

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN UND THERAPIEVERFAHREN
PROF. DR. CHRISTOPH KLEIN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON EPCAM-POSITIVEN
ZELLEN BEI BRUSTKREBS- UND KONTROLLPATIENTINNEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Theresa Damböck

2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN UND THERAPIEVERFAHREN
PROF. DR. CHRISTOPH KLEIN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON EPCAM-POSITIVEN
ZELLEN BEI BRUSTKREBS- UND KONTROLLPATIENTINNEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Theresa Damböck

2022

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung

Prof. Dr. Dirk Hellwig

Prof. Dr. Christoph Klein

PD Dr. Stephan Seitz

21.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 Brustkrebs – Epidemiologie	13
1.2 Klassifikation und Therapie	14
1.3 Metastasen	15
1.4 Minimale Resterkrankung	16
1.5 Detektion von disseminierten Tumorzellen	18
1.6 Funktion und Vorkommen von EpCAM.....	20
1.7 Zielsetzung	21
2 Materialien	23
2.1 Knochenmarkproben	23
2.1.1 Kooperationspartner	23
2.1.2 Gewinnung und Transport der Proben	23
2.1.3 Ethik	24
2.2 Reagenzien	24
2.2.1 Chemikalien und kommerzielle Lösungen.....	24
2.2.2 Selbstangesetzte Puffer und Lösungen.....	28
2.2.3 Enzyme.....	30
2.2.4 Antikörper und Microbeads	30
2.2.5 Oligonukleotide und Primer	32
2.2.6 Kommerzielle Kits	33
2.3 Zellkultur.....	34
2.3.1 Zelllinien	34
2.3.2 Kulturmedien.....	35
2.4 Verbrauchsmaterialien	35
2.5 Geräte	37
2.6 Softwares und Datenbanken.....	38
3 Methoden.....	40

3.1	Aufarbeitung von primären humanen Proben	40
3.1.1	Aufarbeitung von Knochenmarkproben.....	40
3.1.2	Immunzytochemie	42
3.1.2.1	Färbung mit EpCAM.....	42
3.1.2.2	Doppelfärbung mit CD27 und CD319	42
3.1.2.3	Zellisolation der EpCAM ^{high} Zellen	43
3.2	Amplifikation des Transkriptoms (WTA).....	44
3.3	Qualitätskontrolle der Amplifikation des Transkriptoms.....	46
3.4	Agarose Gelelektrophorese	47
3.5	Reamplifikation der WTA-Produkte und Qualitätskontrolle	47
3.5.1	Reamplifikation	47
3.5.2	Qualitätskontrolle	48
3.6	Aufreinigung und Konzentrationsmessung von WTA-Proben	48
3.7	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	49
3.8	RNA-Sequenzierung	50
3.8.1	Library Preparation vor März 2012.....	50
3.8.2	Library Preparation nach März 2012	52
3.8.3	Sequenzierung der Proben.....	53
3.9	Konzentrationsmessung und Qualitätskontrolle der Proben	53
3.9.1	Konzentrationsmessung durch Qubit	53
3.9.2	Analyse mit Bioanalyser	53
3.10	Zellkultur.....	54
3.10.1	Allgemeine Zellkultur	54
3.10.2	Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien.....	55
3.10.2.1	Durchflusszytometrie von Zelllinien.....	55
3.10.2.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	56
3.10.3	Spike-in-Versuch.....	57
3.11	Durchflusszytometrie	58
3.11.1	Erstellung von Kontrollen und Kompensationen	58
3.11.2	Färbung der Proben	59
3.11.3	Analyse.....	60
3.12	Statistische Tests und Bioinformatik.....	61
3.12.1	Statistische Tests	61
3.12.2	Bioinformatik	62

4	Ergebnisse	63
4.1	Patientenkollektiv	63
4.2	Charakterisierung der EpCAM ^{high} Zellen anhand des Transkriptom	64
4.2.1	Clusteranalyse von EpCAM ^{high} Zellen.....	65
4.2.2	Differenziell exprimierte Gene bei EpCAM ^{high} Zellen von Kontroll- und BrustkrebspatientInnen.....	69
4.3	Durchflusszytometrie von Knochenmarkproben.....	71
4.3.1	Entwurf und Anwendung des Panels	71
4.3.2	Einfluss der Depletion auf die Zusammensetzung des Knochenmarks	72
4.3.3	EpCAM ^{dim} Population im Knochenmark	78
4.3.3.1	Färbung ohne PE-Konjugate	79
4.3.3.2	Leukozyten- und Lymphozytenmarker in der EpCAM ⁺ Population.....	81
4.3.4	EpCAM ^{high} Population im Knochenmark	83
4.3.4.1	Spike-in Versuch zum Setzen des EpCAM ^{high} Gates.....	83
4.3.4.2	Häufigkeitsvergleich von EpCAM ^{high} Zellen in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.....	86
4.3.4.3	Population der mutmaßlichen DCCs.....	88
4.3.4.4	CD27 und CD319 bei EpCAM ^{high} Zellen	91
4.4	Doppelfärbung EpCAM und CD27 mit CD319 für das Fluoreszenz-Mikroskop ...	97
4.4.1	Auswahl der Fluorochrome	97
4.4.2	Färbung der Knochenmarkproben.....	97
4.4.3	Kontrolle der Überlappung der Fluoreszenzkanäle.....	99
4.5	Färbung von Brustkrebs- und Vorläuferzelllinien auf CD27 und CD319	101
4.5.1	Färbung für die Durchflusszytometrie	102
4.5.2	Färbung für die Fluoreszenz-Mikroskopie	103
5	Diskussion	105
5.1	Detektion von DCCs mittels Durchflusszytometrie.....	105
5.2	Einfluss der Depletion auf die Zusammensetzung des Knochenmarks	109
5.3	EpCAM ^{dim} Zellen bei KontrollpatientInnen.....	111
5.4	Identifizierung von EpCAM ^{high} Zellen bei KontrollpatientInnen als Plasmazellen.....	114
5.5	CD27 und CD319 als Marker für NCCs	117
5.6	Limitationen der Arbeit	119
6	Zusammenfassung	121
7	Literaturverzeichnis.....	122

8	Anhang	133
8.1	Klassifikation der Brustkrebserkrankung.....	133
8.2	RNA-Sequenzierung	135
8.3	Zusammensetzung der EpCAM ^{dim} Population.....	136
9	Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über den Standard-Workflow der Knochenmarkproben.	40
Abbildung 2 Gating-Strategie für Knochenmarkproben.	61
Abbildung 3 Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) Cluster von EpCAM ^{high} Einzelzellen.	65
Abbildung 4 Analyse der Transkriptomdaten von EpCAM ^{high} Zellen mithilfe der Microenvironment Cell Populations-counter Methode (MCP-counter).	66
Abbildung 5 Expression des Plasmazellmarkers MZB1 in den Clustern gemäß UMAP.	67
Abbildung 6 Expression der Marker mit hoher Expression in putativen DCCs.	68
Abbildung 7 Expression der Marker mit hoher Expression in putativen DCCs in normalen Brustepithelzellen.	69
Abbildung 8 Differenziell exprimierte Gene von integralen Membrankomponenten zwischen NCCs und DCCs.	70
Abbildung 9 Änderung der Anzahl der mononukleären Zellen und Erythrozyten bei Kontroll- und KrebspatientInnen durch die Depletion.	73
Abbildung 10 Einfluss der Depletion auf den Isotyp.	74
Abbildung 11 Auswirkung der Depletion auf die Zusammensetzung des Knochenmarks.	76
Abbildung 12 Veränderung des Anteils der CD45-negativen Zellen durch die Depletion.	77
Abbildung 13 EpCAM ^{dim} Population eines Kontrollpatienten.	78
Abbildung 14 Färbung mit und ohne PE-Konjugate.	80
Abbildung 15 EpCAM ^{dim} Population und Koexpression mit Immunmarkern.	82
Abbildung 16 Spike-in-Versuch zum Setzen des EpCAM ^{high} Gates.	84
Abbildung 17 EpCAM ^{high} Gate bei einer Knochenmarkprobe und bei Prostata- Krebszelllinien.	85
Abbildung 18 Anteil der EpCAM ^{high} Zellen in Prozent bei Krebs- und KontrollpatientInnen nach Depletion.	86
Abbildung 19 Korrelation der Anzahl der EpCAM ^{high} Zellen in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.	87
Abbildung 20 Anzahl der EpCAM ^{high} Zellen pro 1 Million MNZ in der Fluoreszenzmikroskopie (FZM) und Durchflusszytometrie (DZM).	88
Abbildung 21 Anteil der CD45-negativen Zellen an allen EpCAM ^{high} Zellen.	89
Abbildung 22 Veränderung des Anteils der EpCAM ^{high} durch die Depletion bei KrebspatientInnen.	90

Abbildung 23 Veränderung des Anteils der EpCAM ^{high} Zellen durch die Depletion bei KontrollpatientInnen.	91
Abbildung 24 Verwendete Gates und Vorgehen bei der Analyse der EpCAM ^{high} Zellen.....	93
Abbildung 25 Anteil der CD27- und CD319-positiven Zellen an den EpCAM ^{high} Zellen bei Kontroll- und KrebspatientInnen.....	95
Abbildung 26 Signifikanzwerte innerhalb der Patientengruppen für unterschiedliche EpCAM ^{high} Populationen.....	96
Abbildung 27 Fotos der Immunfluoreszenzfärbung einer Knochenmarkprobe.....	98
Abbildung 28 EpCAM-positive Zelle in den verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen.	99
Abbildung 29 Ungefärbte Probe und Isotypkontrollen von MCF7.....	100
Abbildung 30 Stark EpCAM-positive Zellen in gefärbten MCF7-Proben.	101
Abbildung 31 Expression von CD319 und CD27 in Brustkrebs- und Vorläuferzellen.	103
Abbildung 32 CD319-Färbung von MCF7- und Kontrollzellen.....	104
Abbildung 33 Schritte der Differenzierung der erythropoetischen Linie im Knochenmark..	112
Abbildung 35 Differenziell exprimierte Gene zwischen NCCs und DCCs.	135
Abbildung 35 EpCAM ^{dim} Population und Koexpression mit Immunmarkern.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Liste der klinischen Kooperationspartner.	23
Tabelle 2-2 Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungen.	24
Tabelle 2-3 Liste der verwendeten selbstangestellten Puffer und Lösungen.	28
Tabelle 2-4 Liste der verwendeten Enzyme.	30
Tabelle 2-5 Liste der verwendeten Antikörper und Microbeads.	30
Tabelle 2-6 Liste der verwendeten Oligonukleotide und Primer.	32
Tabelle 2-7 Liste der verwendeten kommerziellen Kits.	33
Tabelle 2-8 Liste der verwendeten Zelllinien.	34
Tabelle 2-9 Liste der verwendeten Kulturmedien.	35
Tabelle 2-10 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	35
Tabelle 2-11 Liste der verwendeten Geräte.	37
Tabelle 2-12 Liste der verwendeten Softwares und Databases.	38
Tabelle 3-1 Verwendete Antikörper und Isotypkontrollen bei Färbung von Knochenmarkproben und Zelllinien.	43
Tabelle 3-2 Zusammensetzung der Master-Mixe für die WTA.	45
Tabelle 3-3 PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA.	46
Tabelle 3-4 PCR-Ansatz für die Qualitätskontrolle.	46
Tabelle 3-5 Programmierung für die Qualitätskontrolle.	47
Tabelle 3-6 Master-Mix für die Reamplifikation primärer WTA-Proben.	48
Tabelle 3-7 Programmierung für die Reamplifikation der primären WTA.	48
Tabelle 3-8 Ansatz für die qPCR.	50
Tabelle 3-9 Programmierung für die qPCR.	50
Tabelle 3-10 Master-Mix für die RNA-Seq-Reamplifikation vor März 2012.	51
Tabelle 3-11 Ansatz für den Verdau-Mix I.	52
Tabelle 3-12 Ansatz für den Verdau-Mix II.	52
Tabelle 3-13 Master-Mix für die RNA-Seq Reamplifikation nach März 2012.	52
Tabelle 3-14 Programmierung für die Reamplifikation nach März 2012.	53
Tabelle 3-15 Verwendete Zelllinien mit jeweiligem Medium und Anwendungsbereich.	55
Tabelle 3-16 Mengen der Komponenten bei 25 ml und 75 ml Kulturflaschen.	55
Tabelle 3-17 Verwendete Antikörper für Fluoreszenzfärbungen der Zelllinien.	56
Tabelle 3-18 Verwendete Mengen an Antikörpern und Isotyp-Kontrollen.	60
Tabelle 4-1 Verteilung der erhaltenen KMP auf die verschiedenen Patientengruppen.	63
Tabelle 4-2 Überblick über die prozessierten KMP.	64

Tabelle 4-3 Überblick über die in die RNA-Sequenzierung eingeschlossenen Zellen.	65
Tabelle 4-4 Liste der Antikörper und ihres Verwendungszwecks des großen Panels.	71
Tabelle 4-5 Überblick über die gefärbten Knochenmarkproben in Bezug auf ihren Depletionsstatus.	74
Tabelle 4-6 Anteil der doppelt positiven Zellen an der EpCAM ^{dim} Population.....	83
Tabelle 4-7 Gefärbte Zelllinien in der Durchflusszytometrie und ihre Eigenschaften.	102
Tabelle 8-1 TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.....	133
Tabelle 8-2 Stadieneinteilung nach UICC	134

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Zytokeratin
Cp	Crossing point, Schnittpunkt-Wert
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
DCC	Disseminierte Tumorzelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DZM	Durchflusszytometrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Rinderserum
FCS	Fetales Kälberserum
FZM	Fluoreszenzmikroskopie
gDNA	Genomische DNA
GO	Gene ontology
H₂O	Wasser
HS	High Sensitivity
KMP	Knochenmarkprobe
M0	Keine Metastasen
M1	Vorliegen von Metastasen
MACS	Magnetic activated cell sorting
mCGH	Microarray-based comparative genomic hybridization
MNZ	Mononukleäre Zelle
MRD	Minimale Resterkrankung
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

NCC	Nicht-Krebszelle
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PE	Phycocerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
QC	Qualitätskontrolle
qPCR	Quantitative Polymerasenkettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
TBE	Tris/Borate/EDTA
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
UICC	Union for the International Cancer Control
WGA	Whole Genome Amplification
WTA	Whole Transcriptome Amplification

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs – Epidemiologie

In Deutschland starben im Jahr 2020 105.000 Frauen an einem Krebsleiden, wobei in 17 % dieser Fälle Brustkrebs ursächlich war (Statistisches Bundesamt 2022). Damit ist Brustkrebs in Deutschland bei Frauen die Krebserkrankung, die am häufigsten zum Tode führt. Mit einem Anteil von 28 % an allen Krebserkrankungen bei Frauen ist Brustkrebs zudem die häufigste Krebserkrankung bei weiblichen Personen (Robert Koch-Institut 2010). Die Inzidenz hat sich seit 1970 mehr als verdoppelt und sich nun auf einem hohen Niveau stabilisiert. Dieser Anstieg wird auf mehrere Gründe zurückgeführt. Eine wesentliche Ursache ist die demographische Alterung der Bevölkerung sowie eine Veränderung des Lebensstils. Hierbei ist unter anderem das steigende Alter der Frau bei der ersten Geburt zu nennen, veränderte Bewegungs- und Ernährungsgewohnheiten sowie die Einnahme von Hormonpräparaten (Robert Koch-Institut 2016). Entsprechend ist die Brustkrebsinzidenz in Ländern mit hohem Entwicklungsstand höher als in Ländern mit geringerem Entwicklungsindex (Huang et al. 2021). Daneben ist die steigende Inzidenz auch auf sensitivere Diagnostikmöglichkeiten zurückzuführen (Robert Koch-Institut 2016). Zu diesen zählt das von 2005 bis 2009 eingeführte Mammographie-Screening für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren (Leitlinienprogramm Onkologie 2021). In dieser Altersgruppe treten 45 % der Brustkrebs-Neuerkrankungen auf (Robert Koch-Institut 2016). Die ersten Auswirkungen des Screenings sind bereits zu erkennen. So wurden in der gescreenten Altersgruppe zehn Jahre nach Einführung des Programmes ca. ein Viertel weniger fortgeschrittene Tumore der Stadien III und IV detektiert als zuvor (Katalinic et al. 2019). Auch eine Abnahme der krankheitsspezifischen Mortalität durch die Mammographie konnte in den gescreenten Altersgruppen detektiert werden (Waldmann et al. 2021). Die altersstandardisierte Mortalitätsrate durch Brustkrebs sank bereits vor Einführung des Mammographie-Screenings seit Mitte der 1990er Jahre kontinuierlich. Während die 5-Jahres-Überlebensrate zu Beginn der 1980er Jahre noch 69 % betrug (Robert Koch-Institut 2010), lag sie 2013 bei 88 % (Robert Koch-Institut 2016; Statistisches Bundesamt 2019).

