der Färbung

Der Hersteller des CellSieve™-Mikrofilters stellt ein Protokoll (CellSieve™ Kit) und eine eigene Antikörpermischung zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bereit. Diese wurde in einer ersten Versuchsreihe getestet (siehe 4.3.1). Dieses Projekt bedarf allerdings einer genau auf seine Anforderungen zugeschnittenen Antikörperkonstellation. Um dies zu ermöglichen, wurde ein geeignetes Protokoll etabliert, welches auf die Bedürfnisse des Projektes zugeschnitten war. Dieses beinhaltete eine projektbezogene Filtrierung, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und erlaubt es, von dem originalen Protokoll abweichende Antikörper zu verwenden.

In mehreren Versuchsreihen wurde eine geeignete Antikörperkonstellation zusammengestellt. Ziel hierbei war, die gleichzeitige Färbung sowohl epithelialer als auch mesenchymaler Oberflächenantigene zu ermöglichen. Um diese gleichzeitig immunfluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, wurden unterschiedliche Antikörper, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, getestet und auf ihre Kombinierbarkeit geprüft. So entstand eine Antikörperzusammenstellung, die eine optimale Abbildung sowohl des Ausschlussmarkers (Leukozytenmarker) CD45 als auch der epithelialen und mesenchymalen Antigene erlaubte.

Das endgültige Protokoll und die endgültige Antikörperkonstellation sind unter 3.2.7 en détail aufgeführt.

4.2 Ergebnisse der Spikingexperimente

4.2.1 Spikingexperimente mit dem Cellsieve™ Microfilter

Um die Sensitivität des Cellsieve™-Mikrofilters zu testen, wurde eine Reihe von Spikingversuchen unternommen. Dazu wurden Zellen der Zelllinie MCF7 einzeln oder als Zellcluster in das entnommene Blut gesunder Patienten injiziert. Die Aufarbeitung und Färbung erfolgte in der ersten Versuchsreihe gemäß dem CellSieve™ Protokoll (CellSieve™ KIT). Anschließend wurde das bereits erwähnte, für diese Arbeit eigens entwickelte Protokoll (M&M 3.2.7), welches unter anderem eine Veränderung der Mixtur der verwendeten Antikörper erlaubt, in einer zweiten Versuchsreihe verwendet. Die in dieser zweiten Versuchsreihe verwendeten Antikörper umfassten Keratine, EpCAM und E-Cadherin als epitheliale Marker, Vimentin und N-Cadherin als mesenchymale Marker und CD45 als leukozytärer Ausschlussmarker.

In der folgenden Tabelle sind für 7 Durchläufe der Spikingexperimente, jeweils mit einer unterschiedlichen Anzahl gespikter Zellen und Cluster, die Ergebnisse aufgeführt. Die hellblau markierten Läufe (1-4) erfolgten dabei nach dem originalen Protokoll des CellSieve™ KITs, die dunkelblau markierten Läufe (5-7) nach dem modifizierten Protokoll (siehe 3.2.7).

Tabelle 4: Rückgewinnungsraten gespikter MCF-7 Zellen und Zellcluster mit dem Mikrofilter

	1	2	3	4	5	6	7
Zellen	80 %			100 %	74 %	100 %	100 %
Zellcluster		80 %	90 %	83 %	100 %	80 %	83 %

Somit ergibt sich als durchschnittliche Recovery-Rate:

Für einzelne Zellen: **gesamt 91 %** (altes Protokoll 90 %; neues Protokoll 91 %)

Für Zellcluster: **gesamt 86%** (altes Protokoll 84 %; neues Protokoll 88 %)

4.2.2 Spikingexperimente mit dem Isopore™ Filter (10 µm-Poren)

Zum Vergleich mit 4.3.1 wurden eine Reihe von Spikingversuchen mit einem Track-etch-Filter (siehe Material und Methoden 3.2.6), dem Isopore™-Filter unternommen. Die Poren dieses Filters haben einen Durchmesser von 10 µm und sind unregelmäßig angeordnet.

Gespikt wurden Zellen und Zellcluster der Zelllinie MCF7 in das entnommene Blut gesunder Patienten. Die Anzahl der injizierter Zellen und Cluster betrug jeweils zwischen 17 und 25. Die Versuchsaufbau und die anschließende Aufarbeitung und Färbung erfolgte nach dem Protokoll unter 3.2.7.

Tabelle 5: Ergebnisse der Spikingexperimente Isopore™ 10µm

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Durchschnitt	Standardabweichung
Zellen	55 %	28 %	24 %	36 %	13,8 %
Zellcluster	11 %	13 %	11 %	11,7 %	1,3 %

Im Vergleich zu den Spikingversuchen mit dem CellSieve™-Mikrofilter sind die deutlich schlechteren Recovery Rates (Rückgewinnungsraten) zu erkennen mit 36 ± 14 % für einzelne Zellen und 12 ± 1 % für Zellcluster. Der direkte Vergleich ist aber aufgrund der verschiedenen Porengrößen mit 7µm (Cellsieve™) zu 10 µm (Isopore™) schwierig. Außerdem ist die Aussagekraft der Versuchsreihe durch die geringe Probenzahl limitiert.

4.3 Ergebnisse mit Patientinnenproben

4.3.1 Ergebnisse der Aufarbeitung der Patientinnenproben

Insgesamt wurden 35 Blutproben von Brustkrebspatientinnen mit metastasierter Erkrankung untersucht. Die Blutproben wurden nach dem beschriebenen Protokoll (siehe 3.2.7) entnommen und aufgearbeitet.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Proben der einzelnen Patientinnen aufgelistet.

Tabelle 6: *Ergebnisse der Patientinnenproben*

	Epitheliale Zellen	Mesenchymale Zellen	Mesenchymale Cluster
Patientin 1	0	0	0
Patientin 2	2	2	1
Patientin 3	0	0	0
Patientin 4	0	ca. 80	ca. 150
Patientin 5	4	0	0
Patientin 6	0	ca. 120	ca. 60
Patientin 7	1	0	0
Patientin 8	37	7	8
Patientin 9	0	ca. 250	ca.500
Patientin 10	0	0	0
Patientin 11	0	0	0
Patientin 12	0	0	0
Patientin 13	0	ca. 120	ca.170
Patientin 14	0	0	0
Patientin 15	0	0	0
Patientin 16	39	11	15
Patientin 17	0	7	13
Patientin 18	0	6	27
Patientin 19	0	0	0
Patientin 20	0	0	0
Patientin 21	0	18	27
Patientin 22	0	0	0
Patientin 23	1	0	0
Patientin 24	0	10	ca. 15
Patientin 25	0	0	0
Patientin 26	0	0	0
Patientin 27	0	0	0
Patientin 28	0	1	3
Patientin 29	0	0	0
Patientin 30	0	300	450
Patientin 31	0	60	57
Patientin 32	0	14	9

Patientin 33	9	38	60
Patientin 34	2	0	0
Patientin 35	1	0	0

Insgesamt wurden bei 9 von 35 Patientinnen (25,7 %) Zellen gefunden, die epitheliale Marker (Epcam, E-Cadherin, Pan-Keratin) stark exprimierten. Diese entsprachen dem typischen CTC-Phänotyp und waren negativ für den Leukozytenmarker CD45. Somit wurden sie als CTCs identifiziert. In diesen neun Proben wurden jeweils mindestens eine und bis zu 39 CTCs pro Probe gefunden.

Neben diesen – für die epithelialen Marker positiven – CTCs wurde eine weitere Zellpopulation mit der etablierten Färbung sichtbar gemacht. Bei 15 von 35 Patientinnen (42,9 %) wurden sowohl einzelne Zellen als auch Zellcluster gefunden, die sich durch eine starke Positivität für mesenchymale Marker (N-Cadherin, Vimentin) auszeichneten. Diese Zellen waren kaum positiv für epitheliale Marker.

Die Größe, Form und Anzahl besonders der Cluster variierte stark. In der Blutprobe von Patientin 2 zum Beispiel wurden lediglich zwei mesenchymale Zellen und ein Cluster gefunden. Bei anderen Proben dagegen konnten bis zu ca. 450 Cluster und 300 Zellen (Patientin 29) detektiert werden. Diese Cluster enthielten bis zu ca. 50 Zellen und hatten sehr unterschiedliche Formen und Exprimierungsmuster.

Vier dieser Proben beinhalteten sowohl epitheliale CTCs als auch mesenchymale Zellen und Zellcluster.

4.3.2 Ergebnisse der Mikroskopie

In diesem Abschnitt sollen beispielhaft die detektierten zirkulierenden Tumorzellen und die Zellcluster nach Filtrierung und Anfärben durch die beschriebenen Antikörper visuell demonstriert werden. Jedes Bild ist durch einen Einzelfilter aufgenommen und dokumentiert worden und anschließend sind die Einzelbilder mithilfe des Programms „Image J“ zusammengeführt worden.

Die nachfolgenden Bilder sind verschiedenen Indexpatientinnen zuzuordnen.

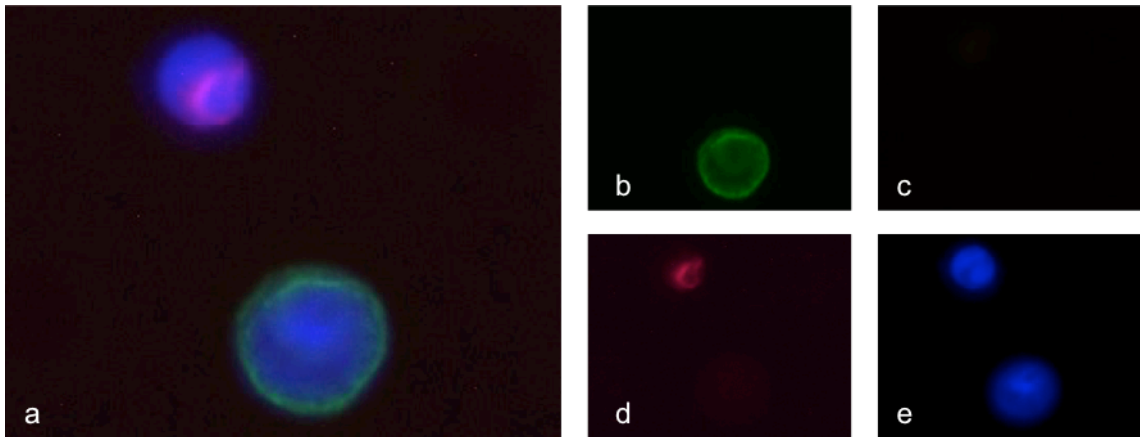


Abbildung 4: CTC & Leukozyt im Blut von Indexpatientin 8 mit met. Mammakarzinom
 a) Kombinierte Ansicht b) epitheliale Marker (EpCam, Pan-Keratin, E-Cadherin)
 c) mesenchymale Marker (Vimentin, N-Cadherin d) CD45 e) DAPI

Wie im Abschnitt 4.3 bereits erwähnt, wurden neben den epithelialen zirkulierenden Tumorzellen auch Zellen und Zellcluster detektiert, die stark mesenchymale Marker exprimieren.

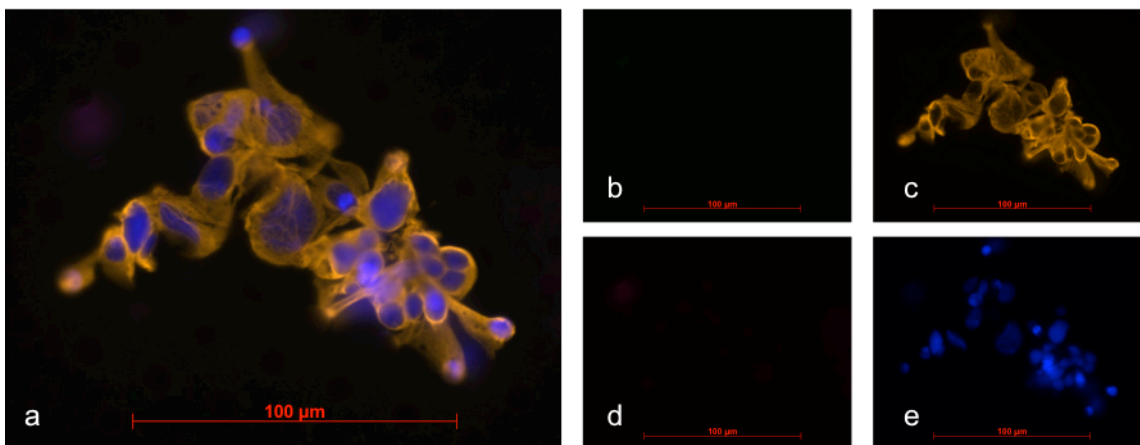


Abbildung 5: Zellcluster im Blut von Indexpatientin 4 mit metastasiertem Mammakarzinom
 a) Kombinierte Ansicht b) epitheliale Marker (EpCam, Pan-Keratin, E-Cadherin)
 c) mesenchymale Marker (Vimentin, N-Cadherin d) CD45 e) DAPI

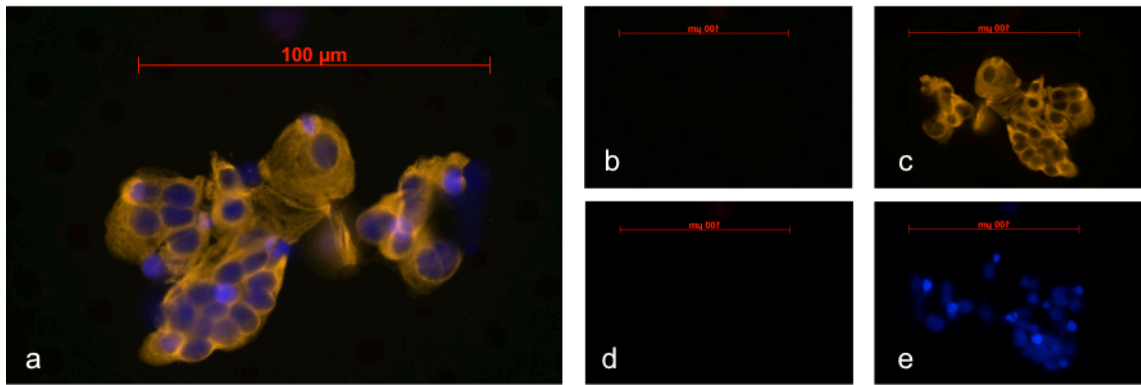


Abbildung 6: Zellcluster im Blut der Indexpatientin 4 mit metastasiertem Mammakarzinom

- a) Kombinierte Ansicht b) epitheliale Marker (EpCam, Pan-Keratin, E-Cadherin
- c) mesenchymale Marker (Vimentin, N-Cadherin d) CD45 e) DAPI

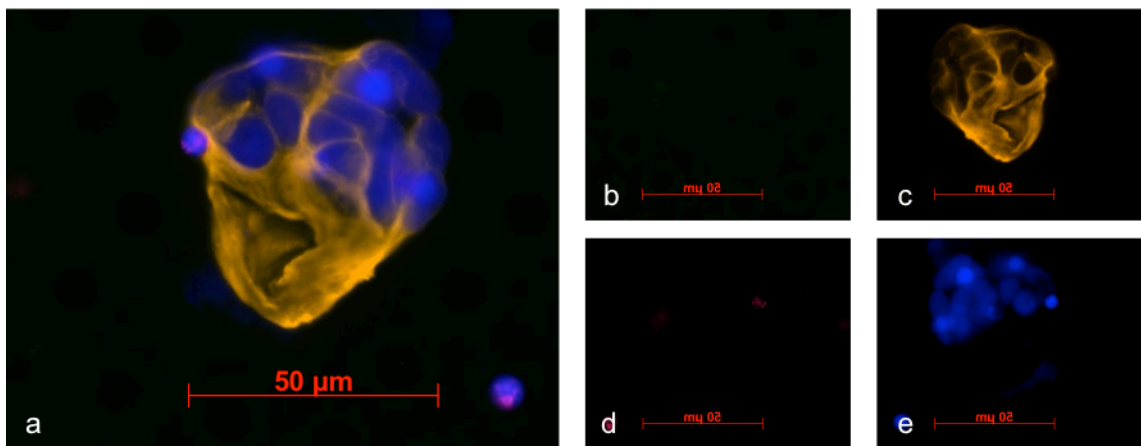


Abbildung 7: Zellcluster im Blut der Indexpatientin 9 mit metastasiertem Mammakarzinom

- a) Kombinierte Ansicht b) epitheliale Marker (EpCam, Pan-Keratin, E-Cadherin
- c) mesenchymale Marker (Vimentin, N-Cadherin d) CD45 e) DAPI

4.3.3 Vergleiche von Cellsieve™ Mikrofilter mit dem CellSearch-System

Für 5 der Indexpatientinnen wurde jeweils eine zweite Vergleichsblutprobe mit dem Cellsearch-System ausgewertet. Die Vergleichsproben wurden zum gleichen Zeitpunkt abgenommen und ausgewertet wie diejenigen Blutproben, die mit dem Cellsieve™-Mikrofilter aufgearbeitet wurden. In Tabelle 7 sind im Einzelnen die Patientinnen und die jeweils detektierten Zellen aufgelistet.

Tabelle 7: Vergleich der Ergebnisse des Cellsieve™-Microfilters mit CellSearch für 5 Patientinnen

Patientennummer	CellSearch	Cellsieve-Mikrofilter	
	CTCs	CTCs	Mes. Cluster
C1	12	2	0
C2	0	1	0
C3	36	9	60
C4	0	0	0
C5	0	0	0

Es ist zu sehen, dass bei allen Patientinnen, deren Blutproben laut CellSearch-System positiv für einzelne CTCs (epithelialmarker-positiv) sind, auch mithilfe des Cellsieve™-Mikrofilters besagte CTCs detektiert wurden. In Bezug auf die Anzahl der detektierten CTCs und somit der Sensitivität bleibt der Cellsieve™-Filter hinter dem Cellsearch-System zurück. Bei Patientin C3 zum Beispiel, zählte das CellSearch-System 36 CTCs in 7,5 ml Blut. Mithilfe des Cellsieve™-Mikrofilters wurden nur 9 CTCs entdeckt.

Die bereits erwähnten Zellen und Zellcluster, die sich durch starke Expressierung mesenchymaler Marker auszeichnen sind in der letzten Spalte der Tabelle 7 aufgelistet. Sie waren von diesen fünf Patientinnen nur bei Patientin C3 und ausschließlich mithilfe des Cellsieve™-Mikrofilters detektierbar. Das CellSearch-System detektiert diese Zellpopulation nicht.

4.4 Ergebnisse der molekulargenetischen Charakterisierung

Um den Ursprung und die Beschaffenheit der Cluster genauer zu analysieren, wurden Zellen und Zellcluster mittels fluoreszenzmikroskopisch gestützter Mikromanipulation von den Membranen isoliert. Dabei wurden von 5 Indexpatientinnen die isolierten Zellen und Cluster mesenchymalen Ursprungs und Zellen epithelialen Ursprungs (CTCs) zur molekulargenetischen Charakterisierung ausgewählt.

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das Genom der Zellen amplifiziert und anschließend durch ein auswärtiges Labor mittels FastSeqS-Technologie sequenziert. Dabei wurde nach dem Vorhandensein von Copy Number Aberrations (CNAs) gesucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 beispielhaft zu sehen. Dabei war eine große Heterogenität ersichtlich sowohl innerhalb der mesenchymalen Cluster einer Indexpatientin (A) als auch zwischen den mesenchymalen Zellen und Clustern und den CTCs einer anderen Patientin (B). Ein patientinnenspezifisches Muster ist nicht zu erkennen und diese Heterogenität macht es schwierig, eine konkrete Aussage zum Ursprung der Cluster zu treffen. Würde ein patientinnenspezifisches Muster existieren, könnte man davon ausgehen, dass es sich um Tumorzellen handelt.