Für die Entstehung der Erkrankung sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. Es konnten Gene identifiziert werden, die bei vorliegender Mutation zu einer signifikanten Erhöhung des Brustkrebsrisikos führen (Breast Cancer Association Consortium 2021). Bei 5-7 % der Brustkrebsfälle liegt außerdem ein familiäres Brust- und Eierstockkrebs-Syndrom vor. Ursächlich ist hierfür meist eine Mutation in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2*. Die Wahrscheinlichkeit bei diesen Mutationsträgerinnen beträgt 50-80 %, dass sie an Brustkrebs erkranken (Roy et al. 2011).

Des Weiteren sind endokrine Einflüsse auf die Brustkrebsentstehung nachgewiesen. Dabei geht eine längere Zeitspanne der Exposition weiblicher Geschlechtshormone mit erhöhtem Risiko einher (Rhiem und Schmutzler 2015; Tin Tin et al. 2021). So besteht eine positive Korrelation zwischen frühem Auftreten der ersten Menarche bzw. spätem Eintreten der Menopause und der Entstehungswahrscheinlichkeit von Brustkrebs (Ritte et al. 2013). Es gibt Hinweise, dass auch eine postmenopausale Hormonersatztherapie dieses Risiko steigert (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2019). Es sind zahlreiche weitere Risikofaktoren für Brustkrebs bekannt, wie Nikotin- und Alkohol-Abusus sowie Adipositas (Rhiem und Schmutzler 2015).

1.2 Klassifikation und Therapie

Entsprechend der TNM-Klassifikation wird ein Staging der an Brustkrebs erkrankten Patientinnen vorgenommen, das in Tabelle 8-1 im Anhang zusammengefasst ist. Hier erfolgt zum einen eine Einordnung gemäß der Ausdehnung und des Verhaltens des Primärtumors (T). Relevant sind dabei die Durchdringung der Basalmembran, die absoluten Maße des Tumors und seine direkte Ausdehnung auf umliegende Strukturen. Dabei nimmt mit steigendem T-Wert die Tumorgöße und/oder die Infiltration des angrenzenden Gewebes zu. Zum anderen werden die regionären Lymphknoten (N) auf einen Tumorbefall hin untersucht. Beim Status N0 existieren keine befallenen Lymphknoten, ein steigender N-Wert gibt den zunehmenden Befall von Lymphknoten in Tumornähe an. Als dritter Punkt werden Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Der Status M0 entspricht dabei keinen Fernmetastasen und der Status M1 dem Vorliegen von Fernmetastasen. Anhand der TNM-Klassifikation wird der Erkrankung ein Stadium von 0-IV gemäß der *Union for the International Cancer Control (UICC)* zugeordnet (Tabelle 8-2 im Anhang), welches maßgeblich die Wahl der Therapie bestimmt (Brierley et al. 2017).

Ein kurativer Ansatz wird bis einschließlich UICC-Stadium III angestrebt. Die Grundlage der Therapie für das frühe Mammakarzinom ist die operative Entfernung des Tumors (Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Entscheidend für das Risiko eines Lokalrezidivs ist hierbei, dass die Resektionsränder frei von Tumorgewebe sind (Houssami et al. 2014). Technisch erfolgt die Operation in Form einer Mastektomie oder eines brusterhaltenden Eingriffs. Bei letzterem sollte eine nachfolgende Bestrahlung durchgeführt werden. Sind im Vorfeld befallene axilläre Lymphknoten nachgewiesen, werden diese operativ entfernt. Bei klinisch negativem Lymphknotenbefund erfolgt eine Sentinel-Lymphonodektomie. Dabei werden der bzw. die Wächterlymphknoten entfernt, um ein axilläres Staging vorzunehmen.

Zusätzlich zur Operation stehen verschiedene neoadjuvante und adjuvante systemische Therapieoptionen zur Auswahl. Die Therapieentscheidung zur Systemtherapie ist dabei unter anderem abhängig von dem Stadium und Grading der Erkrankung, der Rezeptorenzusammensetzung des Tumors sowie von Alter und Menopausenstatus der Patientin. Aktuell gibt es hierbei beispielsweise die Möglichkeit der Chemotherapie, der Antikörper- sowie Antihormontherapie in Abhängigkeit der molekularen Eigenschaften des Tumors. Bei Stadium IV, das durch das Vorliegen von Metastasen definiert ist, wird ein palliativer Therapieansatz gewählt. Hier stehen systemische Therapien und palliative Konzepte im Vordergrund (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

1.3 Metastasen

Metastasen sind Sekundärtumore, die durch Absiedelungen eines Primärtumors entstehen (Chambers et al. 2002). Über alle soliden Tumore hinweg sterben 90 % der PatientInnen an Folgen von Metastasen und nicht durch den unmittelbaren Primärtumor (Gupta und Massagué 2006). Auch bei Brustkrebs sind Metastasen die häufigste Ursache für einen tödlichen Verlauf der Erkrankung (Hagemester et al. 1980). Die Invasions-Metastasen-Kaskade beschreibt die sieben Schritte, die bis zur Bildung einer Metastase aus einem Karzinom durchlaufen werden: (1) Die lokale Invasion des Karzinoms in die umliegende extrazelluläre Matrix und Stroma-Zellen, (2) das Eintreten in das Lumen eines Blut- oder Lymphgefäßes, (3) das Überleben des Transports im Gefäß, (4) das Erreichen eines entfernten Organs, (5) das Austreten aus dem Gefäß in das Parenchym dieses Organs, (6) das Überleben in der fremden Mikroumgebung (Mikrometastase) und (7) die Wiederaufnahme des Proliferations-Programmes und Bildung einer Makrometastase (Valastyan und Weinberg 2011). Zum Zeitpunkt der Zirkulation der Krebszellen in Blut- oder Lymphgefäßen handelt es sich bei den Tumorzellen begrifflich um zirkulierende Tumorzellen (CTCs, circulating tumor cells) und beim Erreichen des Zielorgans um disseminierte Tumorzellen (disseminated cancer cells, DCCs). Während die ersten Schritte der Kaskade bis zum Austreten aus dem Gefäß in die Sekundärorgane sehr effektiv verlaufen, sind die nachfolgenden Schritte bis zur Bildung einer Metastase sehr ineffektiv (Chambers et al. 2002). So wurde experimentell beobachtet, dass zwar 82 % der injizierten Tumorzellen aus den Gefäßen austraten, aber weniger als 0,02 % dieser CTCs Makrometastasen ausbildeten. Ursächlich ist dafür zum einen das mangelnde Vermögen der Einzelzellen, Wachstum zu initiieren. Zum anderen ist die Bildung der Makrometastasen aus Mikrometastasen sehr ineffektiv. So verblieben viele Krebszellen als Einzelzellen im Zielorgan und proliferierten zu 95 % nicht (Luzzi et al. 1998).

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese geringe Effektivität der Metastasenbildung ist das Konzept der „Dormancy“, einer reversiblen Pausierung der Progression der Zelle (Aguirre-Ghiso 2007; Klein 2011). Als Ursache für Induktion und Aufhebung des Zustandes der Dormancy werden unter anderem Einflüsse der Mikroumgebung diskutiert (Sosa et al. 2014). Dies könnte auch erklären, warum bei vielen PatientInnen trotz Vorhandensein eines positiven DCC-Status kein Rezidiv oder Metastasen auftreten (Meng et al. 2004). Auch eine teilweise jahrelange Latenz zwischen Primärerkrankung und Metastasen könnten hierdurch erklärt werden (Aguirre-Ghiso 2007).

Die Metastasen des Brustkrebses zeigen präferierte Manifestationsorte. Am häufigsten finden sich Brustkrebs-Metastasen im Knochen, in der Lunge und in der Leber (Brennan und Houssami 2012). Diese organspezifische Metastasierung kann durch zwei Modelle erklärt werden. Der eine Ansatz sieht mechanische Faktoren als Ursache. Demnach würden zirkulatorische Muster ausgehend vom Primärtumor bestimmen, welches Organ zuerst und damit mit den meisten Zellen erreicht wird (Ewing 1928). Allerdings wurde gezeigt, dass bei Brustkrebs mehr Knochenmetastasen auftreten, als nach den Mustern der Blutströmung zu erwarten wären (Weiss 1992). Der zweite Ansatz zielt auf die Eigenschaften des Zielorgans ab. So würden manche Zielorgane eine besser geeignete Mikroumgebung für eine bestimmte Krebsart aufweisen als andere. Zahlreiche Einflussfaktoren der Tumor-Mikroumgebung auf die Entstehung von Metastasen konnten bisher identifiziert werden. Zu diesen zählen sowohl zelluläre Komponenten wie Immunzellen, Fibroblasten und mesenchymale Zellen, als auch extrazelluläre Bestandteile, wie Chemokine oder Wachstumsfaktoren (Werner-Klein et al. 2020; Liu et al. 2021). Im Tierversuch wurde gezeigt, dass sowohl mechanische Einflussfaktoren als auch die Einflüsse der Mikroumgebung zur organspezifischen Metastasierung beitragen (Chambers et al. 2002).

Entsprechend der häufigsten Manifestationsorte der Brustkrebs-Metastasen erfolgt die systematische Suche nach Metastasen, das Staging, durch eine Skelettszintigraphie sowie durch eine Computertomographie-Untersuchung von Abdomen und Thorax (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

1.4 Minimale Resterkrankung

Finden sich bei einer M0-Patientin auch nach der Entfernung des Primärtumors DCCs, spricht man von einer Minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD; Klein 2003). Diese DCCs sind die Begründer von Metastasen (Sosa et al. 2014) und können bei ca. 33 % der M0-Patientinnen mit Brustkrebs im Knochenmark detektiert werden (Fehm et al. 2006). Die

Frequenz dieser Zellen ist bei positiven Patientinnen mit 1-2 DCCs pro 10^6 Knochenmark-Zellen sehr gering (Riethdorf et al. 2008). Ein positiver DCC-Status geht mit einem erhöhtem Rückfall-Risiko und kürzerer Lebenserwartung einher (Hartkopf et al. 2014). Durch die DCCs kann die MRD auch nach Jahren zur Bildung von Metastasen führen. So entwickeln sich bei 30 % der Frauen, bei welchen bei Diagnosestellung ein frühes Brustkrebsstadium festgestellt wurde, ein Rezidiv der Krankheit oder Metastasen (O'Shaughnessy 2005).

Zur Entstehung und den molekularen Eigenschaften dieser DCCs gibt es zwei Modelle: Gemäß dem linearen Progressionsmodell erwerben die DCCs in einem fortgeschrittenen Primärtumor bereits ihre malignen Mutationen und disseminieren erst daraufhin. Im Zielorgan finden keine wesentlichen weiteren genetischen Mutationen mehr statt. Demnach entsprechen die Mutationen der DCCs denen des Primärtumors. Nach dem Modell der parallelen Progression beginnt die Disseminierung aus dem Primärtumor schon in einem sehr frühen Stadium, in dem die DCCs noch keine bis wenige maligne Mutationen erworben haben (Klein 2009). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich 80 % der Metastasen aus diesen früh disseminierten DCCs entwickeln (Hosseini et al. 2016). Eine somatische Progression der Tumorzellen findet laut diesem Modell anschließend im Zielorgan als Anpassungsmechanismus statt. Folglich entwickeln sich die DCCs und der Primärtumor zeitgleich – aber räumlich getrennt – was letztendlich zu unterschiedlichen Mutationen führt.

Dies hat auch therapeutische Konsequenzen: Die bisherigen an die MRD adressierten systemischen Therapien sind auf die genetischen Merkmale des Primärtumors zugeschnitten. Diese Merkmale entsprechen nach dem Modell der parallelen Progression aber nicht denen der Metastasen und ihren Vorläufern, den DCCs (Klein 2009). Dies kann zur Gabe von Systemtherapien führen, die die systemische Krebserkrankung nicht adressieren. So wurde eine Rezeptoranalyse von gepaarten Proben des primären Brusttumors und den in der Folge aufgetretenen Metastasen durchgeführt. Bei 28 % der Fälle zeigte sich dabei eine Änderung im Hormonrezeptor- oder Her2/neu-Status. Da der Status dieser Rezeptoren entscheidend für die Auswahl des Therapieregimes ist, ist deren Änderung von therapeutischer Relevanz und ein Erklärungsansatz für die nach wie vor hohe Todesrate der metastasierten Brustkrebserkrankung (Redig und McAllister 2013). Erst beim Auftreten einer manifesten Metastase kann diese biopsiert werden, um die Therapie gezielt an die systemische Erkrankung und deren molekularen Marker anzupassen. Dabei handelt es sich aber um keine kurativen Behandlungskonzepte mehr (Macfarlane et al. 2012; Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Es bestehen weitere Anhaltspunkte, die das Modell der parallelen Progression stützen. Bei der Analyse von Metastasen aus dem Sentinel Lymphknoten und den zugehörigen Primärtumoren

waren 85 % der chromosomalen Änderungen entweder auf die Metastase oder den Tumor beschränkt (Santos et al. 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass DCCs aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen weniger und andere Aberrationen als der Primärtumor aufweisen, was ebenfalls eine frühe Disseminierung der Zellen nahelegt (Schmidt-Kittler et al. 2003).

1.5 Detektion von disseminierten Tumorzellen

Die frühe Detektion von DCCs kann Patientinnen identifizieren, die ein höheres Rezidiv- und Mortalitätsrisiko aufweisen und womöglich mehr von einer adjuvanten Therapie profitieren (Hartkopf et al. 2014; Naume et al. 2014). Außerdem kann die Analyse der isolierten DCCs dazu beitragen, die biologischen Mechanismen der Metastasierung besser zu verstehen (Pantel et al. 1999). Um eine MRD zu diagnostizieren, eignen sich u.a. Proben von Lymphknoten und Knochenmark als Detektionsort von DCCs. Im Knochenmark manifestieren sich bei Brustkrebs häufig Metastasen, zudem sind Proben im Vergleich zu Proben aus Leber oder Lunge, den anderen häufigen Manifestationsorten von Metastasen, vergleichsweise einfach zu gewinnen. Es gibt verschiedene Ansätze, um DCCs in den gewonnenen Proben zu detektieren. Molekulare PCR-basierte Methoden versuchen dabei, anhand charakteristischer Mutationen der DNA oder mRNA DCCs zu detektieren. Hierbei kann jedoch keine Aussage über die Morphologie der Zellen gemacht werden. Außerdem existiert aufgrund der Heterogenität der potenziellen Mutationen keine universelle Signatur, um eine DCC eindeutig als eine solche zu klassifizieren (Pantel et al. 2009).

Eine häufig verwendete Methode zur Detektion von DCCs ist die Fluoreszenzmikroskopie (FZM), bei welcher Einzelzellen mit möglichst spezifischen Antikörpern gegen DCCs gezielt isoliert werden. Im Anschluss können molekulare Analysen dieser Einzelzellen durchgeführt werden, um die DNA oder RNA zu betrachten. Von Vorteil bei dieser Methode ist, dass die Vitalität und Morphologie der Zelle, wie beispielsweise die Kern-Plasma-Relation, beurteilt werden können (Pantel et al. 2009). Außerdem ist für diese Methode nachgewiesen, dass sich unter den Marker-positiven Zellen tatsächlich DCCs mit für die jeweilige Krebsart typischen genomischen Aberrationen finden (Gužvić et al. 2014; Irlbeck 2019). Allerdings ist diese Technik technisch anspruchsvoll, zeitaufwendig und untersucherabhängig (Klein et al. 1999; Gužvić et al. 2014; Magbanua et al. 2015).

In neueren Ansätzen wurden DCCs mittels Durchflusszytometrie (DZM) bzw. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) detektiert. Dadurch kann eine größere Menge an Zellen in kürzerer Zeit auf potenzielle DCCs gescreent werden. Außerdem ist die Auswahl der Marker-positiven Zellen nicht untersucherabhängig. Allerdings muss hier eine Schwelle für die Marker-

Positivität gesetzt werden, ab wann eine Zelle als potenzielle DCC in Frage kommt. Dies ist bisher noch nicht standardisiert. Kommen FACS- oder DZM-Geräte zum Einsatz, die keine Fotodokumentation der analysierten Zellen durchführen, kann zudem keine morphologische Aussage über die Zellen getroffen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich in den mittels FACS isolierten Pools von KrebspatientInnen Zellen mit für die jeweilige Krebsart typische genomischen Alterationen fanden (Magbanua und Park 2013; Magbanua et al. 2018; Cackowski et al. 2019).

Häufig wird dem eigentlichen Detektionsprozess eine immunomagnetische Anreicherung der potenziellen DCCs vorgeschaltet, um die Frequenz der DCCs und damit deren Detektionsrate zu erhöhen. Dies erfolgt im Rahmen einer positiven oder negativen Selektion von Zellen aus der jeweiligen Probe. Bei einer positiven Selektion mittels möglichst spezifischen Anti-DCC-Antikörpern besteht dabei das Risiko, potenzielle DCCs ohne der jeweiligen Markerausprägung zu übergehen. Bei einer negativen Selektion können hingegen fälschlicherweise DCCs aussortiert werden (Pantel et al. 2009). So ist CD45 ein häufig verwendeter Marker zur negativen Selektion, wobei allerdings in 19% der DCCs von Patienten mit Prostatakrebs zumindest das Transkript für CD45 detektiert werden konnte (Gužvić et al. 2014).