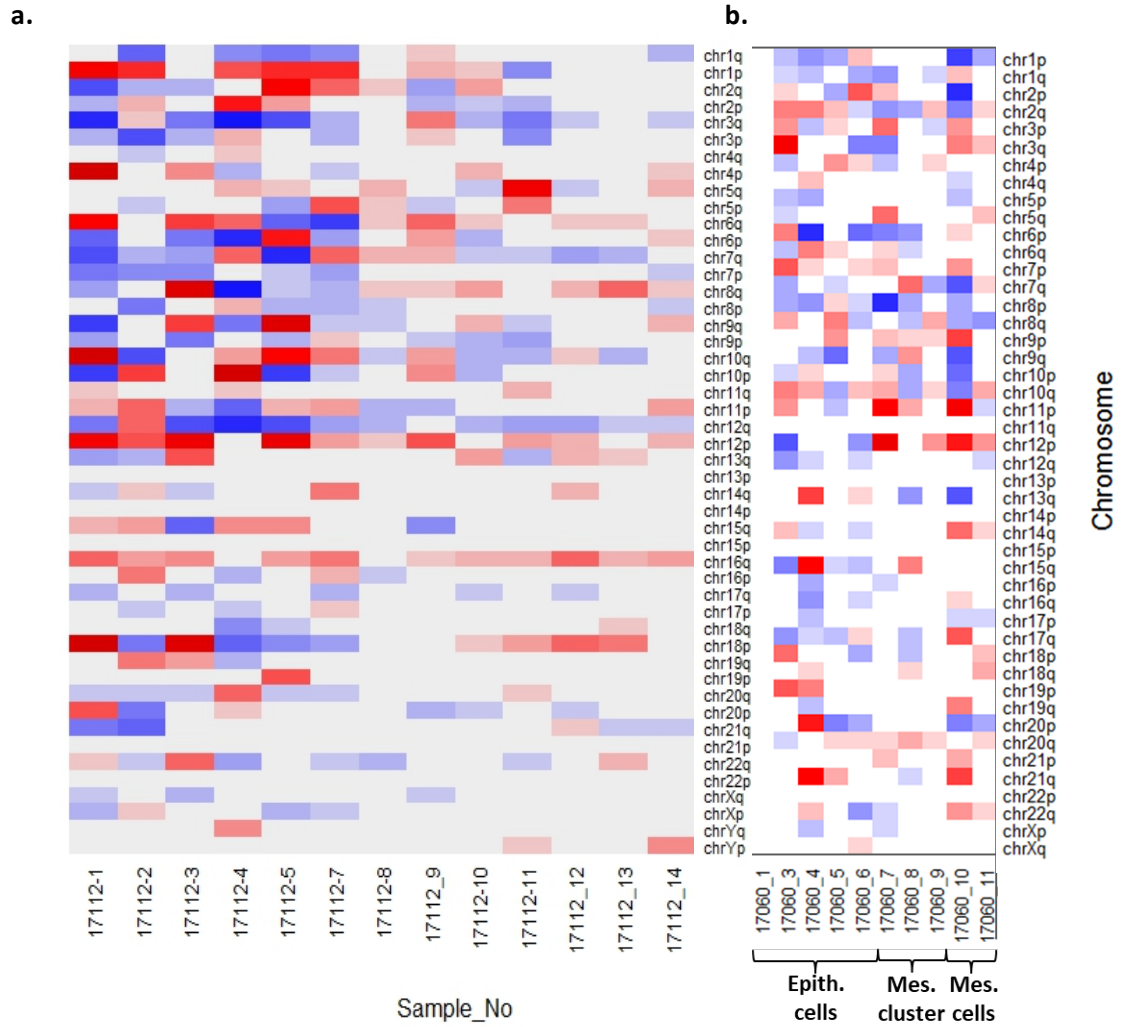


Abbildung 8: Copy Number Aberration Profile der Zellen und Zellcluster zweier Indexpatientinnen; Y-Achse: Chromosomenarme; rot: Amplifikationen; blau: Deletionen

a: Mesenchymale Cluster einer Indexpatientin

b: CTCs, mesenchymale Zellen und Cluster einer Indexpatientin

4.5 Ergebnisse der klinischen Korrelation

Bei allen Patientinnen, deren Blutproben ausgewertet wurden, wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme der Krankheits- und Therapiestatus festgehalten.

Von den 35 Patientinnen wurde der weitere Krankheitsverlauf dokumentiert. Die Follow-up-Zeit betrug zwischen 3 und 14 Monaten (Mittelwert: 9,3 Monate).

Für diese Patientinnen wurde eine Überlebenszeitanalyse angefertigt. Dazu wurde mithilfe eines Log-Rank-Tests das progressionsfreie Überleben der Patientinnen zweier Gruppen verglichen.

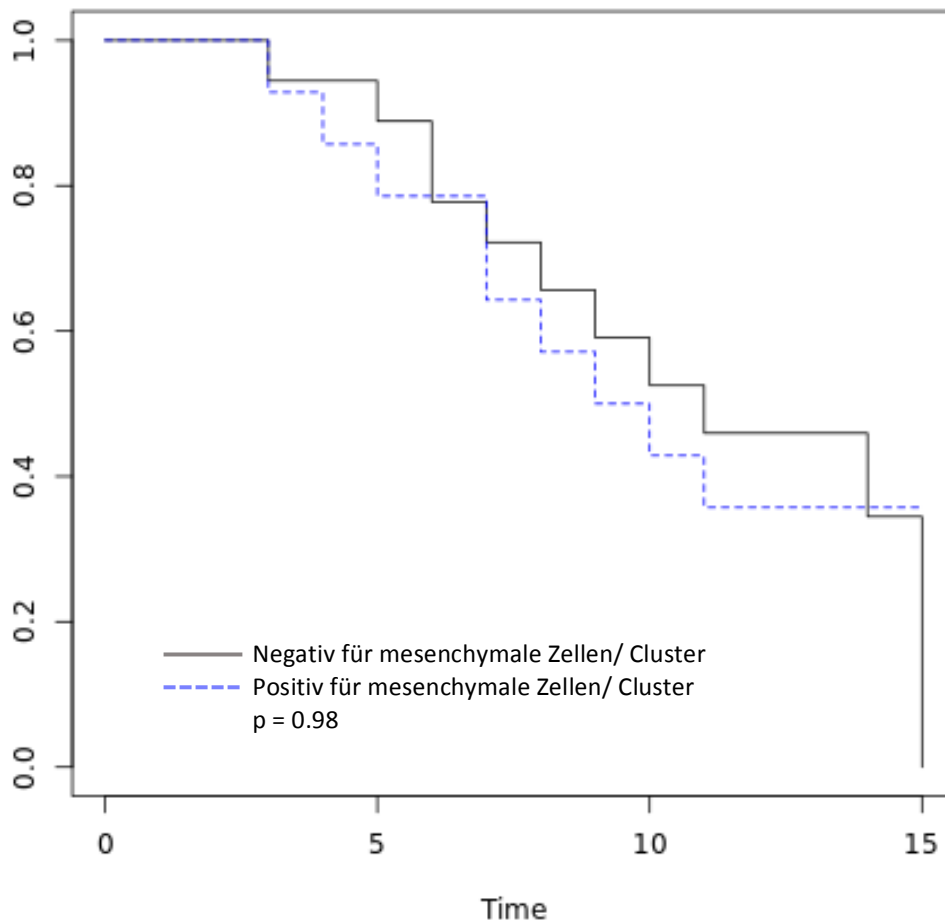


Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben Cluster-positiver verglichen mit Cluster-negativen Patientinnen. X-Achse: Überlebenszeit in Monaten

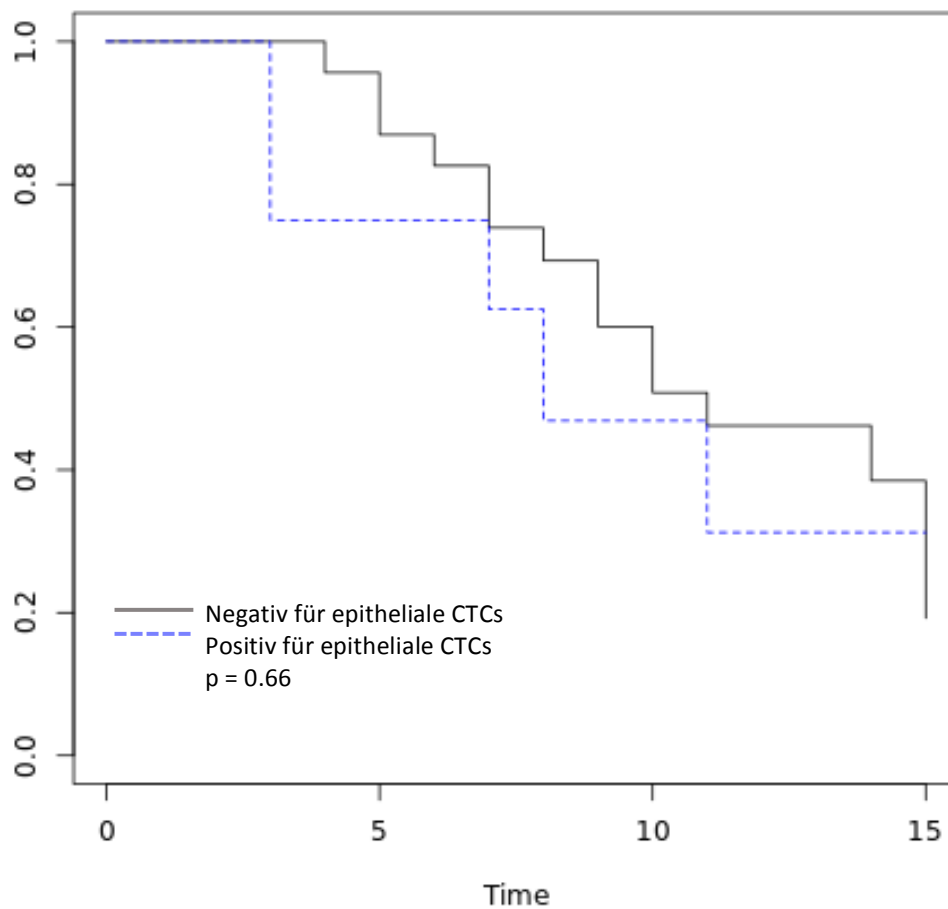


Abbildung 10: Progressionsfreies Überleben CTC-positiver (blau gestrichelte Linie) verglichen mit CTC-negativen (graue Linie) Patientinnen. X-Achse: Überlebenszeit in Monaten

Für die Präsenz mesenchymalmarker-positiven Clustern und Zellen im Blut konnte mittels Log-Rank-Test mit $p = 0,98$ keine signifikante Korrelation mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben gefunden werden. Das gleiche gilt in dieser Kohorte für die Präsenz von epithelialen CTCs im Blut. Mit $p = 0,66$ ist auch diese Korrelation nicht signifikant.

5 Diskussion

Die Hauptursache krebserkrankter Mortalität beim Mammakarzinom ist nach wie vor nicht etwa der primäre Tumor, sondern die Metastasierung (Chaffer und Weinberg, 2011; Nguyen et al., 2009). Dies gilt analog auch für viele weitere Tumorentitäten (Chaffer und Weinberg, 2011). Somit sind die Hintergründe der Metastasenentstehung ein Bereich großen wissenschaftlichen und klinischen Interesses, und sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Seit geraumer Zeit wird intensiv in diesem Gebiet geforscht, und in diesem Zusammenhang rücken zirkulierende Tumorzellen (CTCs) immer mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit (Alix-Panabières et al., 2017; Alix-Panabieres und Pantel, 2016).

Im Blut zirkulierende Tumorzellen sind im Zuge der sogenannten „Liquid Biopsy“ mithilfe verschiedenster Methoden aus dem Blut isolierbar. Es wird ihnen sowohl eine prädiktive als auch eine prognostische Aussagekraft zugesprochen (Bardelli und Pantel, 2017). In dem Zusammenhang der Metastasenentstehung durch zirkulierende Tumorzellen spielt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine entscheidende Rolle. Diese erlaubt es den Zellen, im Zuge der Metastasierung ihre Proteinexpression und damit einhergehende Eigenschaften zu verändern und widerstandsfähiger zu werden (Bednarz-Knoll et al., 2012).

Während die Rolle der CTCs bei der Entstehung von Metastasen in den letzten Jahren viel untersucht wurde, ist kaum etwas über zirkulierende tumorstämmige Zellverbände, sogenannte Zellcluster bekannt. Etablierte Detektionsverfahren sind vorrangig auf einzelne Zellen und nicht Zellcluster zugeschnitten und somit herrscht Bedarf an weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

In dieser Arbeit wurden mehrere Aspekte analysiert. Zum einen wurde eine neue Mikrofiltrationsmethode zur Detektion zirkulierender Tumorzellen getestet. Dies geschah sowohl durch Spikingversuche, zur Testung der Detektionsrate und somit der Reliabilität der Messmethode, als auch durch die Analyse von Patientenproben.

Zum anderen wurde das Blut von 35 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom auf zirkulierende Tumorzellen und Zellcluster im Blut untersucht und eine Korrelationsanalyse mit dem progressionsfreien Überleben angefertigt. Des Weiteren wurde der Ursprung und die Signifikanz der detektierten Zellcluster im Blut näher beleuchtet.

5.1 Methodische Aspekte

Die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Krebspatienten stellt nach wie vor eine Herausforderung in der Tumorforschung dar. Aufgrund ihrer niedrigen Konzentration im Blut, die etwa eine Tumorzelle pro 100.000-1.000.000 beträgt (Balic et al., 2005), werden äußerst sensitive Methoden für die Isolierung der Zellen benötigt. Derzeit sind eine Vielzahl von Anreicherungsverfahren bekannt, zu denen auch das CellSearch™-System gehört, das als Goldstandard der CTC-Detektion gilt (Alix-Panabieres und Pantel, 2013). Da dieses System, wie auch viele andere, auf der Expressierung epithelialer Marker beruht, besteht die Gefahr von falsch negativen Ergebnissen.

Den markerbasierten Detektionsverfahren stehen unter anderem physikalische Methoden gegenüber, zu denen auch die größenbasierte Mikrofiltration zählt. Diese hat somit den Vorteil, dass sie markerunabhängig ist, das heißt, dass CTCs aus dem Blut filtriert und erst im Nachhinein angefärbt und charakterisiert werden können.

Geeignete Anreicherungsverfahren für Tumorzellcluster hingegen sind noch weitaus weniger etabliert (Yupeng Hong et al., 2016). Da diese per definitionem aus mehreren Zellen bestehen, und damit größer sind, liegt der Gedanke nahe, dass auch sie durch größenabhängige Verfahren besser detektierbar sind, als durch markerbasierte Verfahren.

Aus methodischer Sicht bietet die manuelle Anreicherung und Färbung im Vergleich zu Verfahren wie CellSearch™ potenzielle Quellen für Fehler. Beim CellSearch™-System erfolgt sowohl die Anreicherung und Färbung als auch die Auszählung automatisch. Die manuelle Anreicherung, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist im Vergleich dazu zum einen zeitaufwendiger, zum anderen bietet auch mehr Möglichkeiten für systemische Fehler. Auch beinhaltet die manuelle Auszählung der Tumorzellen zuweilen Interpretationsspielräume. Aus all diesen Gründen ist die Festlegung genau definierter, einheitlicher Kriterien zur Tumorzellidentifikation unerlässlich. Dadurch und durch eine zweifache Überprüfung der Objektträger wurde versucht, die genannten Fehlerquelle zu minimieren.

Eine denkbare Zukunftsperspektive für die Anwendung des CellSieve™-Mikrofilter, um die oben genannten Fehlerquellen zu vermeiden, stellt die Automatisierung der Filtration dar. Diese würde die Vorteile der Mikrofiltration mit einer besseren Reliabilität vereinen.

Neben der Filtration ist die auf Immunfluoreszenz basierende Färbung in diesem Projekt essenziell zur Detektion der zirkulierenden Zellen. Wie bereits erwähnt ist von zirkulierenden Zellen – als Zellen epithelialen Ursprungs – bekannt, dass sie epitheliale Oberflächenantigene exprimieren. Das oben erwähnte CellSearch™ System beispielsweise beruht auf der Detektion des epithelialen Oberflächenantigens EpCAM.

Mehrere Studien legen allerdings nahe, dass die alleinige Suche nach EpCAM-positiven Zellen nicht ausreicht, um alle epithelialen zirkulierenden Tumorzellen zu identifizieren (de Wit et al., 2019; Lampignano et al., 2017). Zytokeratine als Zielstruktur sollen eine bessere Option darstellen (S. A. Joosse et al., 2012). Um ein breites Spektrum an epithelialen Oberflächenantigenen potenzieller CTCs abzubilden, und somit weniger CTCs zu übersehen, umfasste in dieser Arbeit das epitheliale Antikörperpanel neben Antikörpern gegen EpCAM auch solche gegen verschiedene Keratine und E-Cadherin.

Eine umfassende Abbildung/Targeting epithelialer Marker alleine garantiert allerdings noch keineswegs die Detektion aller CTCs. Dies gilt besonders für Zellen, die im Zuge der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in einen eher mesenchymalen Phänotyp übergehen (S. A. Joosse et al., 2015).

Im Zuge der sogenannten epithelial-mesenchymalen Transition, die zu einer Veränderung der Oberflächenproteine und damit einhergehend des Migrations- und Überlebenspotentials der Zellen führt, exprimieren die zirkulierenden Tumorzellen vermehrt mesenchymale Marker (Alix-Panabières et al., 2017). Somit ist es notwendig, dass auch Antikörper gegen mesenchymale Oberflächenproteine in den Antikörpercocktail aufgenommen werden. In dieser Arbeit wurde daher ein mesenchymales Antikörperpanel, welches aus Vimentin und N-Cadherin bestand, etabliert.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Als Grundlage für die Verwendung des Filters in den klinischen Versuchen wurde eine orientierende Reliabilitätstestung des Filters durchgeführt.

Dafür wurden zunächst Wiedergewinnungsraten für einzelne Zellen und Zellcluster mithilfe zweier Protokolle ermittelt. Die ermittelte Rate für einzelne Zellen betrug insgesamt rund 91 %, für Zellcluster 86 %. Diese Wiedergewinnungsraten dienen der orientierenden Einschätzung der Reliabilität. Für aussagekräftigere Ergebnisse müsste die Probenzahl erhöht werden. Für diese Arbeit wurde eine Orientierung allerdings als ausreichend erachtet. Grund dafür waren unter anderem ebenfalls gute Ergebnisse in ähnlichen Versuchen anderer Gruppen. Für einen vergleichbaren Filter haben Adams et al. 2014 beispielsweise mit der gleichen Zelllinie eine Rückgewinnungsrate von 98 ± 2 % beschrieben (Adams et al., 2014). Auch bei ihnen war die Probengröße mit $n=3$ gering. Für eingeschränkt vergleichbare Track-Etch Filter (Porengröße 8 statt 10) erhielten sie eine Wiedergewinnungsrate von 73 ± 13 %.

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Identifikation von zirkulierenden Tumorzellclustern im Blut von Krebspatientinnen. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass zirkulierende Tumorzellcluster eine bedeutend größeres Potential zur Metastasenbildung haben als einzelne CTCs (Nicola Aceto et al., 2014) und entscheidend an der Metastasenentwicklung mitbeteiligt sind.