Zur Detektion von DCCs mittels FZM oder DZM müssen zunächst Marker zur Färbung definiert werden. Brustkrebs ist eine epitheliale Krebserkrankung. Da sich in Lymphknoten und Knochenmark normalerweise keine epithelialen Zellen finden, werden bei Brustkrebs als Marker für DCCs Antikörper gegen epitheliale Antigene gewählt. Zu diesen Antigenen zählen Antigene gegen epitheliale Zytokeratine (Cytoceratines, CK) sowie gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM; Schlimok et al. 1987; Klein et al. 2002). Aufgrund der Heterogenität von Krebszellen werden bei dieser Art der Detektion höchstwahrscheinlich DCCs übergangen, die keine oder geringe Expression von CK oder EpCAM haben (Klein 2013; Gužvić et al. 2014). Auch DCCs, die im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition womöglich ihre epithelialen Oberflächenmoleküle verloren haben, können anhand dieser Moleküle nicht detektiert werden (Thiery 2002; Bidard et al. 2008; Schneck et al. 2015). Außerdem sind mit EpCAM nicht alle Zellen eingeschlossen, die wahrscheinlich Brustkrebs-initiiierend sind (Keller et al. 2012).

Anti-CK-Antikörper sind von den verwendeten Markern bisher am spezifischsten und sensitivsten für die Detektion von DCCs (Pantel et al. 1999). Nur in 2 % der Proben von PatientInnen ohne bekannte epitheliale maligne Erkrankung werden CK⁺ Zellen im Knochenmark gefunden (Klein 2003). Aufgrund der notwendigen Permeabilisierung und Fixierung der Zellen kann bei der Verwendung von Anti-CK-Antikörpern allerdings keine

intakte mRNA gewonnen werden. Da es sich bei EpCAM um ein Oberflächenprotein handelt, ist hier die nachfolgende Isolierung des Transkriptoms möglich (Klein et al. 2002).

1.6 Funktion und Vorkommen von EpCAM

EpCAM ist ein Transmembranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, das in zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse eingebunden ist (Huang et al. 2018). Unter anderem kann EpCAM homophile Zell-Zellkontakte ausbilden. In den meisten gesunden Epithelien ist EpCAM dabei mit dem Adhäsionsmolekül E-Cadherin koexprimiert. Im Gegensatz zu Cadherinen handelt es sich bei EpCAM um eine relativ schwaches Adhäsionsmolekül (Schnell et al. 2013). Bei einer Koexpression kann EpCAM die durch E-Cadherin vermittelte interzelluläre Adhäsion vermindern (Litvinov et al. 1997). EpCAM kann auf diese Weise die Stärke der Zell-Zellkontakte und dadurch die Gewebsplastizität modifizieren (Schnell et al. 2013). Daneben fungiert EpCAM auch als Signalmolekül (Huang et al. 2018). Die Expression von EpCAM ist dadurch positiv mit der Proliferation und Dedifferenzierung einer Zelle korreliert (Balzar et al. 1999; Schnell et al. 2013).

EpCAM wurde ursprünglich als Tumor-assoziiertes Antigen identifiziert (Göttlinger et al. 1986; Schlimok et al. 1987; Riethmüller et al. 1994; Huang et al. 2018). Das Molekül wird aber auch von gesundem Gewebe exprimiert. So kommt EpCAM in der frühen Embryonalentwicklung auf zahlreichen Zelltypen vor (Balzar et al. 1999). Beim erwachsenen Menschen ist EpCAM unter anderem auf Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert (Schmelzer et al. 2007). Vor allem aber findet sich EpCAM in epithelialen Geweben. So ist EpCAM im adulten humanen Gewebe an der basolateralen Zellmembran von einfachen, pseudostratifiziertem und transitionalem Epithel exprimiert (Schnell et al. 2013).

Darüber hinaus wird EpCAM stark von epithelialen Tumoren exprimiert. Dabei kommt es zu einer homogenen membranösen Überexpression von EpCAM (van der Gun et al. 2010). Im primären und metastasierten Brustkrebs fand sich dabei eine 100- bis 1000-fach erhöhte EpCAM-Expression im Vergleich zu normalem Brustgewebe (Osta et al. 2004). Eine hohe Expression von EpCAM wird bei Brustkrebs in weniger differenzierten Tumoren gefunden und ist assoziiert mit größeren Tumoren, Lymphknotenmetastasierung sowie vermindertem Überleben (Saadatmand et al. 2013). In Metastasen fand sich dabei eine höhere Expression von EpCAM als im Primärtumor (van der Gun et al. 2010). Die Rolle von EpCAM in der Krebsentstehung könnte erklärbar sein durch die oben erwähnte Unterdrückung der Funktion von E-Cadherinen, da diese für Tumorsuppression und Wachstumshemmung verantwortlich

sind (Schnell et al. 2013). Außerdem beeinflusst EpCAM die Signaltransduktion und kann die Transkription von onkogenen Molekülen wie c-Myc hochregulieren (Huang et al. 2018).

Der monoklonale Antikörper Catumaxomab, der unter anderem gegen EpCAM gerichtet ist, war als Therapeutikum bei malignem Aszites EpCAM-positiver Tumore zugelassen, sofern keine Standardtherapie zur Verfügung stand oder anwendbar war (European Medicines Agency 2009; Heiss et al. 2010). Aus wirtschaftlichen Gründen wird das Produkt nicht mehr angeboten, sodass die verantwortliche Firma die europäische Zulassung 2017 zurückziehen ließ (European Medicines Agency 2017). In klinischen Studien wird aktuell für solide Tumore eine CAR-T-Zelltherapie mit EpCAM als Zielantigen erprobt (Yang et al. 2021).

Da zumindest ein Teil der DCCs ausgehend von Brustkrebs EpCAM stark exprimiert, wird wie unter Absatz 1.5 erwähnt mit Antikörpern gegen EpCAM nach DCCs im Knochenmark gesucht. Isoliert werden dabei die stark EpCAM-positiven Zellen (EpCAM^{high}; Schlimok et al. 1987; Klein et al. 2002). EpCAM wird aber auch in geringer Frequenz von anderen Zellen im Knochenmark exprimiert. Dabei findet sich in der Regel eine leichte Färbung von Knochenmarkzellen (EpCAM^{dim}) bei Kontroll- oder KrebspatientInnen. Aber auch EpCAM^{high} Zellen werden bei manchen KontrollpatientInnen (non cancer cells, NCCs) in geringer Frequenz im Knochenmark detektiert (Gužvić et al. 2014). Da auch die Frequenz von DCCs bei Brustkrebspatientinnen sehr gering ist, kommt es zu einer Kontamination der mutmaßlichen DCC-Fraktion. Choessel et al. schätzen diese Kontamination auf 7,4 % bis zu 74 % bei M0-Patientinnen. Als kontaminierende Zellgruppe wurden bisher unter anderem Zellen der hämatopoetischen Linie angesehen (Choessel et al. 2004; Gužvić et al. 2014). Morphologische Analysen und Betrachtung der Genexpression zeigten, dass unter EpCAM-positiven Zellen auch erythroide Vorstufen sind (Lammers et al. 2002; Chéry et al. 2014). Cackowski et al. identifizierten eine kontaminierende EpCAM-positive Zellgruppe mittels einer RNA-Analyse als Plasmazellen bzw. der B-Zelllinie zugehörig (Cackowski et al. 2019).

1.7 Zielsetzung

Da trotz des medizinischen Fortschritts der metastasierte Zustand der Brustkrebserkrankung nicht heilbar ist, gilt es, den Eintritt dieses Zustandes zu verhindern. Aus diesem Grund sollten die Vorläuferzellen der Metastasen, die DCCs, näher charakterisiert werden. Zwischen 30 % bis 70 % der Patientinnen mit EpCAM^{high} Zellen im Knochenmark entwickeln keine Metastasen. Dies kann zum einen durch das diskutierte Konzept der jahrelang nicht-proliferierenden DCCs bedingt sein. Zum anderen aber auch dadurch, dass gesunde Zellen aufgrund ihrer Expression von CK oder EpCAM fälschlicherweise für DCCs gehalten werden

(Klein 2003; Aguirre-Ghiso 2007). Als Kandidaten für die kontaminierende Zellpopulation wurden bisher hämatopoetische oder lymphatische Zellen angesehen. Allerdings gelang es Gužvić et al. nicht, anhand der Expression von hämatopoetischen und erythroiden Markern eine Separation zwischen EpCAM⁺ Zellen von Krebs- und KontrollpatientInnen durchzuführen (Gužvić et al. 2014). Die EpCAM^{high} NCCs führen außerdem zu aufwendigen und teuren Analysen, die durch eine bessere Charakterisierung dieser Population verhindert werden könnten.

In dieser Arbeit sollte die Zellpopulation der NCCs identifiziert werden, mit dem Ziel, diese anhand von Markern spezifisch von DCCs unterscheiden zu können. Um eine höhere Anzahl an Zellen als in der Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können, sollte die Detektion von EpCAM^{high} Zellen mittels Durchflusszytometrie neu etabliert werden. Dadurch sollten auch neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Knochenmarks und die Einflüsse der durchgeführten Depletion gewonnen werden.

2 Materialien

2.1 Knochenmarkproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmarkproben (KMP) unterschiedlicher Herkunft verwendet. Es handelte sich dabei um Knochenmark von SpenderInnen ohne bekannte Krebserkrankung (Healthy donors, HD). Außerdem wurde Knochenmark von PatientInnen mit diagnostizierter Erkrankung an Brust-, Blasen- oder Prostatakrebs untersucht. Diese KMP werden in den Absätzen 2.1.1 und 4.1 näher charakterisiert. Die Proben, auf welchen die RNA-Sequenzierung basiert, stammen aus einem Patientenkollektiv, dessen Charakteristika der Arbeit von C. Irlbeck zu entnehmen sind (Irlbeck 2019). Die Herkunft der gesunden Mamma-Epithelzellen, die in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet worden sind, ist bei A. Grujovic beschrieben (Grujovic 2019).

2.1.1 Kooperationspartner

Die in dieser Arbeit verwendeten KMP wurden von den in Tabelle 2-1 aufgeführten klinischen Kooperationspartnern erhalten.

Tabelle 2-1 Liste der klinischen Kooperationspartner.

Name	Institution
Prof. Dr. Maximilian Burger	Abteilung für Urologie, Universitätsklinikum Regensburg
Prof. Dr. Dr. Joachim Grifka	Orthopädische Klinik der Universität Regensburg, Asklepios Klinik Bad Abbach
PD Dr. Roman Mayr	Abteilung für Urologie, Universitätsklinikum Regensburg
Prof. Dr. Olaf Ortmann	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Regensburg
PD Dr. Stefan Seitz	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Regensburg
Dr. Peter Ugoesai	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Regensburg
Prof. Dr. Markus Weber	Orthopädische Klinik der Universität Regensburg, Asklepios Klinik Bad Abbach/Sarkomzentrum Barmherzige Brüder Regensburg

2.1.2 Gewinnung und Transport der Proben

Die KMP der KrebspatientInnen wurden vor der Primäroperation durch eine Beckenkammpunktion und anschließender Aspiration des Knochenmarks entnommen.

Gemischt mit Heparin, um eine Gerinnung zu verhindern, erreichten die Proben den Lehrstuhl für Experimentelle Medizin.

Die KMP der KontrollpatientInnen wurden bei einer Hüftgelenksersatz-Operation aus dem Acetabulum und dem Femur durch Abschabung des Materials gewonnen. In zwei getrennten Röhrchen mit 15 ml PBS erreichten diese Proben den Lehrstuhl.

2.1.3 Ethik

Entsprechend dem Ethikkomitee der Universität Regensburg bestehen keine ethischen oder rechtlichen Bedenken in Bezug auf das Forschungsprojekt (Ethikvotum Nr.: 18-948-101, 07-079).

2.2 Reagenzien

2.2.1 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Tabelle 2-2 Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
1 kb Plus DNA Ladder + Färbung (Längenstandard)	New England Biolabs	N3200L	Agarose Gelelektrophorese
AB-Serum	Bio-Rad	805135	EpCAM-Färbung
ACK Lyse Puffer	Life Technologies GmbH	A10492	Aufarbeitung Knochenmark (KM)
Agarose LE	Anprotec	AC-GN-00009	Agarose Gelelektrophorese
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich	A367-100g	Whole transcriptome amplification (WTA)
AMPure XP purification beads	Beckman Coulter	A63882	RNA-Sequencing (Seq) library preparation
Anti-Mouse Ig, κ/Negative-Kontroll-Kompensations-Partikel Set	BD Biosciences	552843	Durchflusszytometrie
Bacto Peptone	Becton Dickinson	211677	EpCAM-Färbung
Borsäure (H₃BO₃)	Sigma Aldrich	31146-500G	TBE-Puffer

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
Bovine serum albumin (BSA) (20 mg/ml) (für PCR)	Roche Diagnostics	10711454001	WTA
BSA (für Picken)	Sigma Aldrich	B8667-5ml	Zellisolation
Dithiothreitol (DTT, mit SuperScript)	Thermo Fisher Scientific	11553117	WTA
DMEM	Anprotec	AC-LM-0011	Zellkultur
DMEM/F12	Anprotec	AC-LM-0018	Zellkultur
dNTP Set ;100 mM each A,C,G,T; 4x 24 µM	GE Healthcare	28-4065-51	WTA-Reamplifikation (Reamp), WTA, RNA-seq library preparation
EcoRI buffer 10x	New England Biolabs	B7006S	RNA-seq library preparation
Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA) (0,5 M), pH 8,0, RNase-free	Invitrogen	AM92606	Durchflusszytometrie
Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA)	J.T. Baker	B-1037.1000	Aufarbeitung KM, WTA, Agarose Gelelektrophorese
Elution buffer (Buffer EB)	Qiagen	19086	RNA-seq library preparation
Ethanol absolut ≥99.8 %, AnalaR NORMAPUR®	VWR	20821.330	WTA, WTA-Reamp Aufreinigung
Ethanol absolut Mol. Bio. Grade 250 ml	VWR Chemicals	437433T	RNA-seq library preparation
Ethidium Bromid Lösung (10 mg/ml)	Sigma- Aldrich	E1510-10ML	Agarose Gelelektrophorese
Expand Long Template Buffer 1	Roche Diagnostics	11759060001	WTA-Reamp
FastStart dNTP mix	Roche Diagnostics	4738420001	WTA-Qualitätskontrolle (QC)
FastStart PCR buffer with MgCl₂	Roche Diagnostics	4738420001	WTA-QC

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
Fetal bovine serum (FBS) sera Plus	PAN Biotech	P30-3702	KM-Aufarbeitung, Zellkultur
FluoroFix Puffer	Biolegend	422101	Durchflusszytometrie
Formamid BioUltra, für Molekularbiologie, ≥99,5 %	Sigma- Aldrich	47671- 250ML-F	WTA-Reamp, RNA-seq library preparation
Hank's balanced salt solution 10x	Biochrom	L2045	Aufarbeitung KM
Igepal CA-630 viscous liquid	Sigma- Aldrich	I3021-50ml	WTA
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad	1708885	qPCR
Kaliumchloridlösung 1 M in H₂O für Molekularbiologie	Sigma- Aldrich	60142- 100ML-F	WTA
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse (KH₂PO₄)	VWR International	1048731000	WTA
L-Glutamin	PAN Biotech	P04-80100	Zellkultur
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich GmbH	M1028-100ml	WTA
Mineralöl für Molekularbiologie, light oil	Sigma- Aldrich	M5904- 500ML	WTA
mTRAP™ Lysis Buffer	Active Motif	29011	WTA
Natriumazid (NaN₃)	Sigma- Aldrich	S2002-5G	Durchflusszytometrie
PB-Puffer	Qiagen	28106 (QiaQuick Kit)	WTA-Reamp Aufreinigung
Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech	P06-07100	Zellkultur
Pepton	Becton Dickinson GmbH	211677	EpCAM-Färbung
PE-Puffer	Qiagen	28106 (QiaQuick Kit)	WTA-Reamp Aufreinigung

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
Percol	GE Healthcare	17089101	Aufarbeitung KM
Poly T gripNA™ Probe (from mTRAP™ Midi)	Active Motif	29008	WTA
RPMI 1640	PAN Biotech	P04-17500	Zellkultur
RT Puffer 5x	Thermo Fisher Scientific	11553117	WTA
S-adenosylmethionine (SAM)	New England Biolabs	B9003S	RNA-seq library preparation
Sera Plus, special processed FBS, sterile filtered	PAN Biotech	P30-3702	Durchflusszytometrie
Streptavidin Beads (from mTRAP™ Midi)	Active Motif	29010	WTA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth	2367.3	WTA
Tris 1M pH 8.0	AppliChem	A4577,0500	WTA
tRNA from <i>E. coli</i> MRE 600, 100 mg	Roche Diagnostics GmbH	10109541001	WTA
Trypanblau	Sigma Aldrich	T8154-20ml	Aufarbeitung KM, Zellkultur
Trypsin/ EDTA (10x) (0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA)	PAN Biotech	P10-024100	Zellkultur
TWEEN® 20, for molecular biology, viscous liquid	Sigma- Aldrich	P9416-50ml	WTA
Wasser für Chromatographie, LiChrosolv®, LC-MS grade (PCR-Wasser)	Merck	1.15333.1000	qPCR
Wasser UltraPure, DEPC-treated (DEPC-Wasser)	Invitrogen	750023	WTA
Wasser, aqua ad iniectabilia (NGS-Wasser)	Braun	2351744	RNA-seq library preparation

2.2.2 Selbstangesezte Puffer und Lösungen

Tabelle 2-3 Liste der verwendeten selbstangesezten Puffer und Lösungen.