Die CTC-Cluster-Forschung steht, trotz lange zurückreichender erster Erkenntnisse, noch am Anfang. So kann über die Rolle der Cluster bei der Entstehung von Metastasen bislang nur spekuliert werden. Eine Hypothese wurde in diesem Zusammenhang von Hong et al. 2016 aufgestellt. Sie postulieren, dass nicht etwa, wie es dem allgemeinen Konsens entspricht, einzelne CTCs sondern vielmehr CTC-Cluster für die Entstehung von Metastasen grundlegend sind. Laut der Hypothese entstehen die Metastasen durch die Embolisierung kleiner Gefäße durch CTC-Cluster. Von hier aus nisten sie sich entweder durch Extravasations-abhängige oder -unabhängige Vorgänge im Gewebe ein und führen so zur Metastasenbildung (Nicola Aceto et al., 2014; Y. Hong, Z. Li, et al., 2016).

Allerdings sind Tumorzellcluster, die in vorherigen Arbeiten anderer Gruppen beschrieben wurden, heterogener Zusammensetzung. Sie bestehen unter anderem aus Fibroblasten, Leukozyten und Tumorzellen mit damit einhergehender heterogener Expression sowohl epithelialer als auch mesenchymaler Marker (Yupeng Hong et al., 2016).

Die in dieser Arbeit identifizierten Zellcluster exprimieren auf der anderen Seite ausschließlich mesenchymale Marker. Da derartige Cluster in der Literatur nicht vorbeschrieben sind, war eine weitere Abklärung des Ursprungs dieser Cluster notwendig.

Neben der Aufarbeitung der Blutproben mit dem CellSieve™-Mikrofilter erfolgte ein orientierender Vergleich für fünf Patientinnen mit dem CellSearch™-System. Dabei bleibt der CellSieve™ Mikrofilter in puncto Sensitivität bei diesem Patientenkollektiv hinter dem CellSieve™ System zurück (siehe Punkt 4.4.3). Nicht umsonst ist das CellSearch System der Goldstandard der CTC Detektion und zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität aus (Alix-Panabieres und Pantel, 2013). Allerdings konnten andere Arbeitsgruppen mithilfe größenbasierter Mikrofiltration sogar bessere Ergebnisse als mit dem CellSearch™ System erzielen (Adams et al., 2014; Huebner et al., 2018). Trotzdem ist hervorzuheben, dass die mesenchymalmarker-positiven Zellen und Zellcluster, die bei einer der Patientinnen gefunden wurden, vom Cellsearch™-System nicht detektiert werden.

Um der Frage des Ursprungs der beschriebenen mesenchymalen Cluster weiter nachzugehen, wurde eine in 4.5. dargestellte molekulargenetische Analyse durchgeführt. Dabei wurde nach sogenannten Copy Number Aberrations (CNAs) gesucht. Diese sind als Aberrations-Profil sozusagen eine Art Signatur im Rahmen einer Metastasierung zu verstehen und erlauben die Zuordnung der Zellen zu der zugrundeliegenden Krebserkrankung (Baldacchino und Grech, 2020). Paoletti et al. konnten in diesem Zusammenhang eine hohe Konkordanz zwischen den Copy Number Aberrations der CTCs und derer der Metastasen zeigen (Paoletti et al., 2018)).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden von 5 Indexpatientinnen Zellen und Zellcluster je nach Vorhandensein wie beschrieben isoliert und analysiert. Dabei konnte kein patientenspezifisches Muster erkannt werden. Dies könnte als Hinweis auf einen nicht tumorösen Ursprung der Cluster sein. Allerdings ist auch innerhalb der epithelialen Zellen, also die zirkulierenden Tumorzellen einer einzelnen Patientin (siehe Abbildung 8B) kein Muster zu erkennen. Dies bedarf zur weiteren Abklärung einer kritischen und differenzierten Hinterfragung und einer Wiederholung der molekulargenetischen Analyse, eventuell in größerem Rahmen.

Um die Frage zu beantworten, in wieweit die Ergebnisse dieser Arbeit mit dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung korrelieren, wurde eine Überlebenszeitanalyse angefertigt. Dazu wurde für die 35 Patientinnen auf der einen Seite das progressionsfreie Überleben und auf der

anderen Seite das Vorhandensein von sowohl CTCs als auch von mesenchymalen Clustern betrachtet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen im Blut mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben korreliert (M. Cristofanilli et al., 2007; Rack et al., 2014). Ein ähnliches Bild ergibt sich für zirkulierende Tumorzellcluster. Mehrere andere Gruppen konnten bei verschiedenen Tumoren eine Korrelation ihrer Präsenz im Blut mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben und einem schlechteren Gesamtüberleben beschreiben (Giuliano et al., 2018; Jansson et al., 2016; Murlidhar et al., 2017; D. Zhang et al., 2017). Aceto et al. demonstrierten darüber hinaus im Mausmodell, dass CTC-Cluster eine 23- bis 50-fache metastatische Potenz besitzen (Nicola Aceto et al., 2014).

Auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen Daten kann allerdings keine derartige Aussage getroffen werden. Das progressionsfreie Überleben korrelierte weder mit dem Vorhandensein zirkulierende Tumorzellen (p-Wert 0,98) noch für die beschriebenen Cluster (p-Wert 0,66) signifikant. Allerdings ist dies zu erklären mit der geringen Probengröße verglichen mit anderen Arbeiten. Um eine statistisch signifikante Korrelation zu erstellen, wäre eine Testung eines größeren Patientinnenkollektivs notwendig. Ein anderer Aspekt ist die Zusammensetzung des Patientinnenkollektivs. Bei allen Patientinnen hat bereits eine Metastasierung stattgefunden und somit ist es denkbar, dass das Vorhandensein von CTCs und Tumorzellclustern aus diesem Grund nicht mehr ausschlaggebend für die Prognose der Erkrankung ist.

Ein weiterer, immer noch nicht endgültig aufgeklärter Aspekt, der an dieser Stelle noch zu erwähnen ist, ist der genaue Zusammenhang zwischen Metastasierung und der epithelial-mesenchymalen Transition. So haben Fischer et al. für das Mammakarzinom festgestellt, dass die epithelial-mesenchymale Transition nicht zwingend notwendig für die Metastasenbildung ist, aber die Resistenz gegenüber Chemotherapie fördert (Fischer et al., 2015). Dasselbe wurde für das Pankreaskarzinom vom Zheng et al beschrieben (Zheng et al., 2015).

5.3 Ursprung der Zellcluster

Über den Ursprung und die genaue Zusammensetzung der Cluster kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. In der Literatur ist sowohl die Rolle zirkulierender Zellcluster im Blut als auch ihr Ursprung nicht hinlänglich geklärt. Dies liegt unter anderem an dem lange Zeit bestehenden Mangel an geeigneten Detektionsmethoden (Yupeng Hong et al., 2016; Y. Hong, F. Fang, et al., 2016).

Denkbar ist, dass die besagten Zellcluster aus zirkulierenden Tumorzellen bestehen. Diese könnten im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition in einen mesenchymalen Phänotyp übergegangen sein. Diese Transition kann auch im Blut induziert werden (Labelle et al., 2011). Solche oder ähnliche Tumorzellcluster sind mehrfach in der Literatur beschrieben (Nicola Aceto et al., 2014; Yu et al., 2013).

Eine weitere Möglichkeit, die auch den mesenchymalen Phänotypen der Cluster erklären würde, ist ein Tumor-endothelialer Ursprung. Das würde bedeuten, die Zellen entsprängen dem Gefäßsystem des Tumors.

Im Blut zirkulierende endotheliale Zellen (CECs) bei Tumorerkrankungen wurden an verschiedenen Stellen beschrieben, zum Beispiel von Lin et. al 2017, die diese auch weiterführend charakterisierten (P. P. Lin et al., 2017). Die Rolle dieser CECs bezüglich der Metastasierung scheint eng verknüpft mit der tumoreigenen Angiogenese zu sein (Bertolini et al., 2006).

Eine interessante Entdeckung diesbezüglich machten Cima et. al. 2016. Sie befassten sich ebenfalls mit im Blut zirkulierenden Zellclustern. Mit dem Ziel CTCs im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC) mittels Mikrofiltration zu finden und zu charakterisieren, beschrieben auch sie zusätzlich zu den CTCs Zellcluster. Entgegen der Ergebnisse anderer (bereits erwähnter) Gruppen stellten Cima et al. die Malignität dieser Cluster in Frage und haben einen Tumor-endothelialen Ursprung dieser Cluster beschrieben (Tumor Derived Endothelial Cells, tECs). Diese Cluster exprimierten epitheliale, mesenchymale sowie endotheliale Marker. Ihre Ergebnisse sprechen (ebenfalls) gegen eine Entstehung dieser Cluster durch Vermehrung einzelner tECs oder deren Koagulation im Blutstrom, sondern vielmehr für eine direkte Abgabe der Cluster durch das Tumor-Gefäßsystem. Bezüglich der prognostischen Relevanz dieser Cluster konnte gezeigt werden, dass sich anhand solcher Cluster gesunde Probanden von präoperativen Patienten niedrigen Stadiums unterscheiden

ließen. Somit stellen sie einen potenziellen Biomarker bei CRC Patienten dar (Cima et al., 2016).

Bezüglich der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen mesenchymalmarker-positiven Zellen und Cluster deuten weiterführende Versuchsreihen mittlerweile darauf hin, dass es sich um tumorendotheliale Zellen handelt. Ob diese im Rahmen vermehrter Angiogenese bei Größenzunahme eines Tumors ins Blut gelangen oder die endothelialen Eigenschaften erst in der Blutbahn ausbilden, bleibt eine offene Frage.

5.4 Ausblick

In Zeiten, in denen wir – unter anderem bedingt durch zunehmende Charakterisierungsmöglichkeiten – immer mehr über die Heterogenität von Tumorerkrankungen lernen, wird der Wunsch nach einer personalisierten Krebstherapie zunehmend lauter. Standardisierte Therapien stellen in vielen Fällen nicht die optimale Behandlung einer Tumorerkrankung dar. So konnte unter anderem für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass eine adjuvante systemische Therapie nach einheitlichen Schemata – ohne Beachtung der molekularen Signatur und damit ohne Identifizierung der Patientinnen, die von einer systemischen Therapie profitieren – zu einer Überbehandlung führen kann (Drukker et al., 2014; Rea und Francis, 2014).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse stehen eng im Zusammenhang mit der sogenannten ‚Liquid Biopsy‘, auch Flüssigbiopsie genannt.

Dieser Begriff erhielt vor rund zehn Jahren Einzug in die Tumorforschung (Pantel und Alix-Panabieres, 2010). Hinter ihm verbirgt sich eine minimalinvasive Blutuntersuchung, die weitreichenden Aufschluss über die Tumorerkrankung eines Patienten geben soll. Eine invasive Biopsie des Tumors könnte dadurch eines Tages sogar obsolet werden.

Das Ziel der Liquid Biopsy ist eine verbesserte Möglichkeit sowohl der Früherkennung als auch der Therapieüberwachung und Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen in Echtzeit. Außerdem kann eine sogenannte ‚Minimal Residual Disease‘ (MRD, minimale Resterkrankung) eines soliden Tumors durch diese Methode früh entdeckt werden (Baldacchino und Grech, 2020). Damit sind kleinste Tumorrückstände bei Patienten in Remission gemeint, die weder klinisch noch radiologisch evident werden. Die frühere Erkennung dieser Rückstände führt zu einer früheren Interventionsmöglichkeit bei geringerer Ausbreitung des Tumors (Griffith und Gray, 2011).

Eine Liquid Biopsy umfasst die Analyse verschiedener tumorassoziierter Blutbestandteile. Dazu können beispielsweise zirkulierende Tumorzellen und zellfreie Tumor-DNA (ctDNA) gehören (Lianidou und Pantel, 2019) aber auch viele weitere zelluläre oder nicht-zelluläre Marker.

Bezüglich zirkulierender Tumorzellen ist, wie bereits erwähnt, die alleinige Auszählung der Zellen im Rahmen einer Liquid Biopsy bereits ein effektives Werkzeug, um die Aggressivität und den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung zu beurteilen (N. Aceto et al., 2015). Allerdings gewinnt auch die molekulargenetische Analyse der Zellen zunehmend an Bedeutung

(Micalizzi et al., 2017). Grund hierfür ist die immer evidenter werdende Heterogenität innerhalb der CTCs eines Patienten.

Eine Fülle weiterer tumorassoziierter Zellpopulationen im Blut, die im Rahmen der Liquid Biopsy eine Rolle spielen/spielen könnten, sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Eines der vielen Beispiele hierfür sind Cancer-Associated Fibroblasts (kurz CAFs). Diese wurden von Ao et al. durch Mikrofiltration aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen mit evidenten Fernmetastasen angereichert, ihre Präsenz konnte metastatische von lokal begrenzten Tumoren unterscheiden (Ao et al., 2015). Ein anderes Beispiel sind Cancer-Associated Macrophage-like Cells (Mu et al., 2017).

Neben den zellulären Bestandteilen einer Liquid Biopsy gewinnt auch die zirkulierende TumordNA (ctDNA) zunehmend an Bedeutung. Einer Ihrer zahlreichen Vorteile ist ihre Aussagekraft bereits in niedrigem Tumorstadium (Heitzer et al., 2017).

Trotz großer Fortschritte im Bereich der Liquid Biopsy-Forschung steht diese Methode gemessen an ihrem Potenzial noch am Anfang. Die Einsatzmöglichkeiten sind zahlreich und ihr Stellenwert in der Onkologie wird in Zukunft noch weiter zunehmen.

Die vorliegende Arbeit dient in diesem Zusammenhang dem weiteren Erkenntnisgewinn bezüglich zellulärer Blutbestandteile im Rahmen einer metastasierenden Tumorerkrankung. Die Mikrofiltrationsmethode, die hier beschrieben und evaluiert wurde, kann nicht nur für die Detektion zirkulierender Tumorzellen, sondern auch für verschiedene andere Zellpopulationen verwendet werden und birgt großes Potenzial auf diesem Gebiet. Die detektierten Zellen und Cluster sind eine noch näher zu charakterisierende Entdeckung. Je nach Ursprung der beschriebenen Cluster könnte ihre Präsenz im Blut Hinweis auf ein unentdecktes oder wiederkehrendes Tumorgeschehen sein. Gehen wir bei den beschriebenen Zellclustern von einem tumorendothelialen Ursprung aus, könnte die Präsenz der Cluster zum Beispiel einen Hinweis auf vermehrte Vaskularisierung im Rahmen einer Größenprogredienz des Tumors darstellen. Wie genau diese mutmaßlich endothelilalen Zellen ins Blut geraten, wäre dann Gegenstand weiterer Forschung.

6 Zusammenfassung

Die Liquid Biopsy (Flüssigbiopsie) gewinnt einen zunehmenden Stellenwert in der onkologischen Forschung und Klinik. Ein besonderes Augenmerk in diesem Zusammenhang liegt auf zirkulierenden Tumorzellen.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger Mikrofilter zur Detektion zirkulierender Tumorzellen auf seine Güte getestet. Besagter Filter zeichnet sich durch eine gleichmäßige Größe und Verteilung seiner Poren aus. Weiterhin wurde mithilfe dieses Filters nach Etablierung eines maßgeschneiderten Aufarbeitungsprotokolls das Blut von Krebspatientinnen auf zirkulierende Tumorzellen und Tumorzellcluster untersucht und diese weiter charakterisiert.

Dazu wurde das Blut von 35 Patientinnen mit bereits metastasiertem Mammakarzinom auf zirkulierende Tumorzellen und Zellcluster untersucht. Diese wurden anschließend mit fluorochrommarkierten Antikörpern hinsichtlich der Präsenz von epithelialen und mesenchymalen Oberflächenantigenen untersucht. Dabei wurden bei 9 von 35 Patientinnen zirkulierende Tumorzellen gefunden, die epitheliale Marker, wie EpCAM, exprimieren. Bei 15 der 35 Patientinnen wurden zirkulierende Zellen und Zellcluster mit starker Expression mesenchymaler Marker nachgewiesen. In Größe, Form und Anzahl waren die Zellcluster heterogen.

Um der Frage nachzugehen, ob diese Cluster tatsächlich aus Tumorzellen bestehen, wurde eine molekulargenetische Analyse zur Bestimmung der Copy Number Aberrations (CNAs) durchgeführt. Diese ergab weder für epitheliale noch für die mesenchymalen CTCs ein patientinnenspezifisches CNA-Muster, das auf einen Tumorsprung zweifelsfrei hinweisen würden.

Weiterhin wurden Überlebenszeitanalysen des progressionsfreien Überlebens für die Präsenz von epithelialen und mesenchymalen CTCs angefertigt. In beiden Fällen konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Präsenz von CTCs und der Überlebenswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden.

So bleibt die Frage nach dem Ursprung der Cluster zum Abschluss dieser Arbeit unbeantwortet. Es ist sowohl ein Tumorzell- als auch ein Tumor-endothelialer Ursprung denkbar. Derzeit laufende Anschlussversuche sollen eine Antwort auf die Frage geben.

7 Literaturverzeichnis

- Aceto N, Bardia, A, Miyamoto, D T, Donaldson, M C, Wittner, B S, Spencer, J A, Yu, M, Pely, A, Engstrom, A, Zhu, H, Brannigan, B W, Kapur, R, Stott, S L, Shioda, T, Ramaswamy, S, Ting, D T, Lin, C P, Toner, M, Haber, D A, undMaheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158(5), 1110–1122.
- Aceto N, Toner, M, Maheswaran, S, undHaber, D A. (2015). En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Cancer*, 1(1), 44-52.
- Adams D L, Zhu, P, Makarova, O V, Martin, S S, Charpentier, M, Chumsri, S, Li, S, Amstutz, P, undTang, C M. (2014). The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters. *RSC Adv*, 9, 4334-4342.
- Alix-Panabières C, Mader, S, undPantel, K. (2017). Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95(2), 133–142.
- Alix-Panabieres C, undPantel, K. (2013). Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*, 59(1), 110-118.
- Alix-Panabieres C, undPantel, K. (2016). Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov*, 6(5), 479-491.
- Alix-Panabières C, undPantel, K. (2014). Challenges in circulating tumour cell research. *Nature reviews. Cancer*, 14(9), 623–631.
- Ao Z, Shah, S H, Machlin, L M, Parajuli, R, Miller, P C, Rawal, S, Williams, A J, Cote, R J, Lippman, M E, Datar, R H, undEl-Ashry, D. (2015). Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*, 75(22), 4681-4687.
- Baldacchino S, undGrech, G. (2020). Somatic copy number aberrations in metastatic patients: The promise of liquid biopsies. *Semin Cancer Biol*, 60, 302-310.
- Balic M, Dandachi, N, Hofmann, G, Samonigg, H, Loibner, H, Obwaller, A, van der Kooi, A, Tibbe, A G, Doyle, G V, Terstappen, L W, undBauernhofer, T. (2005). Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom*, 68(1), 25-30.
- Bardelli A, undPantel, K. (2017). Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*, 31(2), 172-179.
- Barnes B (Ed.) (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres, C, undPantel, K. (2012). Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 673-687.
- Bertolini F, Shaked, Y, Mancuso, P, undKerbel, R S. (2006). The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*, 6(11), 835-845.
- Bidard F C, Michiels, S, Riethdorf, S, Mueller, V, Esserman, L J, Lucci, A, Naume, B, Horiguchi, J, Gisbert-Criado, R, Sleijfer, S, Toi, M, Garcia-Saenz, J A, Hartkopf, A, Generali, D, Rothe, F, Smerage, J, Muinelo-Romay, L, Stebbing, J, Viens, P, Magbanua, M J M, Hall, C S, Engebraaten, O, Takata, D, Vidal-Martinez, J, Onstenk, W, Fujisawa, N, Diaz-Rubio, E, Taran, F A, Cappelletti, M R, Ignatiadis, M, Proudhon, C, Wolf, D M, Bauldry, J B, Borgen, E, Nagaoka, R, Caranana, V, Kraan, J, Maestro, M, Brucker, S Y, Weber, K, Reyat, F, Amara, D, Karhade, M G, Mathiesen, R R, Tokiniwa, H, Llombart-Cussac, A, Meddis, A, Blanche, P, d'Hollander, K, Cottu, P, Park, J W,