Name	Zutaten	Anwendungen
AB-Serum	5 ml AB-Serum	EpCAM-Färbung
10 %/Pepton 2 %	5 ml 20 % Peptonlösung 40 ml 1x PBS pH 7,4	
cDNA-Igepal	500 µl Tris-HCL 1 M, pH 8,0	WTA
Waschpuffer	750 µl KCl 1 M 1000 µl DTT 0.1M 25 µl 100 % Igepal CA-630 7725 µl DEPC-Wasser	
cDNA-Tween	500 µl Tris-HCL 1 M, pH 8,0	WTA
Waschpuffer	750 µl KCl 1 M 1000 µl DTT 0.1 M 50 µl 100 % Tween20 7700 µl DEPC-Wasser	
dNTPs 10 mM	10 µl dATP 100 mM 10 µl dCTP 100 mM 10 µl dGTP 100 mM 10 µl dTTP 100 mM 60 µl DEPC-Wasser	WTA
DTT 1 mM	10 µl DTT 0.1 M 990 µl DEPC-Wasser	WTA
FACS-Puffer	500 ml PBS pH 7,4 2 mM EDTA (2 ml von 5 M EDTA) 10 ml FCS 0,01 % NaN ₃ (500 µl von einem 10 % NaN ₃ -Ansatz)	Durchflusszytometrie
Formamid 20 %	10 ml Formamid 40 ml DEPC-Wasser	WTA
Igepal 10 %	2 ml 100 % Igepal CA-630 18 ml DEPC-Wasser	WTA
KH₂PO₄ 200 mM	200 µl KH ₂ PO ₄ 800 µl DEPC-Wasser	WTA
MACS-Puffer	500 ml 1x PBS 2.5 g BSA Fraktion V 2 ml 0.5 mM EDTA	Aufarbeitung KM

Name	Zutaten	Anwendungen
MgCl₂ 40 mM	40 µl MgCl ₂ 100 µl DEPC-Wasser	WTA
Peptonlösung 20 %	100 g Bacto Pepton 500 ml 1x PBS pH 7,4 Sterilfiltration über 0,45 µl Filter	EpCAM-Färbung
Percoll 100 %	100 ml Percoll-Stammlösung 9 ml Hanks balanced salt solution Sterilfiltration Dichtemessung mittels Pyknometer, Sollwert bei 1,124 g/ml	Aufarbeitung KM
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 10x	450 g Natriumchlorid 71.65 g Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄) 13.35 g Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Destilliertes Wasser 5 L	Aufarbeitung KM, Durchflusszytometrie, Zellkultur
Polyacrylamid-Carrier (PAA)	1250 µl Acrylamid 400 µl Tris-HCl 67 µl Natriumacetat 20 µl EDTA 8153 µl PCR-H ₂ O Mischen, dann hinzufügen von: 100 µl Ammoniumpersulfat 10 µl TEMED Polymerisieren für 2 h, dann 25 ml Ethanol 100 % hinzufügen Mischen und zentrifugieren, Überstand verwerfen, dann Pellet lösen in 45 ml PCR-H ₂ O	WTA/Whole genome amplification (WGA) vom Überstand
Tailing Waschpuffer	500 µl KH ₂ PO ₄ 100 µl DTT 25 µl Igepal 100 % 9365 µl DEPC-Wasser	WTA
Tris/Borate/EDTA (TBE) Puffer 10x	539 g Tris 275 g Borsäure 37 g EDTA 5 l Wasser (aq. Dest.)	Agarose Gelelektrophorese

Name	Zutaten	Anwendungen
Tween 10 %	2 ml 100 % TWEEN® 20 18 ml DEPC-Wasser	WTA

2.2.3 Enzyme

Tabelle 2-4 Liste der verwendeten Enzyme.

Name	Hersteller	Katalognummer	Anwendung
BglI	New England Biolabs	R1043L	RNA-Seq
BpuEI	New England Biolabs	R0633S	RNA-Seq
FastStart Taq Polymerase	Roche Diagnostics	4738420001	WTA-QC
Invitrogen™ SuperScript® II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	11553117	WTA
Pol Mix 5 U/µl (Expand Long Template enzyme mix)	Roche Diagnostics	11759060001	WTA-Reamp, RNA-Seq
Protease	Active Motif	29012	WTA
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant	Affymetrix	72033	WTA

2.2.4 Antikörper und Microbeads

Tabelle 2-5 Liste der verwendeten Antikörper und Microbeads.

Name	Antigen	Fluoro- chrom	Klon	Bestell- nummer	Hersteller	Verwendung
Alexa Fluor® 647 anti- human CD27 Recombinant Antibody	CD27	AF647	QA17A 18	393205	biolegend	Aufarbeitung KM/Färbung MCF7
Alexa Fluor® 647 anti- human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	AF647	162.1	331819	biolegend	Aufarbeitung KM/Färbung MCF7
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. CD27	AF647	-	400135	biolegend	Aufarbeitung KM/Färbung MCF7

Name	Antigen	Fluoro- chrom	Klon	Bestell- nummer	Hersteller	Verwendung
Anti-APC-MicroBeads	APC	-	-	130-090- 855	Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM
APC anti-human CD45 Antibody	CD45	APC	HI30	304011	biolegend	Durchfluss- zytometrie
APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody	Iso f. CD45	APC	-	400121	biolegend	Durchfluss- zytometrie
APC Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD319	APC	-	B239090	biolegend	Aufarbeitung KM/Färbung MCF7
Brilliant Violet 421™ anti-human CD27 Antibody	CD27	BV421	O323	302823	biolegend	Durchfluss- zytometrie/ Aufarbeitung KM
Brilliant Violet 421™ Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD27	BV421	-	400157	biolegend	Durchfluss- zytometrie/ Aufarbeitung KM
Brilliant Violet 510™ anti-human CD19 Antibody	CD19	BV510	HIB19	302241	biolegend	Durchfluss- zytometrie
CD11b-APC, human	CD11b	APC	M1/70 .15.11. 5	130-091- 241	Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM
CD235a (Glycophorin A) MicroBeads, human	CD235a	-	-	130-050- 501	Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM
CD326 (EpCAM) antibodies, human	EpCAM	PE	HEA- 125	130-113- 264	Miltenyi	Durchfluss- zytometrie, Aufarbeitung KM
CD33-APC, human	CD33	APC	AC104 .3E3	130-091- 731	Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM
CD45-APC, human	CD45	APC	5B1		Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM

Name	Antigen	Fluoro- chrom	Klon	Bestell- nummer	Hersteller	Verwendung
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780	Viability dye	APC-Cy7	-	65-0865-14	ebioscience	Durchflusszytometrie
FITC anti-human CD3 Antibody	CD3	FITC	HIT3a	300306	biolegend	Durchflusszytometrie
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. EpCAM	PE	-	400139	biolegend	Durchflusszytometrie/ Aufarbeitung KM
PE/Cy7 anti-human CD56 (NCAM) Antibody	CD56	PE-Cy7	HCD56	318317	biolegend	Durchflusszytometrie
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	PE/Dazzle	162.1	331811	biolegend	Durchflusszytometrie/ Aufarbeitung KM
PE/Dazzle™ 594 Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD319	PE/Dazzle	-	400357	biolegend	Durchflusszytometrie/Aufarbeitung KM
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD138	PerCP/Cyanine5	-	400149	biolegend	Durchflusszytometrie
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD138 (Syndecan-1) Antibody	CD138	PerCP/Cyanine5	DL-101	352309	biolegend	Durchflusszytometrie

2.2.5 Oligonukleotide und Primer

Tabelle 2-6 Liste der verwendeten Oligonukleotide und Primer.

Name	Basensequenz (5'→3') (N=A/T/C/G; V=A/C/G)	T _A (°C)	Amplikon Größe (bp)	Anwendung
ACTB_for	GCG TGA CAT TAA GGA GAA GCT G	58	378	WTA-QC
ACTB_rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG AT	58	378	WTA-QC
CFL15CT24BpuEI	CCC CCC CCC CCC CCC GTC TAG ACT TGA GTT (TTT) ₇ TVN	RT	-	WTA

Name	Basensequenz (5'→3')	T _A (°C)	Amplikon Größe (bp)	Anwendung
CFL5CN8	CCC CCC CCC CCC CCC GTC TAG ANN NNN NNN	RT	-	WTA
CP2	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC	65	-	WTA
CP2_9C	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC	55	-	WTA-Reamp
CP2-BglII-13C	TCA GAA TTC ATG (CCC) ₂ CGG (CCC) ₂	55	-	RNA-Seq
EF1alpha_3'	TGC CCC AGG ACA CAG AGA CT	58	290	WTA-QC
EF1alpha_5'	CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA	58	290	WTA-QC
GAPDH_for	CCA TCT TCC AGG AGC GAG AT	58	489	WTA-QC
GAPDH_rev	CAG TGG GGA CAC GGA AGG	58	489	WTA-QC
hKi-67_3'	CAG ACC CAG CAA ATC CAA AGT	58	247	qPCR
hKi-67_5'	GCG GAG TGT CAA GAG GTG T	58	247	qPCR
hMCM2-2 3'	ATG CAG AGA GGT TGT GGA TGT T	58	82	qPCR
hMCM2-2 5'	GCC CAG CAG GAC ACT ATT GAG	58	82	qPCR
hPCNA For	CAC TCC ACT CTC TTC AAC GGT	58	118	qPCR
hPCNA Rev	ATC CTC GAT CTT GGG AGC CA	58	118	qPCR

2.2.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 2-7 Liste der verwendeten kommerziellen Kits.

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
Bioanalyzer DNA 1000 Kit	Agilent Technologies	5067-1504	RNA-Seq
Bioanalyzer DNA High Sensitivity Kit	Agilent Technologies	5067-4626	RNA-Seq
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics	11759060001 (Sigma Aldrich)	WTA, WTA Reamp, RNA-Library-Prep
FastStart™ Taq DNA Polymerase, dNTPack	Roche Diagnostics	4738420001 (Sigma Aldrich)	WTA QC PCR

Name	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
Invitrogen™ SuperScript® II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	11553117	WTA
KAPA Library Quantification Kit	Roche Diagnostics	07960298001	RNA-Seq
MiSeq® Reagent Kit v2 (50 cycles)	Illumina	MS-102-2001	RNA-Seq
QiaQuick PCR purification kit	Qiagen	28106	WTA-Reamp Aufreinigung
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32853	RNA-Seq
TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	Illumina	20015949	RNA-Seq library preparation
TruSeq DNA PCR-Free High Throughput Library Prep Kit (96 samples)	Illumina	20015963	RNA-Seq library preparation

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Tabelle 2-8 Liste der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Anwendung
DU145	Menschliche Prostatakrebs-Zelllinie	Durchflusszytometrie
MCF 10 (PI3K mutiert)	Brustepithelzellen, pre-malign, nicht tumorigen	Durchflusszytometrie
MCF 10A (erworben bei ATCC)	Brustepithelzellen, pre-malign, nicht tumorigen	Durchflusszytometrie
MCF 10A (erworben bei Horizon, parental zu PI3K mutiert)	Brustepithelzellen, pre-malign, nicht tumorigen	Durchflusszytometrie
MCF7	Menschliche Brustkrebszelllinie	Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie
MDA-MB-231	Menschliche Brustkrebszelllinie	Durchflusszytometrie
PC3	Menschliche Prostatakrebs-Zelllinie	Durchflusszytometrie
SKBR3	Menschliche Brustkrebszelllinie	Durchflusszytometrie
T-47D	Menschliche Brustkrebszelllinie	Durchflusszytometrie

2.3.2 Kulturmedien

Tabelle 2-9 Liste der verwendeten Kulturmedien.

Name	Zusammensetzung	Zelllinie
RPMI-Medium	500 ml RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin	PC3, DU145, MCF7, T47D, SKBR3
DMEM F12	500 ml DMEM F12 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 1 % HEPES	MCF10-A (ATCC), MCF10-A (parental), MCF10-A (PI3K mutiert)
DMEM	500 ml DMEM 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 1 % HEPES	MDA-MB-231

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-10 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, with Cell- Strainer Cap	BD Falcon	352235
Cell Strainer 40µm	Becton Dickinson	352340
Cellstar® serological pipette 10 ml	Greiner Bio-One	607180
Cellstar® serological pipette 2 ml	Greiner Bio-One	710180
Cellstar® serological pipette 25 ml	Greiner Bio-One	760180
Cellstar® serological pipette 5 ml	Greiner Bio-One	606180
Combitips advanced 0.1 ml	Eppendorf	0030089618
Combitips advanced 0.5 ml	Eppendorf	0030089634
Combitips advanced 1 ml	Eppendorf	0030089642
Erlenmeyerkolben 250 ml DURAN	Schott	21 216 36
Erlenmeyerkolben 500 ml DURAN	Schott	21 216 44
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec	130-042-401

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
MAXYmum Recovery™ PCR Tubes 0.2 ml	Axygen Scientific	11370145
microTUBE-50 AFA Fiber Screw-Cap	Covaris	PN520166
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, nicht-heparinisiert Länge 75 mm x 1.1/1.2 mm	Brand	749321
Nitril BestGen® Powderfree gloves	Meditrade	1286
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides; 8 Felder	Thermo Fisher Scientific	11367764
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides; 8 fields	Thermo Fisher Scientific	11367764
PCR SingleCap 8er-Soft Strips 0.2 ml, clear	Biozym	710970
PCR tube 0.2 ml, single tube	4titude Deutschland	4ti-0795
PCR tube 1.5 ml, graduated, non-sterile	Greiner Bio-One	616201
PCR tube 2 ml, graduated, non-sterile	Greiner Bio-One	623201
PCR-Siegelfolie	Biozym	600208
PCR-Siegelfolie	Thermo Fisher Scientific	AB0558
Protein LoBind Tube 0.5 ml	Eppendorf	022431064
Protein LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf	022431081
Protein LoBind Tube 2 ml	Eppendorf	022431102
Protein LoBind Tube 5 ml	Eppendorf	0030108302
Reagent reservoirs 10 ml	Integra	4331
Röhrchen für FACScan flow Cytometer 5 ml	Sarstedt	55.1578
SafeSeal Surphob 1250 µl (filter)	Biozym	VT0270
SafeSeal Surphob 20 µl (Filter)	Biozym	VT0220
SafeSeal Surphob 200 µl (Filter)	Biozym	VT0240
SafeSeal-Tips Professional 10 µl (filter)	Biozym	770010
Spritzenfilter ROTILABO CME, 0,22 µm	Roth	P667.1
Spritzenfilter ROTILABO CME, 0,45 µm	Roth	P666.1
Transparente 96-well PCR-Platte	Biozym	710884
Weiß, intransparente 96-Well qPCR Platte	Biozym	712282
Zellkulturflasche T25	Greiner Bio-One	690175
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One	658175
Zellschaber, 28 cm, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One	541070
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One	188271
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One	227261

2.5 Geräte

Tabelle 2-11 Liste der verwendeten Geräte.