- Loibl, S, Latouche, A, Pierga, J Y, und Pantel, K. (2018). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*.
- Brooks M D, Burness, M L, und Wicha, M S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*, 17(3), 260-271.
- Chaffer C L, und Weinberg, R A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564.
- Cheung K J, Padmanaban, V, Silvestri, V, Schipper, K, Cohen, J D, Fairchild, A N, Gorin, M A, Verdone, J E, Pienta, K J, Bader, J S, und Ewald, A J. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(7), E854-863.
- Cima I, Kong, S L, Sengupta, D, Tan, I B, Phyo, W M, Lee, D, Hu, M, Iliescu, C, Alexander, I, Goh, W L, Rahmani, M, Suhaimi, N-A M, Vo, J H, Tai, J A, Tan, J H, Chua, C, Ten, R, Lim, W J, Chew, M H, Hauser, C A E, van Dam, R M, Lim, W-Y, Prabhakar, S, Lim, B, Koh, P K, Robson, P, Ying, J Y, Hillmer, A M, und Tan, M-H. (2016). Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer. *Science translational medicine*, 8(345), 345ra389.
- Coates A S, Winer, E P, Goldhirsch, A, Gelber, R D, Gnant, M, Piccart-Gebhart, M, Thurlimann, B, Senn, H J, und Panel, M. (2015). Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*, 26(8), 1533-1546.
- Cohen S J, Punt, C J, Iannotti, N, Saidman, B H, Sabbath, K D, Gabrail, N Y, Picus, J, Morse, M, Mitchell, E, Miller, M C, Doyle, G V, Tissing, H, Terstappen, L W, und Meropol, N J. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26(19), 3213-3221.
- Cristofanilli M, Broglio, K R, Guarneri, V, Jackson, S, Fritsche, H A, Islam, R, Dawood, S, Reuben, J M, Kau, S W, Lara, J M, Krishnamurthy, S, Ueno, N T, Hortobagyi, G N, und Valero, V. (2007). Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer*, 7(6), 471-479.
- Cristofanilli M, Hayes, D F, Budd, G T, Ellis, M J, Stopeck, A, Reuben, J M, Doyle, G V, Matera, J, Allard, W J, Miller, M C, Fritsche, H A, Hortobagyi, G N, und Terstappen, L W M M. (2005). Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(7), 1420-1430.
- de Bono J S, Scher, H I, Montgomery, R B, Parker, C, Miller, M C, Tissing, H, Doyle, G V, Terstappen, L W, Pienta, K J, und Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 14(19), 6302-6309.
- de Wit S, Rossi, E, Weber, S, Tamminga, M, Manicone, M, Swennenhuis, J F, Groothuis-Oudshoorn, C G M, Vidotto, R, Facchinetti, A, Zeune, L L, Schuurin, E, Zamarchi, R, Hiltermann, T J N, Speicher, M R, Heitzer, E, Terstappen, L, und Groen, H J M. (2019). Single tube liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 144(12), 3127-3137.
- de Wit S, van Dalum, G, Lenferink, A T, Tibbe, A G, Hiltermann, T J, Groen, H J, van Rijn, C J, und Terstappen, L W. (2015). The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells. *Sci Rep*, 5, 12270.
- DeSantis C E, Ma, J, Goding Sauer, A, Newman, L A, und Jemal, A. (2017). Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin*, 67(6), 439-448.
- Drukker C A, Schmidt, M K, Rutgers, E J, Cardoso, F, Kerlikowske, K, Esserman, L J, van Leeuwen, F E, Pijnappel, R M, Slaets, L, Bogaerts, J, und Van't Veer, L J. (2014). Mammographic

screening detects low-risk tumor biology breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 144(1), 103-111.

Fidler I J. (1973). The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. *Eur J Cancer*, 9(3), 223-227.

Fidler I J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 453-458.

Fischer K R, Durrans, A, Lee, S, Sheng, J, Li, F, Wong, S T, Choi, H, El Rayes, T, Ryu, S, Troeger, J, Schwabe, R F, Vahdat, L T, Altorki, N K, Mittal, V, undGao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579), 472-476.

Genna A, Vanwynsberghe, A M, Villard, A V, Pottier, C, Ancel, J, Polette, M, undGilles, C. (2020). EMT-Associated Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: Sticky Friends on the Road to Metastasis. *Cancers (Basel)*, 12(6).

Giuliano M, Shaikh, A, Lo, H C, Arpino, G, De Placido, S, Zhang, X H, Cristofanilli, M, Schiff, R, undTrivedi, M V. (2018). Perspective on Circulating Tumor Cell Clusters: Why It Takes a Village to Metastasize. *Cancer Res*, 78(4), 845-852.

Griffith O L, undGray, J W. (2011). 'Omic approaches to preventing or managing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 13(6), 230.

Gupta G P, undMassague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695.

Heitzer E, Perakis, S, Geigl, J B, undSpeicher, M R. (2017). The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *NPJ Precis Oncol*, 1(1), 36.

Hong Y, Fang, F, undZhang, Q. (2016). Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *International journal of oncology*, 49(6), 2206–2216.

Hong Y, Fang, F, undZhang, Q. (2016). Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*, 49(6), 2206-2216.

Hong Y, Li, Z, undZhang, Q. (2016). A circulating tumor cell cluster-based model for tumor metastasis (Hypothesis). *Oncol Lett*, 12(6), 4891-4895.

Hou H W, Warkiani, M E, Khoo, B L, Li, Z R, Soo, R A, Tan, D S, Lim, W T, Han, J, Bhagat, A A, undLim, C T. (2013). Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep*, 3, 1259.

Hou J-M, Krebs, M G, Lancashire, L, Sloane, R, Backen, A, Swain, R K, Priest, L J C, Greystoke, A, Zhou, C, Morris, K, Ward, T, Blackhall, F H, undDive, C. (2012). Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(5), 525–532.

Huebner H, Fasching, P A, Gumbrecht, W, Jud, S, Rauh, C, Matzas, M, Paulicka, P, Friedrich, K, Lux, M P, Volz, B, Gass, P, Haberle, L, Meier-Stiegen, F, Hartkopf, A, Neubauer, H, Almstedt, K, Beckmann, M W, Fehm, T N, undRuebner, M. (2018). Filtration based assessment of CTCs and CellSearch(R) based assessment are both powerful predictors of prognosis for metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*, 18(1), 204.

Hvichia G E, Parveen, Z, Wagner, C, Janning, M, Quidde, J, Stein, A, Muller, V, Loges, S, Neves, R P, Stoecklein, N H, Wikman, H, Riethdorf, S, Pantel, K, undGorges, T M. (2016). A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer*, 138(12), 2894-2904.

- Jansson S, Bendahl, P O, Larsson, A M, Aaltonen, K E, und Ryden, L. (2016). Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer*, 16, 433.
- Josse S A, Gorges, T M, und Pantel, K. (2015). Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*, 7(1), 1-11.
- Josse S A, Hannemann, J, Spotter, J, Bauche, A, Andreas, A, Muller, V, und Pantel, K. (2012). Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*, 18(4), 993-1003.
- Josse S A, und Pantel, K. (2013). Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer research*, 73(1), 8–11.
- Kalluri R, und Neilson, E G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1776–1784.
- Kang Y, und Pantel, K. (2013). Tumor cell dissemination: Emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer cell*, 23(5), 573–581.
- Labelle M, Begum, S, und Hynes, R O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*, 20(5), 576-590.
- Lampignano R, Yang, L, Neumann, M H D, Franken, A, Fehm, T, Niederacher, D, und Neubauer, H. (2017). A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAM(high) and EpCAM(low/negative) CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 18(9).
- Laubli H, Stevenson, J L, Varki, A, Varki, N M, und Borsig, L. (2006). L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res*, 66(3), 1536-1542.
- Ledford H. (2011). Cancer theory faces doubts. *Nature*, 472(7343), 273.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft D K, AWMF). (Version 4.3, 2020). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
- Lenk C, Biller-Andorno, N, Alt-Epping, B, Anders, M, und Wiesemann, C. (2005). [Ethics and diagnosis related groups]. *Dtsch Med Wochenschr*, 130(27), 1653-1655.
- Lianidou E, und Pantel, K. (2019). Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer*, 58(4), 219-232.
- Lin H K, Zheng, S, Williams, A J, Balic, M, Groshen, S, Scher, H I, Fleisher, M, Stadler, W, Datar, R H, Tai, Y C, und Cote, R J. (2010). Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*, 16(20), 5011-5018.
- Lin P P, Gires, O, Wang, D D, Li, L, und Wang, H. (2017). Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells. *Sci Rep*, 7(1), 9789.
- Liotta L A, Kleinerman, J, und Saidel, G M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 34(5), 997-1004.
- Liotta L A, Saidel, M G, und Kleinerman, J. (1976). The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res*, 36(3), 889-894.
- Mani S A, Guo, W, Liao, M-J, Eaton, E N, Ayyanan, A, Zhou, A Y, Brooks, M, Reinhard, F, Zhang, C C, Shipitsin, M, Campbell, L L, Polyak, K, Brisken, C, Yang, J, und Weinberg, R A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715.

Mavaddat N, Antoniou, A C, Easton, D F, undGarcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol*, 4(3), 174-191.

Mego M, Gao, H, Lee, B N, Cohen, E N, Tin, S, Giordano, A, Wu, Q, Liu, P, Nieto, Y, Champlin, R E, Hortobagyi, G N, Cristofanilli, M, Ueno, N T, undReuben, J M. (2012). Prognostic Value of EMT-Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients Undergoing High-Dose Chemotherapy with Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Cancer*, 3, 369-380.

Meng S, Tripathy, D, Frenkel, E P, Shete, S, Naftalis, E Z, Huth, J F, Beitsch, P D, Leitch, M, Hoover, S, Euhus, D, Haley, B, Morrison, L, Fleming, T P, Herlyn, D, Terstappen, L W, Fehm, T, Tucker, T F, Lane, N, Wang, J, undUhr, J W. (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10(24), 8152-8162.

Micalizzi D S, Maheswaran, S, undHaber, D A. (2017). A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev*, 31(18), 1827-1840.

Mu Z, Wang, C, Ye, Z, Rossi, G, Sun, C, Li, L, Zhu, Z, Yang, H, undCristofanilli, M. (2017). Prognostic values of cancer associated macrophage-like cells (CAML) enumeration in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 165(3), 733-741.

Murlidhar V, Reddy, R M, Fouladdel, S, Zhao, L, Ishikawa, M K, Grabauskiene, S, Zhang, Z, Lin, J, Chang, A C, Carrott, P, Lynch, W R, Orringer, M B, Kumar-Sinha, C, Palanisamy, N, Beer, D G, Wicha, M S, Ramnath, N, Azizi, E, undNagrath, S. (2017). Poor Prognosis Indicated by Venous Circulating Tumor Cell Clusters in Early-Stage Lung Cancers. *Cancer Res*, 77(18), 5194-5206.

Nguyen D X, Bos, P D, undMassagué, J. (2009). Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews. Cancer*, 9(4), 274–284.

Nieto M A, Huang, R Y-J, Jackson, R A, undThiery, J P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.

Pagani O, Senkus, E, Wood, W, Colleoni, M, Cufer, T, Kyriakides, S, Costa, A, Winer, E P, Cardoso, F, undForce, E-M T. (2010). International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst*, 102(7), 456-463.

Paget S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 8(2), 98-101.

Pantel K, undAlix-Panabieres, C. (2007). The clinical significance of circulating tumor cells. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(2), 62-63.

Pantel K, undAlix-Panabieres, C. (2010). Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*, 16(9), 398-406.

Pantel K, undAlix-Panabieres, C. (2012). The potential of circulating tumor cells as a liquid biopsy to guide therapy in prostate cancer. *Cancer Discov*, 2(11), 974-975.

Pantel K, undAlix-Panabieres, C. (2013). Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res*, 73(21), 6384-6388.

Paoletti C, Cani, A K, Larios, J M, Hovelson, D H, Aung, K, Darga, E P, Cannell, E M, Baratta, P J, Liu, C J, Chu, D, Yazdani, M, Blevins, A R, Sero, V, Tokudome, N, Thomas, D G, Gersch, C, Schott, A F, Wu, Y M, Lonigro, R, Robinson, D R, Chinnaiyan, A M, Bischoff, F Z, Johnson, M D, Park, B H, Hayes, D F, Rae, J M, undTomlins, S A. (2018). Comprehensive Mutation and Copy Number Profiling in Archived Circulating Breast Cancer Tumor Cells Documents Heterogeneous Resistance Mechanisms. *Cancer Res*, 78(4), 1110-1122.

Pillai S G, Zhu, P, Siddappa, C M, Adams, D L, Li, S, Makarova, O V, Amstutz, P, Nunley, R, Tang, C M, Watson, M A, undAft, R L. (2017). Enrichment and Molecular Analysis of Breast Cancer Disseminated Tumor Cells from Bone Marrow Using Microfiltration. *PLoS One*, 12(1), e0170761.

Rack B, Schindlbeck, C, Juckstock, J, Andergassen, U, Hepp, P, Zwingers, T, Friedl, T W, Lorenz, R, Tesch, H, Fasching, P A, Fehm, T, Schneeweiss, A, Lichtenegger, W, Beckmann, M W, Friese, K, Pantel, K, Janni, W, undGroup, S S. (2014). Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 106(5).

Rao C G, Chianese, D, Doyle, G V, Miller, M C, Russell, T, Sanders, R A, Jr., undTerstappen, L W. (2005). Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol*, 27(1), 49-57.

Rea D, undFrancis, A. (2014). Breast screening saves lives: now is the time to address overtreatment. *J Comp Eff Res*, 3(2), 111-113.

Riethdorf S, Muller, V, Loibl, S, Nekljudova, V, Weber, K, Huober, J, Fehm, T, Schrader, I, Hilfrich, J, Holms, F, Tesch, H, Schem, C, von Minckwitz, G, Untch, M, undPantel, K. (2017). Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells for Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant "Geparquattro" Trial. *Clin Cancer Res*, 23(18), 5384-5393.

Santamaria P G, Moreno-Bueno, G, undCano, A. (2019). Contribution of Epithelial Plasticity to Therapy Resistance. *J Clin Med*, 8(5).

Sarioglu A F, Aceto, N, Kojic, N, Donaldson, M C, Zeinali, M, Hamza, B, Engstrom, A, Zhu, H, Sundaresan, T K, Miyamoto, D T, Luo, X, Bardia, A, Wittner, B S, Ramaswamy, S, Shioda, T, Ting, D T, Stott, S L, Kapur, R, Maheswaran, S, Haber, D A, undToner, M. (2015). A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat Methods*, 12(7), 685-691.

Shibue T, undWeinberg, R A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(10), 611-629.

Singletary S E. (2003). Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*, 237(4), 474-482.

Sinn H P, undKreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*, 8(2), 149-154.

Sollier E, Go, D E, Che, J, Gossett, D R, O'Byrne, S, Weaver, W M, Kummer, N, Rettig, M, Goldman, J, Nickols, N, McCloskey, S, Kulkarni, R P, undDi Carlo, D. (2014). Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology. *Lab Chip*, 14(1), 63-77.

Stratton M R, undRahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet*, 40(1), 17-22.

Suhail Y, Cain, M P, Vanaja, K, Kurywchak, P A, Levchenko, A, Kalluri, R, undKshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*, 9(2), 109-127.

Theil G, Fischer, K, Weber, E, Medek, R, Hoda, R, Lucke, K, undFornara, P. (2016). The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes - A Proof-of-Concept Study. *PLoS One*, 11(8), e0158354.

Thiery J P, Acloque, H, Huang, R Y, undNieto, M A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890.

Thompson S C. (1974). The colony forming efficiency of single cells and cell aggregates from a spontaneous mouse mammary tumour using the lung colony assay. *Br J Cancer*, 30(4), 332-336.

Varga Z, Diebold, J, Dommann-Scherrer, C, Frick, H, Kaup, D, Noske, A, Obermann, E, Ohlschlegel, C, Padberg, B, Rakozy, C, Sancho Oliver, S, Schobinger-Clement, S, Schreiber-Facklam, H, Singer, G, Tapia, C, Wagner, U, Mastropasqua, M G, Viale, G, undLehr, H A. (2012). How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS One*, 7(5), e37379.

- Vićovac L, undAplin, J D. (1996). Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta anatomica*, 156(3), 202–216.
- Watanabe S. (1954). The metastasizability of tumor cells. *Cancer*, 7(2), 215–223.
- Weis J, undDomann, U. (2006). [Interventions in the rehabilitation of breast cancer patients--a critical literature review of the state of the art]. *Rehabilitation (Stuttg)*, 45(3), 129-145.
- Yu M, Bardia, A, Wittner, B S, Stott, S L, Smas, M E, Ting, D T, Isakoff, S J, Ciciliano, J C, Wells, M N, Shah, A M, Concannon, K F, Donaldson, M C, Sequist, L V, Brachtel, E, Sgroi, D, Baselga, J, Ramaswamy, S, Toner, M, Haber, D A, undMaheswaran, S. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6119), 580–584.
- Zhang D, Zhao, L, Zhou, P, Ma, H, Huang, F, Jin, M, Dai, X, Zheng, X, Huang, S, undZhang, T. (2017). Circulating tumor microemboli (CTM) and vimentin+ circulating tumor cells (CTCs) detected by a size-based platform predict worse prognosis in advanced colorectal cancer patients during chemotherapy. *Cancer Cell Int*, 17, 6.
- Zhang L, Riethdorf, S, Wu, G, Wang, T, Yang, K, Peng, G, Liu, J, undPantel, K. (2012). Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20), 5701–5710.
- Zheng X, Carstens, J L, Kim, J, Scheible, M, Kaye, J, Sugimoto, H, Wu, C C, LeBleu, V S, undKalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525-530.

8 Thesen

1. Mithilfe des CellSieve™ Microfilters sind zirkulierende Tumorzellen aus dem Blut von PatientInnen mit metastasierter Erkrankung isolierbar.
2. Für die Detektion tumorstämmiger Zellen und Cluster ist es sinnvoll, neben epithelialen auch mesenchymale Oberflächenantigene ins Visier zu nehmen.
3. Tumorstämmige Zellcluster lassen sich mithilfe des CellSieve™ Microfilters aus dem Blut von PatientInnen mit metastasierter Krebserkrankung isolieren.
4. Der CellSieve™ Microfilter ist anderen CTC-Detektionsmethoden in mehreren Hinsichten überlegen. Das erklärt sich zum einen durch die Breite der Zellpopulationen, die durch den Filter potentiell aus dem Blut extrahiert werden können, und zum anderen durch die Tatsache, dass diese Methode nicht auf einzelne Antikörper zur Charakterisierung der angereicherten Zellen festgelegt ist.

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den 01.12.2020

Paula Maria Bergengruen

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 01.12.2020

Paula Maria Bergengruen