Name	Hersteller	Verwendung
Autoklav 3150 RL	Systec	Zellkultur
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies	LowPass-Seq, RNA-Seq
CellTram Pump	Eppendorf	DCC Isolation
Centrifuge 5424	Eppendorf	Aufreinigung WTA Reamp
Centrifuge 5424R	Eppendorf	Aufarbeitung KM
Centrifuge 5810R	Eppendorf	Zellkultur
Centrifuge Plate Fuge	Benchmark Scientific	Zentrifugation PCR-Platten
Centrifuge Rotina 380R	Hettich	Aufarbeitung KM
DMZ Universal Puller	Zeitz	DCC Isolation
DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad	WTA
DNA Engine Tetrad2 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad	PCR
Elektrophoresekammer 40-214	Peqlab	Agarose Gelelektrophorese
Gallios Flow Cytometer (3 Laser: 405 nm, 488 nm, 638 nm; 10 Farben)	Beckman Coulter	Durchflusszytometrie
Genetouch thermal cycler	Bioer	PCR
HiSeq4000	Illumina	RNA-Seq
Hybridization oven PerfectBlot	Peqlab	WTA
Inkubator Heraeus BB15	Thermo Fisher Scientific	Zellkultur
Vacunsafe Comfort Absaugsystem	Integra Biosciences	Zellkultur
Laminar flow bench Her Safe KS18	Thermo Fisher Scientific	Aufarbeitung KM, WTA, WGA, Zellkultur, Durchflusszytometrie
LightCycler 480	Roche Diagnostics	qPCR
M220X	Covaris	RNA-Seq
Manual pipettes (2µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Gilson	Molekularbiologie
Microscope Axiovert 200M	Zeiss	DCC Isolation
Microscope CX23	Olympus	Aufarbeitung KM
Microscope IB, invertiert	Optech	Zellkultur

Name	Hersteller	Verwendung
Microscope IX81, invertiert	Olympus	DCC Isolation
Mikrowelle	Micromaxx	Agarose Gelelektrophorese
MiSeq	Illumina	LowPass sequencing
Mörser und Stößel	KPM	Aufarbeitung KM
Multipette Stream	Eppendorf	PCRs
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific	Aufreinigung WTA Reamp
Neubauer hemocytometer	Schubert & Weiss OMNILAB	Aufarbeitung KM
Operating Scissors, RS-6808	Roboz Surgical Store	Aufarbeitung KM
Patchman NP2 micromanipulator	Eppendorf	Zellisolation
PCR bench UVT-S-AR	Thermo Fisher Scientific	PCR, RNA-Library Prep
pH-meter PB-11	Sartorius	pH-Anpassung der Puffer
Power Supply MP-250N	Kisker Biotech	Agarose Gelelektrophorese
Pyknometer	Brand Duran	Percoll Dichtemessung
Qubit3 fluorometer	Thermo Fisher Scientific	RNA-Library Prep
Research Pro 8-channel pipette	Eppendorf	PCRs und RNA-Library Prep
Roller Mixer SRT1	Stuart Scientific	WTA, Färbung KM
UV Illuminator	Intas	Agarose Gelelektrophorese Bildaufnahme
Vortex/centrifuge PCV-2400	Grant-bio	WTA, WGA, PCR
Vortexer	VELP Scientifica	PCR
Waage AVW220D	Shimadzu	Erstellung von Puffern
Waage PLS 510-3	Kern	Agarose Gelelektrophorese

2.6 Softwares und Datenbanken

Tabelle 2-12 Liste der verwendeten Softwares und Databases.

Name	Provider/URL	Verwendung
2100 Expert Software	Agilent Technologies	Bioanalyzer
BBTools: BBDuk	https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bb-tools	Analyse der Sequenzierungsdaten

Name	Provider/URL	Verwendung
BioBloom	https://www.bcgsc.ca/resources/software/biobloomtools	Analyse der Sequenzierungsdaten
Bioconductor	http://bioconductor.org/install/	Analyse der Sequenzierungsdaten
BioRender	https://biorender.com	Erstellung Abbildung
cellSens Dimension	Olympus	Fluoreszenzmikroskopie
GraphPad Prism v8.4.0	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/	Darstellung von Daten, statistische Analysen
igraph	https://igraph.org/redirect.html	Analyse der Sequenzierungsdaten
Kaluza Analysis 2.1 Software	Beckman Coulter	Durchflusszytometrie
Kaluza for Gallios 1.1	Beckman Coulter	Durchflusszytometrie
LightCycler 480 Software 1.5	Roche	qPCR
Microsoft Excel 2013/2016	Microsoft	Daten Management und Analyse
OlyVIA	https://olyvia.software.informer.com/	Auswertung und Bearbeitung der Fluoreszenzmikroskopie
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Literaturrecherche
ResearchSpace	https://rhsmed1.ur.de/login	Dokumentation Experimente
R-Studio v3.5.1	https://www.rstudio.com/	Erstellung von Statistiken
scater v1.12.2	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/scater.html	Analyse der Sequenzierungsdaten
STAR v2.5.1b	http://code.google.com/p/rna-star/	Analyse der Sequenzierungsdaten

3 Methoden

3.1 Aufarbeitung von primären humanen Proben

Die im Folgenden beschriebenen Prozeduren (Absatz 3.1.1, Überblick in Abbildung 1) dienen der Anreicherung von disseminierten Tumorzellen (disseminated cancer cells, DCCs) aus Knochenmarkproben (KMP). Potenzielle DCCs wurden anschließend durch die Fluoreszenzmikroskopie detektiert und isoliert (Absatz 3.1.2), sodass eine Analyse des Transkriptoms (Absatz 3.2) erfolgen konnte. Auch eine Durchflusszytometrie der aufbereiteten KMP wurde durchgeführt (Absatz 3.1.1).

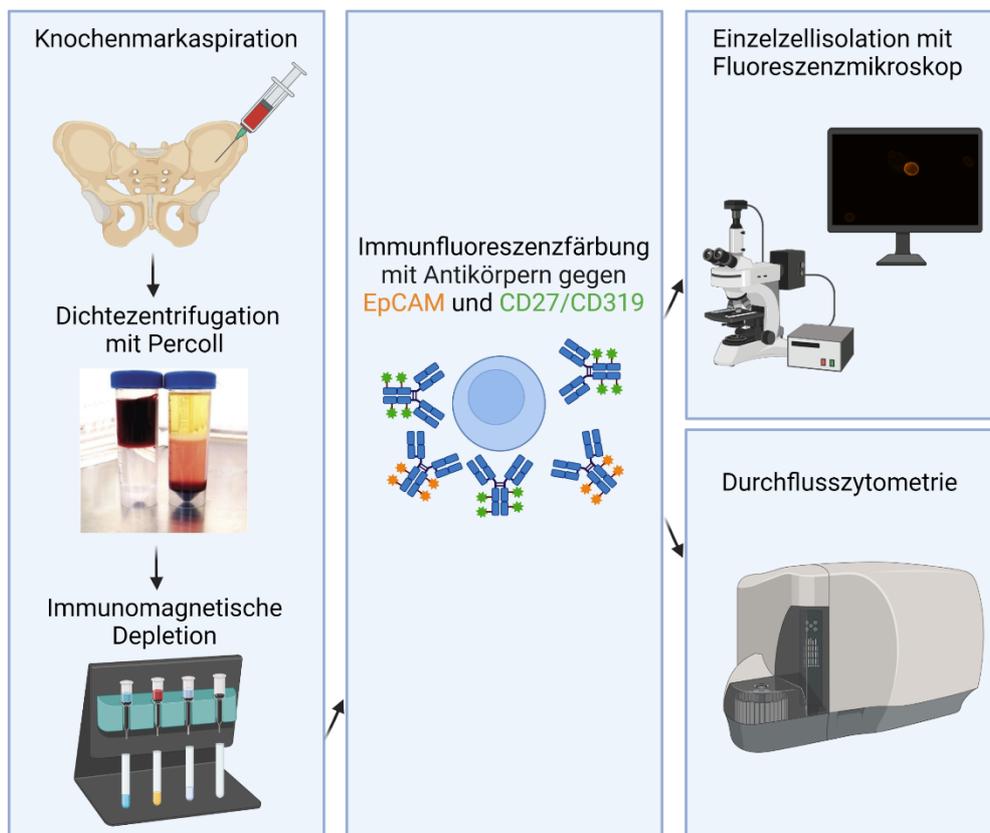


Abbildung 1 Übersicht über den Standard-Workflow der Knochenmarkproben. Nach der Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate mittels Dichtezentrifugation und immunmagnetischer Depletion schloss sich eine Färbung mit EpCAM und/oder CD27/CD319 an. Die gefärbten Zellen wurden unter der Fluoreszenzmikroskopie als Einzelzellen betrachtet und/oder durch die Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung wurde mit BioRender.com und einer studentischen Probe-Lizenz erstellt. Grafik der Dichtezentrifugation ist aus Irlbeck 2019.

3.1.1 Aufarbeitung von Knochenmarkproben

Die KMP, die entsprechend Absatz 2.1.2 operativ gewonnen wurden, erreichten noch am selben Tag den Lehrstuhl und wurden dort taggleich aufgearbeitet.

Da die Proben der sieben KontrollpatientInnen oft größere Knochenstücke enthielten, war im Vorfeld eine Zerkleinerung mittels Schere und Mörser nötig. Die Proben aus den beiden

Entnahmeorten Acetabulum und Femur der ersten vier KontrollpatientInnen wurden als separate Einzelproben behandelt und gefärbt. Da sich hier eine ähnliche Zusammensetzung der Proben ergab, wurden die Proben aus Acetabulum und Femur der letzten drei PatientInnen jeweils gepoolt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei Kontroll- und KrebspatientInnen identisch. Zunächst wurden bis zu 10 ml Knochenmark in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit Hank's Salzlösung gewaschen, um Fett und Thrombozyten zu entfernen. Hierfür wurde das Röhrchen bis 50 ml mit der Lösung aufgefüllt und 10 min bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Verfahren wiederholt.

In ein 15 ml Röhrchen wurden 6 ml mit Percoll 60 % der Dichte 1,077 g/cm³ vorgelegt und daraufhin mit 9 ml der Zellsuspension überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 min bei 1000 x g und 4 °C wurde die Interphase abgenommen. In der Interphase befanden sich nun die mononukleären Zellen (MNZ), da sich die Erythrozyten und Granulozyten im Pellet abgesetzt hatten. Die abgenommene Interphase wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, welches mit PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C über 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS aufgenommen und resuspendiert. Es schloss sich eine Zählung der Zellen in einer Neubauer Zählkammer an. Um dabei tote Zellen auszuschließen, wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt.

Im Anschluss wurde eine negative Selektion mittels immunomagnetischer Depletion durchgeführt, um eine Anreicherung der DCCs zu bewirken. Dafür erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 500 x g und Verwerfung des Überstandes. Pro 10 Millionen MNZ wurden 90 µl MACS-Puffer hinzugegeben sowie die folgenden APC-konjugierten Antikörper: 10 µl anti-CD11b Antikörper und je 5 µl anti-CD33 Antikörper und anti-CD45 Antikörper. Diese richten sich gegen Marker auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen (CD11b), myeloischen Zellen (CD33) bzw. Leukozyten (CD45). Nach einer Inkubation von 15 min Dauer bei 4 °C wurden durch die Zugabe vom 10-fachen Volumen MACS-Puffer und eine Zentrifugation bei 500 x g über 5 min überflüssige Antikörper entfernt. Der Überstand wurde verworfen und die zweite Antikörper-Gabe erfolgte nach der Resuspendierung der Zellen in 60 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen.

Hinzugefügt wurden 20 µl anti-GlyA-Antikörper pro 10⁷ Erythrozyten und 20 µl anti-APC-Beads pro 10⁷ MNZ. Daran schloss sich eine Inkubation bei 4 °C über 15 min und eine Zentrifugation bei 500 x g über 5 Minuten an. Nach der Resuspendierung in 1 ml MACS-Puffer wurde die Suspension über ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße in ein neues

Zentrifugenröhrchen filtriert. Das bereits mit MACS befeuchtete LS-Röhrchen wurde mit den Zellen beladen. Die mit Antikörpern markierten hämatopoetischen Zellen wurden anschließend durch die Immobilisierung der Beads am Magnetfeld separiert und das Eluat auf Eis gesammelt. Dabei wurde mit 3 Mal 3 ml MACS-Puffer gespült. Abschließend wurde abermals mit der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

3.1.2 Immunzytochemie

3.1.2.1 Färbung mit EpCAM

Standardmäßig wurden die Zellen mit anti-EpCAM Antikörpern gefärbt und dann wie unter 3.1.2.3 beschrieben gescreent und positive Zellen isoliert. Die zu färbenden Zellen, wenn möglich 2 Millionen, wurden zu Beginn in PBS bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl in einer 10 % AB-Serum/2 % Pepton/PBS-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 0,5 µl des anti-EpCAM-PE Antikörpers hinzugefügt. Nach der Inkubation auf dem Roller bei 4 °C in Dunkelheit für 15 min erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1x PBS aufgenommen.

3.1.2.2 Doppelfärbung mit CD27 und CD319

Für einzelne KMP wurde eine Färbung mit zusätzlichen Antikörpern für die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach Absatz 3.1.2.1, mit der Änderung, dass bei der Zugabe des anti-EpCAM-Antikörpers auch die Antikörper gegen CD27 und CD319 zugegeben wurden. Bei der erstmaligen Durchführung dieser Färbung wurden zusätzlich eine ungefärbte Kontrolle sowie eine Isotyp-Kontrolle angefertigt. Die verwendeten Mengen können Tabelle 3-1 entnommen werden. Die Expositionszeit der aufgenommenen Bilder betrug 2 s. Zur Visualisierung der Fluorochrome AF637 und PE wurde eine graphische Verstärkung der Intensität der Färbung durch das Programm OlyVIA vorgenommen, die jeweiligen Werte können den Abbildungen entnommen werden.

Tabelle 3-1 Verwendete Antikörper und Isotypkontrollen bei Färbung von Knochenmarkproben und Zelllinien.

Name	Antigen	Fluorochrom	Isotyp	Konzentration in µg/mL	Verwendete Menge in µl
CD326 (EpCAM) antibodies, human	EpCAM	PE	mIgG1k	75	0,5
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. EpCAM	PE	mIgG1	40	0,9375
Alexa Fluor® 647 anti-human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	AF647	mIgG2b	200	1,25
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. CD27	AF647	mIgG1	50	0,15
Alexa Fluor® 647 anti-human CD27 Recombinant Antibody	CD27	AF647	mIgG1	6	1,25
APC Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD319	APC	mIgG2b	100	2,5

3.1.2.3 Zellisolation der EpCAM^{high} Zellen

Die gefärbte Zellsuspension wurde im Anschluss auf stark EpCAM-positive (EpCAM^{high}) Zellen gescreent, die dann isoliert und lysiert wurden. Verwendet wurden hierfür ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Zeiss oder Olympus) sowie ein Mikromanipulator und eine Pumpe. Die 8-Feld-Objektträger wurden im Vorfeld mit 200 µl BSA beschichtet, um eine Anhaftung der Zellen zu verhindern. Auch bei der Kapillare des Mikromanipulators erfolgte eine Beschichtung, hier mit FCS. Pro Probe wurde ein Feld mit 200 µl Pick-PBS gefüllt, das im Folgenden als Pickfeld diente. Von hier wurde am Ende des Pick-Vorgangs 1 µl als Negativkontrolle entnommen, die später äquivalent zu den entnommenen Zellen behandelt wurde. Hierbei musste die Kontroll-PCR negativ ausfallen, damit eine weitere Analyse der gepickten Zellen erfolgen konnte. Pro Feld auf dem Objektträger sollten sich zum Screenen 330.000 Zellen befinden, weshalb die Zellsuspension entsprechend mit PBS verdünnt wurde. Gescreent wurde nach EpCAM^{high} Zellen, deren Färbeintensität über die leichte Färbung hinausgeht, die zahlreiche Knochenmarkzellen (EpCAM^{dim}) aufweisen. Jede EpCAM^{high} Zelle mit intakter Morphologie wurde mithilfe des Mikromanipulators durch die Kapillare eingesaugt, in das Pickfeld transferiert und dort mit einer Mikropipette in 1 µl PBS aufgenommen. Damit eine Amplifikation des Transkriptoms (whole transcriptome amplification, WTA) angeschlossen werden kann, wurde die gepickte Zelle in ein vorbereitetes 0,2 ml MAXYMum Recovery Röhrchen überführt. Hier waren bereits 4 µl mTRAP Lysepuffer

sowie 0,4 µl tRNA vorgelegt. Das verwendete Röhrchen und zugefügte tRNA sollten eine Anheftung der Nukleinsäuren an der Plastikoberfläche verhindern. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren. Zur graphischen Darstellung wurden die Fotos der gepickten Zellen durch das Programm OlyVIA bearbeitet.

3.2 Amplifikation des Transkriptoms (WTA)

Mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen Methode wurde die mRNA der lysierten Zelle von den restlichen Zellbestandteilen, u.a. der genomischen DNA (gDNA), getrennt, revers in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert und im Anschluss amplifiziert. Die Zusammensetzung der Master-Mixe für diese Methode kann der Tabelle 3-2 entnommen werden, die Bestandteile der selbstangestellten Lösungen dem Absatz 2.2.2.

Zu der aufgetauten Probe wurden 1 µl einer 1 µg/µl-Protease-Lösung sowie 1 µl Poly-T-Peptid-Nukleinsäure (PNA) hinzugegeben. Es folgten ein 10-minütiger Proteinverdau bei 45 °C, die Zerstörung der Sekundärstruktur der mRNA und Inaktivierung der Protease bei 74 °C für eine Minute sowie das Binden der PNAs an die mRNA bei 22 °C für 10 min.

Pro Röhrchen wurden 4 µl Streptavidin-konjugierte mTRAP-Beads hinzugefügt, die sich unter 45-minütiger Rotation bei Raumtemperatur an die PNAs banden. Dadurch konnten im Anschluss die mRNA-PNA-Komplexe von den anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Dafür wurden die mRNA-PNA-Komplexe am Magneten immobilisiert. Insgesamt dreimal wurde im Folgenden gewaschen, zunächst mit 10 µl cDNA-Igepal-Waschpuffer, dann mit 20 µl cDNA-Tween-Waschpuffer und abschließend nochmals mit 20 µl cDNA-Igepal-Waschpuffer. Der jeweils anfallende Überstand, der unter anderem die DNA enthielt, wurde in MAXYMum Recovery Röhrchen gesammelt. In diese war bereits 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier vorgelegt, nach der Zugabe der Probe erfolgte eine Fällung der DNA durch Zugabe von 120 µl 100 % Ethanol. Anschließend konnte mit dieser Probe im weiteren Verlauf eine Amplifikation des Genoms (whole genome amplification, WGA) durchgeführt werden.

Es folgte die Transkription der mRNA in cDNA. 10 µl des cDNA-Synthese-Mix I wurde hinzugefügt und zur Bindung der Primer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des cDNA-Synthese Mix II, der die Reverse Transkriptase enthielt, und eine Rotation des Röhrchens für 45 min bei 44 °C im Hybridisierungssofen. Die Beads wurden abermals an der Röhrchenwand immobilisiert und die Überstände verworfen. Es wurde mit 20 µl Tailing-Waschpuffer gewaschen und die Probe in 10 µl resuspendiert. Um ein Verdampfen der Probe zu verhindern, erfolgte eine Überschichtung mit 40 µl PCR-Öl. Bei 94 °C für 4 min wurde das mRNA-cDNA-Hybrid denaturiert, sodass die cDNA nun nicht mehr

an die Beads gekoppelt war. Auf Eis erfolgte nun die Zugabe von 0,8 µl terminaler Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) zur Probe durch das Öl hindurch. Bei 37 °C für eine Stunde schloss sich nun die Tailing-Reaktion an, die Addition eines Poly-G-Schwanzes an die cDNA. Die TdT wurde dann für fünf Minuten bei 70 °C inaktiviert. Abschließend wurde eine PCR durchgeführt. Dafür wurden 35 µl des PCR-Mix I durch das Öl zur Probe hinzugefügt. Nach Erwärmung auf 78 °C wurden 5,5 µl des PCR-Mix II hinzugegeben. Das Amplifizierungsprogramm ist Tabelle 3-3 zu entnehmen. Das Produkt ist bei mindestens -20 °C lagerbar.

Tabelle 3-2 Zusammensetzung der Master-Mixe für die WTA.

Name	Bestandteile für eine Reaktion
cDNA-Synthese-Mix I	2 µl 5x RT Puffer 1 µl DTT 0.1 M 0.5 µl Igepal 10 % 0.5 µl DEPC-Wasser 3 µl CFL15CT24BpuEI 100 µM 3 µl CFL15CN8 200 µM
cDNA-Synthese-Mix II	2 µl 5x RT Puffer 1 µl DTT 0.1 M 0.5 µl dNTP 10 mM 0.5 µl DEPC-Wasser 3 µl Reverse Transkriptase Super Script II
Primäre WTA Mix I	4 µl Expand Long Template Buffer 1 7.5 µl Formamid 20 % 24 µl DEPC-Wasser
Primäre WTA Mix II	2.5 µl CP2 24 µM 1.75 µl dNTP 10 mM 1.5 µl DNA Pol mix
Tailing-Mix	1 µl MgCl ₂ 40 mM 1 µl DTT 1 mM 1 µl dGTP 2 mM 0.5 µl KH ₂ PO ₄ 200 mM 6.5 µl DEPC-Wasser

Tabelle 3-3 PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:sec)	Zyklen
1	78	00:00:30	1
2	94	00:00:15	
3	65	00:00:30	20
4	68	00:02:00	
5	94	00:00:15	
6	65	00:00:30	20
7	68	00:02:30 + 10 s pro Zyklus	
8	68	00:07:00	1
9	4	Unendlich	1

3.3 Qualitätskontrolle der Amplifikation des Transkriptoms

Der Amplifikation des Transkriptoms schloss sich eine Qualitätskontrolle in Form einer Endpoint-PCR an. Hierfür wurde die Expression dreier Gene untersucht (β -Actin (ACTB), EF1 α (EEF1A1) und GAPDH), zusätzlich wurden eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die verwendeten Primer können der Tabelle 2-6 entnommen werden. 9,5 μ l eines Master-Mixes entsprechend der Tabelle 3-4 wurden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend 0,5 μ l der Probe hinzugefügt. Die Amplifikation erfolgte nach dem Programm der Tabelle 3-5. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Agarose Gelelektrophorese (Absatz 3.4), wobei weitere Analysen nur bei Proben mit zwei oder drei Banden bei gleichzeitig negativen Kontrollen des Pickfeldes, der WTA und dieser PCR durchgeführt wurden.

Tabelle 3-4 PCR-Ansatz für die Qualitätskontrolle.

Reagenzien	Menge pro Probe [μ l]
10x FastStart PCR Puffer (mit 20 mM MgCl ₂)	1
Primer-Mix (8 μ M pro Primer)	1
dNTPs (aus dem FastStart kit)	0.2
BSA (20 mg/ml)	0.2
FastStart Taq Polymerase (5 U/ μ l)	0.1
PCR-Wasser	7

Tabelle 3-5 Programmierung für die Qualitätskontrolle.

	Temperatur	Zeit (h:min:sec)	Zyklen
Schritt 1	95.0 °C	00:04:00	
Schritt 2	95.0 °C	00:00:30	
Schritt 3	58.0 °C	00:00:30	32 Zyklen
Schritt 4	72.0 °C	00:00:90	
Schritt 5	72.0 °C	00:07:00	
Schritt 6	4.0 °C	Unendlich	

3.4 Agarose Gelelektrophorese

Dieses Verfahren dient zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen nach ihrer Größe und ermöglicht durch einen Vergleich mit Strängen bekannter Größe die Validierung einer erfolgreich verlaufenen Amplifikation. Für nachzuweisende cDNA wurden hierfür 2 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 100 ml 1x TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde die Gellösung in einen weiteren Erlenmeyerkolben umgefüllt, in welchen nun 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gegeben wurden. Nach Schwenken des Kolbens und Abkühlen der Lösung wurde der Inhalt in einen Gelträger mit Kämmen transferiert. Im Anschluss an die Verfestigung des Gels nach mindestens 20 min wurden die Kämmen entfernt und in die jeweils erste und letzte Geltasche 8 µl des 1 kb Längenstandards gegeben. 10 µl der Proben wurden mit 3 µl Gelladepuffer vermischt und 11 µl der Mischung dann auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nun 45 min an die Spannungsquelle bei 160 Volt und 400 mA angeschlossen. Die Visualisierung erfolgte am UV-Schirm, wo digitale Aufnahmen der Banden angefertigt wurden.

3.5 Reamplifikation der WTA-Produkte und Qualitätskontrolle

3.5.1 Reamplifikation

Für weitere Analysen der Proben wurde eine Reamplifikation der primären WTA-Proben angeschlossen. In ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden 49 µl des Master-Mixes entsprechend der Tabelle 3-6 und 1 µl der Probe hinzugegeben. Die Proben wurden danach in einen Thermocycler überführt, um das Programm nach Tabelle 3-7 zu durchlaufen.

Tabelle 3-6 Master-Mix für die Reamplifikation primärer WTA-Proben.

Reagenzien	Menge pro Probe [μ l]
Expand Long Template Buffer 1	5.0
CP2_9C primer (24 μ M)	6.0
dNTPs (10 mM)	1.75
Formamid (20 %)	7.5
Pol Mix (5 U/ μ l)	1.5
PCR-Wasser	27.25

Tabelle 3-7 Programmierung für die Reamplifikation der primären WTA.

Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Dauer (h:min:sec)	Zyklen
1	95	00:01:00	1
2	94	00:00:15	
3	55	00:01:00	5
4	65	00:03:30	
5	94	00:00:15	
6	55	00:01:00	3
7	65	00:03:30 + 10 s pro Zyklus	
8	65	00:07:00	1
9	4	Unendlich	1

3.5.2 Qualitätskontrolle

An diese Reamplifikation wurde eine Qualitätskontrolle angeschlossen, die analog zu Absatz 3.3 erfolgte, mit folgenden Änderungen: Für den Master-Mix wurden 6,5 μ l PCR-Wasser hinzugegeben. Außerdem wurden 9 μ l des Master-Mixes pro Probe verwendet und 1 μ l der 1:5 mit PCR-Wasser verdünnten Probe. Das verwendete Programm findet man in Tabelle 3-5. Die Auswertung erfolgte wiederum durch die Gelelektrophorese, die in Absatz 3.4 erläutert wird. Die Proben wurden als von guter Qualität angesehen, sofern sie zwei oder drei Banden aufwiesen.

3.6 Aufreinigung und Konzentrationsmessung von WTA-Proben

Nach der Reamplifikation und positiver Qualitätskontrolle wurde die reamplifizierte WTA-Probe aufgereinigt. Verwendet wurde hierfür das QIAquick PCR Purification Kit. Dabei wurden folgende Änderungen am Herstellerprotokoll vorgenommen: Es wurde kein pH-

Indikator zum PB-Puffer hinzugefügt. Des Weiteren wurde die gereinigte cDNA mit PCR-Wasser anstelle von EB-Puffer vom Aufreinigungsröhrchen eluiert. Dafür wurden 20 µl PCR-Wasser direkt auf den Filter der Säule pipettiert, eine Inkubationszeit von 5 min abgewartet und dann zwei Zentrifugationen mit 500 x g für 30 s und 17.900 x g für 60 s angeschlossen. Eine Konzentrationsmessung der Proben fand mit Hilfe des NanoDrop 2000c statt. Dafür wurden jeweils 1 µl der aufgereinigten Proben nacheinander auf das Gerät aufgetragen.

3.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) können bestimmte Transkripte der cDNA amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert werden. Verwendet wurde hierfür der LightCycler 480. Die reamplifizierten Proben wurden zunächst mit PCR-Wasser verdünnt, sodass sich eine Konzentration von 1 ng/µl ergab. Da der SYBR Green Farbstoff lichtempfindlich ist, fanden die folgenden Schritte bei abgeschalteter PCR-Bench-Beleuchtung statt. Ein Master-Mix entsprechend der Tabelle 3-8 wurde angesetzt, wobei in Bezug auf die Menge des Master-Mixes berücksichtigt werden musste, dass jede Probe in Triplikaten angesetzt wurde. Anschließend wurden 7,5 µl des Master-Mixes in jedes Well der Platte gegeben, gefolgt von je 2,5 µl der Proben in Triplikaten mit einer 8-Kanal Pipette. Auch von der Positivkontrolle (eine pro Master-Mix und Platte) und Negativkontrolle (eine pro Master-Mix) wurden 2,5 µl in Triplikaten hinzugefügt. Die verschlossene Platte wurde dann im LightCycler dem Programm der Tabelle 3-9 unterzogen.

In der LightCycler Software wurden im Folgenden die Schmelzkurven der Proben mit denen der Positivkontrolle verglichen. Gab es eine Abweichung der Kurve der Probe von der Kurve der Positivkontrolle, wurde sie als negativ erachtet und ihr der Schnittpunkt-Wert (Crossing point, Cp) von 35 zugeteilt, um weitere Downstream-Analysen zu ermöglichen. Die Cp-Werte wurden anhand der second-derivative-maximum-Methode der LightCycler Software ermittelt und anschließend in Microsoft Excel ausgewertet. Fand eine Messung desselben Gens auf mehreren Platten statt, wurden zunächst die Cp-Werte normalisiert, weshalb in diesem Fall auf jeder Platte das gleiche Aliquot einer Positivkontrolle verwendet wurde. Die sich anschließenden Analysen wurden mit den normalisierten Cp-Werten durchgeführt.

Tabelle 3-8 Ansatz für die qPCR.

Reagenzien	Menge pro Reaktion [µl]
iQ™ SYBR® Green Supermix	5.0
Forward primer (8 µM)	0.5
Reverse primer (8 µM)	0.5
PCR-Wasser	1.5

Tabelle 3-9 Programmierung für die qPCR.

Schritt	Temp. (°C)	Dauer (h:min:sec)	Heiz-Geschwindigkeit (°C/s)	Erfassungsmodus	Messungen (pro °C)	Zyklen
Prä-Inkubation	95	00:05:00	4.4	Keiner	0	1
	95	00:00:20	4.4	Keiner	0	
Amplifikation	58	00:00:15	2.2	Keiner	0	40
	72	00:00:15	4.4	Single	0	
Schmelzkurve	95	00:00:05	4.4	Keiner	0	
	55	00:01:00	2.2	Keiner	0	1
	95	00:00:00	0.11	laufend	5	
Kühlen	40	00:00:30	2.2	Keiner	0	1

3.8 RNA-Sequenzierung

Im Folgenden werden zwei unterschiedliche Methoden vorgestellt, wie die Proben zur Vorbereitung auf die Sequenzierung bearbeitet wurden. Dies liegt in einer Änderung der Sequenz des CFL15CT24-Primers begründet, durch die eine Zielstelle für BpuEI in das WTA-Produkt eingeführt wird. Alle Proben, deren WTAs nach dem alten Protokoll vor März 2012 erstellt wurden, wurden nach dem Verfahren in Absatz 3.8.1 prozessiert. Ab März 2012 generierte WTAs wurden entsprechend Absatz 3.8.2 bearbeitet.

3.8.1 Library Preparation vor März 2012

Im ersten Schritt wurden zwei identische 1:5 Verdünnungen der primären WTA-Proben angesetzt. Hierfür wurden 1.5 µl der Probe mit 6 µl NGS-Wasser vermischt. Pro Verdünnung wurden fünf PCR-Reaktionen durchgeführt, wofür ein Master-Mix nach Tabelle 3-10 erstellt wurde. Die Programmierung entsprach der Programmierung in Tabelle 3-7. Anschließend wurden die 200 µl der zehn Einzelreaktionen in einem 1,5 ml Röhrchen gepoolt. Es folgte nun

die Aufreinigung mit AMPure XP-Beads nach der Anleitung des Herstellers. Zu den gepoolten Proben wurde die 1,8-fache Menge an Beads hinzugegeben, gemischt und am Magneten immobilisiert. Danach wurde zweimalig mit 70 % Ethanol gewaschen und die Probe bei 37 °C getrocknet. Dabei erfolgte das Trocknen in einem Thermoblock bei geöffneten Deckeln der Röhren. Zur Elution der cDNA wurden 41 µl NGS-Wasser verwendet, wovon anschließend 40 µl des Überstandes in ein neues 0,2-Reaktionsgefäß gegeben wurden. Nun erfolgte eine Homopolymer-Endfragment-Freisetzung, um die Primer der WTA zu entfernen. Zuerst wurden zu den Proben 10 µl des Verdau-Mixes I entsprechend Tabelle 3-11 gegeben und die Proben im Cycler für eine Stunde bei 37 °C und 20 min bei 65 °C behandelt. Ein zweiter Verdau erfolgte durch Zugabe von 10 µl des Verdau-Mixes II aus Tabelle 3-12. Die Probe wurde anschließend für 3 h bei 37 °C und 20 min bei 65 °C zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert. Nun wurde eine erneute Aufreinigung wie bereits oben beschrieben durch AMPure XP Beads mit dem 1,8-fachen Volumen der Probe durchgeführt. Die Elution am Ende erfolgte mit 16 µl Qiagen Elution Puffer. Um die anschließende Messung durch den Bioanalyser 2100 nach Absatz 3.9.2 durchführen zu können, wurden Qubit-Messungen entsprechend Absatz 3.9.1 durchgeführt und Verdünnungen der Proben auf 1,8 ng/µl vorgenommen. Nach der Analyse der durchschnittlichen Längen-Verteilung anhand des Bioanalyzers wurde eine Fragmentierung durch Covaris M220X entsprechend der Herstelleranleitung angeschlossen. Dafür wurden 55 µl der cDNA-Probe auf 20 ng/µl verdünnt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem TruSeq DNA PCR-Free High Throughput Library Prep Kit nach der Anleitung des Herstellers. Danach folgte eine Qualitätskontrolle am Bioanalyser 2100 unter Verwendung des High Sensitivity DNA Kits wie in Absatz 3.9.2 beschrieben. Abschließend wurden die Proben mit dem KAPA Library Quantification Kit für Illumina Plattformen nach der Anleitung für das Kit quantifiziert.

Tabelle 3-10 Master-Mix für die RNA-Seq-Reamplifikation vor März 2012.

Reagenzien	Menge pro Reaktion [µl]
Expand Long Template Buffer 1	2.0
CP2_BglI-13C-Primer (24 µM)	1.2
CP2_BpuEI-13C-Primer (24 µM)	1.2
dNTPs (10 mM)	0.7
Formamid (20 %)	3.0
Pol Mix (5 U/µl)	0.6
NGS-Wasser	10.3
1:5 Verdünnung der WTA-Probe	1

Tabelle 3-11 Ansatz für den Verdau-Mix I.

Reagenzien	Menge pro Reaktion [µl]
10x EcoRI buffer supplementiert mit 80 µM SAM	5
BpuEI (5 U/µl)	2.5
NGS-Wasser	2.5

Tabelle 3-12 Ansatz für den Verdau-Mix II.

Reagenzien	Menge pro Reaktion [µl]
10x EcoRI buffer	1
BglI (10 U/µl)	2.5
NGS-Wasser	6.5

3.8.2 Library Preparation nach März 2012

Ab März 2012 wurde ein neuer Primer in der WTA verwendet, der bereits eine Zielstelle für BpuEI beinhaltet. Deshalb wurde der CP2-BpuEI-13C-Primer aus Absatz 3.8.1 nicht mehr verwendet, so dass sich für den Master-Mix die Zusammensetzung gemäß Tabelle 3-13 ergab. Zu je 19 µl des Master-Mixes wurden 1 µl der 1:5 mit NGS-Wasser verdünnten primären WTA-Probe gegeben. Pro Probe wurden fünf solcher Ansätze hergestellt. Die PCR verlief nach dem Programm in Tabelle 3-14. Die 100 µl der fünf Ansätze einer Probe wurden anschließend gepoolt und analog zu Absatz 3.8.1 mit entsprechend skalierten Bead- und Ethanol-Mengen prozessiert. Des Weiteren wurde neu eine Qualitätskontrolle nach erfolgter erster Aufreinigung eingeführt. Von jedem unabhängig erstellten Master-Mix wurden drei Proben zufällig ausgewählt und wie in Absatz 3.5.2 beschrieben prozessiert. Sofern die Ergebnisse der Qualitätskontrolle übereinstimmten, wurden alle Proben des jeweiligen Master-Mixes weiterbearbeitet.

Tabelle 3-13 Master-Mix für die RNA-Seq Reamplifikation nach März 2012.

Reagenzien	Menge pro Reaktion [µl]
Expand Long Template Buffer 1	2.0
CP2_BglI-13C-Primer (24 µM)	2.0
dNTPs (10 mM)	0.7
Formamid (20 %)	3.0
Pol Mix (5 U/µl)	0.3
NGS-Wasser	11

Tabelle 3-14 Programmierung für die Reamplifikation nach März 2012.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:sec)	Zyklen
1	94	00:02:00	1
2	94	00:00:15	
3	68	00:04:00	8
4	68	00:07:00	
5	4	Unendlich	1

3.8.3 Sequenzierung der Proben

Die Sequenzierungs-Libraries wurden in Gruppen zu je zwölf Libraries mit äquimolaren Verhältnissen (10 nM pro Library) gepoolt, wobei sich überschneidende Barcodes vermieden wurden. Diese Pools wurden anschließend auf der Illumina NovaSeq-Plattform sequenziert. Dabei wurde die Sequenzierung mit 150 bp paired-end reads von der Genewiz Germany GmbH durchgeführt.

3.9 Konzentrationsmessung und Qualitätskontrolle der Proben

3.9.1 Konzentrationsmessung durch Qubit

Die Messung mit dem Qubit 3.0 Fluorometer erfolgte entsprechend der Herstelleranleitung. Für die Messung existieren zwei verschiedene Kits mit unterschiedlichen Quantifikationsbereichen. Das High Sensitivity (HS) Kit deckt dabei Mengenbereiche von 2-100 ng/µl ab, das Broad Range (BR) Kit Bereiche von 2-1000 ng/µl. Entsprechend der zu erwartenden Werte wurde das passende Kit gewählt. Die folgenden Schritte fanden bei Dunkelheit statt, da der verwendete Farbstoff lichtempfindlich ist. Die auf Raumtemperatur erwärmten Komponenten des Kits wurden zu einer Arbeitslösung vermischt, wofür pro Probe 1 µl Qubit Reagent DMSO und 199 µl Qubit Puffer aus dem gewählten HS- bzw. BR-Kit gemischt wurden. 198 µl dieser Arbeitslösung wurden in ein 0,5 ml Röhrchen vorgelegt und mit 2 µl Probe versehen. Zusätzlich wurden 10 µl von jedem der zwei Standards aus dem Kit mit 190 µl Arbeitslösung vermischt, die am Fluorometer zur Kalibration dienen. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei Raumtemperatur wurden die Proben am Fluorometer gemessen.

3.9.2 Analyse mit Bioanalyser

Durch die Messung mit Hilfe des Bioanalyser 2100 kann anhand des resultierenden Fragmentlängenprofils die Qualität der Sequenzier-Library eruiert werden. Für diese Art von Proben wurde das Bioanalyser DNA High Sensitivity Kit verwendet. Die bereits auf 1,8 ng/µl

verdünnten Proben wurden wie in der Herstelleranleitung beschrieben prozessiert. Die Analyse erfolgte durch eine Smear-Analyse der 2100 Expert Software, wobei die untere Grenze bei 200 bp und die obere bei 2000 bp festgelegt wurde.

3.10 Zellkultur

3.10.1 Allgemeine Zellkultur

Die verwendeten adhärennten Zelllinien und deren jeweiliges Medium sind Tabelle 3-15 zu entnehmen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5,5 % CO₂. Die Volumina der Komponenten für die jeweilige Zellkulturflaschengröße sind Tabelle 3-16 zu entnehmen. Beim Auftauen von eingefrorenen Zelllinien wurden 10 ml warmes Medium in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde im Wasserbad unter ständigem Schwenken aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskristall zu sehen war. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde mit einer 2 ml serologischen Pipette zu dem warmen Medium hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand verworfen. Die geeignete Menge Medium für die vorgesehene Kulturflasche wurde hinzugeben und in diese umgefüllt.

Ein Wechsel des Mediums nach zwei bis drei Tagen oder eine Passage der Zellen erfolgte entsprechend der Kontrolle des Mediums sowie der Dichte und Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop. Bei Austausch des Mediums wurde dieses mit dem Absauger aufgenommen und neues auf 37 °C vorgewärmtes Medium zugegeben. Bei einer maximalen Konfluenz von 90-95 % wurden die Zellen gesplittet. Nach Abnahme des Mediums durch den Absauger wurde PBS auf die der Wachstumsfläche gegenüberliegende Seite zugegeben. Das PBS wurde wieder durch den Absauger aufgenommen und 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA hinzugegeben. Abhängig von der Zelllinie dauerte die anschließende Inkubation bei 37 °C drei bis fünf Minuten. Unter dem Mikroskop erfolgte eine optische Kontrolle, ob sich die Zellen bereits ablösten, gegebenenfalls wurde das Ablösen durch Klopfen auf den Kulturflaschenrand unterstützt. Durch die Zugabe von 8 ml Medium wurde das Trypsin inhibiert und die Zelllinien von der Wachstumsfläche gespült. Entsprechend der gewünschten Verdünnung, die abhängig von der Zelllinie war, wurde die jeweilige Menge Zellsuspension in die Kulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt.

Tabelle 3-15 Verwendete Zelllinien mit jeweiligem Medium und Anwendungsbereich.

Zelllinie	Verwendetes Medium	Anwendung
PC3	RPMI-Medium	Durchflusszytometrie
DU145	RPMI-Medium	Durchflusszytometrie
MCF 10A (erworben bei ATCC)	DMEM/F12-Medium	Durchflusszytometrie
MCF 10A (parent)	DMEM/F12-Medium	Durchflusszytometrie
MCF 10 (PI3K mutiert)	DMEM/F12-Medium	Durchflusszytometrie
MCF7	RPMI-Medium	Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie
MDA-MB-231	DMEM-Medium	Durchflusszytometrie
SKBR3	RPMI-Medium	Durchflusszytometrie
T-47D	RPMI-Medium	Durchflusszytometrie

Tabelle 3-16 Mengen der Komponenten bei 25 ml und 75 ml Kulturflaschen.

Volumen Kulturflasche	25 ml	75 ml
PBS	7-10 ml	10-15 ml
0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA	1-1,5 ml	1,5-2 ml
Medium	5-7 ml	12-15 ml

3.10.2 Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien

Zelllinien wurden sowohl für die Fluoreszenzmikroskopie als auch für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die jeweilige Gewinnung und Färbung der Zellen werden im Folgenden erläutert.

3.10.2.1 Durchflusszytometrie von Zelllinien

Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Zelllinien, die Tabelle 3-15 zu entnehmen sind, wurden wie unter 3.10.1 beschrieben mit PBS gewaschen und durch Trypsin in Suspension gebracht. Da MCF-10A-Zelllinien stark adhärent sind, eine verlängerte Inkubationszeit durch Trypsin wegen des möglichen Abbaus der Oberflächenmoleküle aber nicht gewünscht war, wurden diese Zellen zusätzlich durch einen Schaber von der Oberfläche gelöst. Zu den Zellen wurden 4 ml Medium hinzugefügt und die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach einem Auffüllen mit PBS bis zu einem Volumen von 40 ml wurde 10 min bei 500 x g und 23 °C

zentrifugiert. Durch den Absauger wurde die Flüssigkeit abgenommen und das Pellet in 0,25 bis 1 ml PBS, je nach erwarteter Konzentration der Zellen, zur Resuspension aufgenommen. Waren sichtbare Partikel in der Suspension vorhanden, wurden die Zellen auf ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße gegeben. Eine 1:10 Verdünnung der Suspension wurde anschließend 1:2 mit Trypanblau gefärbt. Nach einer Zählung durch die Neubauer Zellkammer wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die nachfolgende Färbung erfolgte wie in Absatz 3.11 beschrieben mit den Antikörpern und Isotypen entsprechend Tabelle 3-1.

3.10.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen der MCF7-Zelllinie wurden auch für die Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. Das Waschen mit PBS und Trypsinieren erfolgte wie unter 3.10.1 beschrieben. Es schloss sich eine Zugabe von 10 ml Medium und Überführung in ein 50 ml Röhrchen an. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und nach einer 1:2 Trypanblaufärbung in der Zählkammer gezählt. Die nachfolgende Färbung und Mikroskopie erfolgten entsprechend den Protokollen in Absatz 3.1.2. Die beim jeweiligen Experiment verwendeten Antikörper und Istoyp-Kontrollen können Tabelle 3-17 entnommen werden. Pro Röhrchen wurden dabei eine Million MCF7-Zellen gefärbt. Für das Experiment zum Prüfen der Expression von CD319 auf MCF7-Zelllinien wurden als Positivkontrolle periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut gefärbt. Falls nicht anders angegeben wurden die Proben nur bei negativer Isotyp-Kontrolle und negativer Kontrolle der ungefärbten Zellen ausgewertet.

Tabelle 3-17 Verwendete Antikörper für Fluoreszenzfärbungen der Zelllinien. Angegeben sind die Konzentrationen und Mengen der verwendeten Antikörper sowie die Fluorochrome. Außerdem ist das jeweilige Experiment angegeben, in welchem die Antikörper verwendet worden sind. Für das Experiment „Expression CD319“ siehe Absatz 4.5.2, für das Experiment „Doppelfärbung AF647“ siehe Absatz 4.4.3.

Name	Antigen	Fluorochrom	Isotyp	Konzentration in µg/mL	Verwendete Menge in µl	Experiment
Brilliant Violet 421™ anti-human CD27 Antibody	CD27	BV421	mIgG1k	50	1,25	Expression CD319
Brilliant Violet 421™ Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD27	BV421	mIgG1	100	0,625	Expression CD319

Name	Antigen	Fluorochrom	Isotyp	Konzentration in $\mu\text{g/mL}$	Verwendete Menge in μl	Experiment
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	PE/Dazzle	IgG2b, κ	200	1,25	Expression CD319
PE/Dazzle™ 594 Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD319	PE/Dazzle	mIgG2b	200	1,25	Expression CD319
CD326 (EpCAM) antibodies, human	EpCAM	PE	mIgG1k	75	0,5	Doppelfärbung AF647
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. EpCAM	PE	mIgG1	40	0,9375	Doppelfärbung AF647
Alexa Fluor® 647 anti-human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	AF647	mIgG2b	200	1,25	Doppelfärbung AF647
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. CD27	AF647	mIgG1	50	0,15	Doppelfärbung AF647
Alexa Fluor® 647 anti-human CD27 Recombinant Antibody	CD27	AF647	mIgG1	6	1,25	Doppelfärbung AF647
APC Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD319	APC	mIgG2b	100	2,5	Doppelfärbung AF647

3.10.3 Spike-in-Versuch

Für den Spike-in-Versuch wurden die Prostata-Krebszelllinien DU145 und PC3 wie unter Absatz 3.10.2.1 beschrieben gewonnen. Zehn Prozent dieser Zellen wurden jeweils zu einer KMP eines Kontrollpatienten vor und nach Depletion gegeben, die entsprechend Absatz 3.1.1 prozessiert worden ist. Zusätzlich zu diesen Spike-in-Proben wurden noch Einzelproben des Knochenmarks und der Zelllinien angefertigt. Die Erstellung von Kontrollen, Färbung und Analyse erfolgte gemäß Absatz 3.11. Gefärbt wurde neben dem Lebend-Tot-Farbstoff mit anti-CD45 und anti-EpCAM.

3.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von einzelnen Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Die Färbung und Fixierung der KMP erfolgte am Tag des Probeneinganges. Die Analyse dieser Proben am Durchflusszytometer erfolgte in der Regel am Folgetag, in Ausnahmefällen auch am selben Tag und bis zu 5 Tage danach. Dies ergab sich unter anderem dadurch, dass das Gerät am Wochenende nicht zur Verfügung stand. Die Analyse der Zelllinien am Durchflusszytometer erfolgte ein bis zwei Tage nach deren Färbung. Bei dem verwendeten Durchflusszytometer handelte es sich um ein Gerät des Typs Gallios, bei dem drei Laser und zehn Farben zu Verfügung standen. Für die folgenden Schritte wurden für das Durchflusszytometer geeignete Röhren verwendet. Der Diskriminator wurde bei 100 gesetzt.

3.11.1 Erstellung von Kontrollen und Kompensationen

Bei Beginn eines neuen Experimentes oder bei Veränderungen im experimentellen Aufbau wurden folgende Kontroll-Proben zur Einstellung des Durchflusszytometers und Erstellung der Kompensationen benötigt: (1) Mindestens 50.000 ungefärbte Zellen in PBS, (2) ein Tropfen negative Kontroll-Kompensations-Beads in 50 µl PBS und (3) Kompensationsbeads, welche mit Antikörpern gefärbt waren. Für die Kontrollen entsprechend (3) wurden in ein Röhren mit 50 µl PBS ein Tropfen negative Kontroll-Kompensations-Beads und ein Tropfen Anti-Maus-Ig-Beads gegeben. Anschließend wurden korrespondierend zu den verwendeten Antikörpern im jeweiligen experimentellen Ansatz je ein Röhren mit der im Experiment verwendeten Menge an Antikörper befüllt. Zusätzlich wurde eine Probe mit allen verwendeten Antikörpern gefärbt. Es folgte eine Durchmischung und Inkubationszeit von 10 Minuten. In alle Röhren von (1) bis (3) wurden 2 ml FACS-Puffer gegeben. Anschließend wurde eine Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 10 min durchgeführt. Der Überstand wurde durch Abkippen verworfen und der letzte Tropfen am Rand des Röhrens durch ein Papiertuch abgestrichen. Bei (1) erfolgte eine Blockierung der Fc-Rezeptoren durch die Zugabe von 2,5 µl AB-Serum und anschließender Inkubation für 5 min.

Zur Fixierung der Proben (1) bis (3) wurden anschließend 200 µl Fluoro-Fix-Puffer hinzugefügt, der für 20 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert wurde. Es folgte ein Waschschriff mit 2 ml FACS-Puffer und Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 10 min. Nach abermaligem Verwerfen des Überstandes wurden 200 µl FACS-Puffer zu den Proben gegeben. Bis zur Analyse am Durchflusszytometer wurden die Proben bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt. Vor der Analyse durch das Durchflusszytometer wurden die Proben 20 sec

gevoertext. Waren in der Probe Zellen enthalten, wurden diese auf ein FACS-Röhrchen mit einem durch PBS angefeuchteten 40 µm-Filter gegeben. Es wurde anschließend mit 100 µl PBS nachgespült.

Die Probe (1) wurde benötigt, um die richtigen Einstellungen bezüglich Größe und Granularität mittels Änderungen am Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Forward-Scatter; FS; Sideward-Scatter, SS) des Durchflusszytometers vorzunehmen. Die Proben (2) und (3) dienten zur Erstellung von Kompensationen. Diese werden benötigt, da es bei der Verwendung mehrerer Fluorochrome eine Überlappung ihrer Emissions-Spektren gibt. Durch rechnerische Vorgänge kann durch die Kompensation eine Korrektur dieser spektralen Überlappungen erfolgen. Die Erstellung der Kompensationen wurde dabei zum einen durch die Kaluza Analysis Software vorgenommen, zum anderen durch manuelle Veränderungen.

3.11.2 Färbung der Proben

Die zu analysierenden Zellen lagen in 30-50 µl PBS in einem Röhrchen vor. Von dem 1:1000 verdünnten Lebend-Tot-Farbstoff wurden 200 µl zu jeder Probe gegeben. Es schloss sich eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit an. Es erfolgte ein Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer wie unter 3.11.1 beschrieben. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Fc-Rezeptoren zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung von Antikörpern blockiert. Hierfür wurden pro Röhrchen 2,5 µl AB-Serum hinzugegeben. Im Falle einer höheren Anzahl an Röhrchen wurde ein Master-Mix mit 2,5 µl AB-Serum und 17,5 µl FACS-Puffer pro Röhrchen angesetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Dunkelheit erfolgte die Oberflächenfärbung mit primären Antikörpern oder den Isotyp-Kontrollen. Isotyp-Kontrollen wurden für diejenigen Oberflächenmarker erstellt, bei denen keine eindeutige Separierung der positiven und negativen Population zu erwarten oder die Separierung unbekannt war. Hierfür wurde die zur Probe gegebene Menge so gewählt, dass sich die gleiche Konzentration wie beim korrespondierenden Antikörper ergab. Die verwendeten Mengen an Antikörpern und Isotypen können Tabelle 3-18 entnommen werden. Für die Färbung wurde der Antikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle direkt zur Probe hinzugegeben oder bei höherer Anzahl an Röhrchen im Rahmen eines Master-Mixes mit FACS-Puffer, sodass sich hier ein Volumen von 20 µl pro Röhrchen ergab. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden die Zellen bis zur Analyse durch das Durchflusszytometer wie unter 3.11.1 beschrieben, beginnend mit der Fixierung, behandelt.

Tabelle 3-18 Verwendete Mengen an Antikörpern und Isotyp-Kontrollen.

Name	Antigen	Fluorchrom	Isotyp	Konzentration in µg/mL	Verwendete Menge in µl
CD326 (EpCAM) antibodies, anti-human	EpCAM	PE	mIgG1k	75	0,5
APC anti-human CD45 Antibody	CD45	APC	mIgG1k	9	1,25
FITC anti-human CD3 Antibody	CD3	FITC	mIgG2a	200	1,25
Brilliant Violet 510™ anti-human CD19 Antibody	CD19	BV510	mIgG1k	50	1,25
PE/Cy7 anti-human CD56 (NCAM) Antibody	CD56	PE-Cy7	mIgG1k	100	1,25
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD138 (Syndecan-1) Antibody	CD138	PerCP/Cyanine5	mIgG1k	400	1,25
Brilliant Violet 421™ anti-human CD27 Antibody	CD27	BV421	mIgG1k	50	1,25
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	PE/Dazzle	IgG2b, κ	200	1,25
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody	Iso f. EpCAM	PE	mIgG1	40	0,9375
APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody	Iso f. CD45	APC	mIgG1	200	1,2
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD138	PerCP/Cyanine5	mIgG1	400	2,5
Brilliant Violet 421™ Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD27	BV421	mIgG1	100	0,625
PE/Dazzle™ 594 Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Iso f. CD319	PE/Dazzle	mIgG2b	200	1,25

3.11.3 Analyse

Die Analyse der Durchflusszytometrie erfolgte mit Hilfe der Kaluza Analysis Software. Die durch die Proben aus Absatz 3.11.1 erstellte Kompensation wurde auf die jeweilige Messung übertragen. Die Gating-Strategie für KMP ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt. Mit dem Gate G wurde im Dotplot FS-SS auf die mononukleäre Population gated. Diese Population wurde dann in einem Dotplot von FS gegen eFluor780 betrachtet. Bei dem fixable Viability Dye eFluor780 handelt es sich um einen Vitalitätsfarbstoff, sodass durch das Gate K die lebenden mononukleären Zellen ausgewählt und für die weiteren Betrachtungen herangezogen wurden.

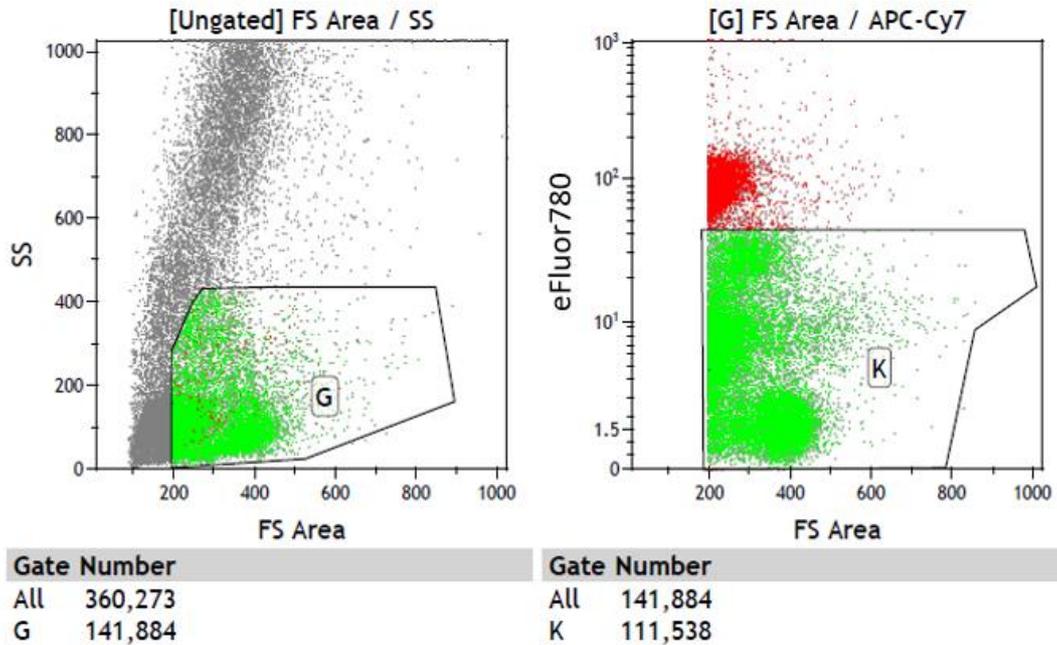


Abbildung 2 Gating-Strategie für Knochenmarkproben. Zu sehen sind zwei Dotplots derselben KMP. In dem ersten Dotplot sind Forward-Scatter (FS) und Sideward-Scatter (SS) gegeneinander aufgetragen. Das Gate G umfasst dabei die mononukleären Zellen. Die Zellen dieses Gates sind im zweiten Dotplot dargestellt. Hier ist der FS gegen den Vitalitätsfarbstoff eFluor780 aufgetragen.

3.12 Statistische Tests und Bioinformatik

3.12.1 Statistische Tests

Für die Berechnung von statistischen Tests wurde GraphPad Prism Version 8.4.0 verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt.

- Der Fisher's exact test wurde zweiseitig mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt.
- Zum Testen der Kontingenz wurde der zweiseitige nicht parametrische Test nach Spearman durchgeführt.
- Handelte es sich um den Vergleich von gepaarten Daten der Probe desselben Patienten oder derselben Patientin vor und nach Depletion wurde mit dem „Wilcoxon matched pairs signed rank“ Test ein nicht-parametrischer Test durchgeführt. Um das häufige Vorkommen des Wertes „0“ bei den EpCAM^{high} Zellen zu berücksichtigen, wurde in diesem Fall die Methode nach Pratt verwendet.
- Bei Vergleichen Zwischen Krebs- und KontrollpatientInnen kam der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test zur Anwendung.

3.12.2 Bioinformatik

Die folgenden bioinformatischen Analysen wurden durch Dr. Huiqin Koerkel-Qu durchgeführt. Dabei erfolgten bioinformatische Analysen der RNA-Sequenzierungsdaten von NCCs und DCCs, um diese zum einen mit Hilfe von Markern unterscheiden zu können. Außerdem sollten Cluster von Zellgruppen entsprechend der Expressionsdaten detektiert und näher betrachtet werden.

Für die Analysen in Absatz 4.2 wurden dabei 45 tief sequenzierte Zellen eingeschlossen. Die technischen Daten sowie die Qualitätsanalyse dieser RNA-Sequenzierung bei C. Irlbeck zu entnehmen (Irlbeck 2019). Ausgeschlossen wurden Zellen, deren Expression positiv für CD11, CD33, CD45 und Glykophorin A war, sodass für die Cluster-Analysen (Absatz 4.2.1) 43 Zellen in den weiteren Analysen berücksichtigt wurden. Für Abbildung 8 wurden die Gene, die zum Gene Ontology term „integral component of membrane“ (GO: 001621; 5899 Gene) gehören, auf die differenzielle Expression zwischen DCCs und NCCs hin untersucht.

Für die Cluster-Analysen in Absatz 4.2.1 erfolgte eine Dekontaminierung der Daten mit BioBloom (Chu et al. 2014) und eine Trimmung mit BBDuk. Die getrimmten Reads wurden unter der Verwendung der STAR Software (Dobin et al. 2013) auf das Referenzgenom Hg38 zugeordnet. Anschließend wurde die featureCount-Funktion der Subread Software (Liao et al. 2013) bestimmt, um die rohen Expressionsdaten der Zellen zu erhalten. Zellen mit einer Readanzahl von weniger als $10^{5.5}$ wurden herausgefiltert, ebenso Zellen mit einem Anteil an mitochondrialen Genen von mehr als 40 % sowie Zellen mit Expression von mehr als 16000 oder weniger als 3000 Genen. Nur die Gene mit einer durchschnittlichen Readanzahl größer als 1 und einer Expression in mindestens drei Zellen wurden berücksichtigt. Die Expression wurde durch das scran-Pakets in der Software Bioconductor (Lun et al. 2016) logarithmisch normalisiert.

Anschließend wurde ein Verfahren zur Dimensionsreduktion verwendet, die Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP; McInnes et al. 2018). Dies erfolgte durch das scater-Paket mittels runUMAP (McCarthy et al. 2017). Das Clustern erfolgte durch buildSNNGraph (McCarthy et al. 2017) sowie durch cluster_walktrap in igraph (Csardi und Nepusz 2006) basierend auf der UMAP-Dimensionsreduktion. Der Microenvironment Cell Populations-Counter (MCP-Counter) wurde auf die logarithmisch normalisierten Expressionsdaten aller Zellen angewendet, um einzuschätzen, ob es sich um Immunzellen handelte (Becht et al. 2016; Sturm et al. 2019). Die Marker für die Knochenmarkpopulationen wurden einem Knochenmarkatlas entnommen (Hay et al. 2018), wobei für jeden Zelltyp nur die Marker mit der höchsten Expression gezeigt wurden.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von EpCAM^{high} Zellen, also stark EpCAM-positiven Zellen. Unter diesen finden sich sowohl disseminierte Krebszellen (disseminated cancer cells, DCCs) als auch nicht-Krebszellen (non cancer cells, NCCs). Diese NCCs kontaminieren die Population der DCCs. Deshalb sollten neue Marker gefunden werden, um NCCs detektieren und so von DCCs unterscheiden zu können. Dafür wurden zu Beginn NCCs und DCCs aus Knochenmarkproben (KMP) von Kontroll- und KrebspatientInnen aus der Probenbank des Lehrstuhls untersucht. Dabei wurde eine RNA-Sequenzierung zur Identifizierung dieser Zellen durchgeführt und anschließend differenziell exprimierte Marker für die weitere Untersuchung ausgewählt (Absatz 4.2). Als nächster Schritt wurden frische KMP von Kontroll- und KrebspatientInnen (Absatz 4.1) mittels Durchflusszytometrie (DZM) auf das Vorkommen dieser Marker getestet. Dafür wurde die Detektion von DCCs in der DZM neu etabliert. Außerdem wurde die Zusammensetzung der KMP in der DZM allgemein betrachtet (Absatz 4.3).

Auch in der Fluoreszenzmikroskopie wurden KMP auf die potenziellen Marker für NCCs untersucht (Absatz 4.4). Abschließend wurde die Expression der Marker in verschiedenen Brustkrebszelllinien ermittelt (Absatz 4.5).

4.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit setzte sich aus 25 KMP sowohl von M0-KrebspatientInnen als auch von KontrollpatientInnen zusammen. Diese wurden im Zeitraum zwischen Oktober 2019 und Januar 2020 erhalten. Die genaue Zusammensetzung des Kollektivs ist Tabelle 4-1 zu entnehmen. Die Proben der KontrollpatientInnen stammten aus Femur und Acetabulum. Die KMP von KrebspatientInnen wurden aus dem Beckenkamm gewonnen (Absatz 2.1.2).

Tabelle 4-1 Verteilung der erhaltenen KMP auf die verschiedenen Patientengruppen.

Patientengruppe	Gesamtzahl PatientInnen	Durchschnittliches Alter bei Operation in Jahren
Blasen-Karzinom	11	66
Prostata-Karzinom	1	59
Mamma-Karzinom	6	58
KontrollpatientInnen	7	66

Die Proben der KrebspatientInnen wurden bis auf eine Ausnahme immer auf EpCAM^{high} Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie wie unter Absatz 3.1.2 beschrieben gescreent. Die Proben der KontrollpatientInnen wurden gescreent, sofern die personellen Kapazitäten dies zuließen (Tabelle 4-2). Die Einzelzellen wurden gewonnen und vorbereitet für weitere Analysen zur Vergrößerung der Biobank (RNA-Sequencing, lowPass).

Tabelle 4-2 Überblick über die prozessierten KMP. FZM = Fluoreszenzmikroskop.

Patientengruppe	Gesamtzahl PatientInnen	Im FZM Gescreente Proben	Anteil Proben mit EpCAM^{high} Zellen an gescreenten Proben im FZM
Blasen-Karzinom	11	10/11 (91 %)	6/10 (60 %)
Prostata-Karzinom	1	1/1 (100 %)	0/1 (0 %)
Mamma-Karzinom	6	5/6 (83 %)	4/5 (80 %)
KontrollpatientInnen	7	2/7 (29 %)	1/2 (50 %)

4.2 Charakterisierung der EpCAM^{high} Zellen anhand des Transkriptoms

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die EpCAM^{high} Zellen von KontrollpatientInnen ohne bekannte Krebserkrankung und von KrebspatientInnen näher untersucht werden, um zwischen NCCs und DCCs differenzieren zu können. Deshalb wurden für diese Arbeit die Ergebnisse einer RNA-Sequenzierung von DCCs und NCCs näher betrachtet. In die Analyse wurden 44 EpCAM^{high} Zellen eingeschlossen. Diese stammten aus dem Knochenmark sowohl von Brustkrebspatientinnen im M0- oder M1-Stadium als auch von KontrollpatientInnen. Haupteinschlusskriterium für die EpCAM^{high} Zellen als DCCs war dabei, dass das genomische Profil dieser Zellen mittels metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) als aberrant ermittelt worden war. Zusätzlich wurde auch eine experimentelle qPCR Signatur zur Identifikation der echten DCCs eingesetzt. Die genaue Methodik hierfür ist bei C. Irlbeck nachzulesen (Irlbeck 2019). Von KontrollpatientInnen wurden die Zellen eingeschlossen, deren Genom eine Normalzell- oder intermediäre Signatur aufwies (Irlbeck 2019). Erst nach der Auswahl der Zellen für die RNA-Sequenzierung lagen die Ergebnisse der lowPass-Sequenzierung vor. Dadurch stellte sich rückwirkend heraus, dass auch zwei DCCs mit balanciertem Genom und eine NCC mit aberrantem Genom in die Analyse eingeschlossen wurden. Bei einigen Zellen war keine Zuordnung des Genoms möglich. Die genauen Charakteristika sind in Tabelle 4-3 zu sehen.

Tabelle 4-3 Überblick über die in die RNA-Sequenzierung eingeschlossenen Zellen. Die Klassifikation in die drei Kategorien bezüglich des Genoms (aberrant, balanciert, unklar) erfolgte anhand der Ergebnisse im Low-Pass Whole Genome Sequencing.

Zelltyp	Gesamtanzahl Zellen	Genom aberrant	Genom balanciert	Genom unklar
M0 DCC	24	16	2	6
M1 DCC	9	9	0	0
NCC	11	1	1	9

4.2.1 Clusteranalyse von EpCAM^{high} Zellen

Um die Identität der NCCs näher zu bestimmen, wurde zur Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten ein Verfahren zur Dimensionsreduktion angewendet, die Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP, Abbildung 3). Entsprechend der UMAP-Analyse bildeten die EpCAM^{high} Zellen der KontrollpatientInnen ein eigenes Cluster. Dabei clusterten auch Zellen von KontrollpatientInnen in der M0 Gruppe. Einige der Zellen von M1-PatientInnen grenzten sich als nicht scharf trennbares eigenes Cluster ab. Diese Cluster wurden weiteren Analysen unterzogen.

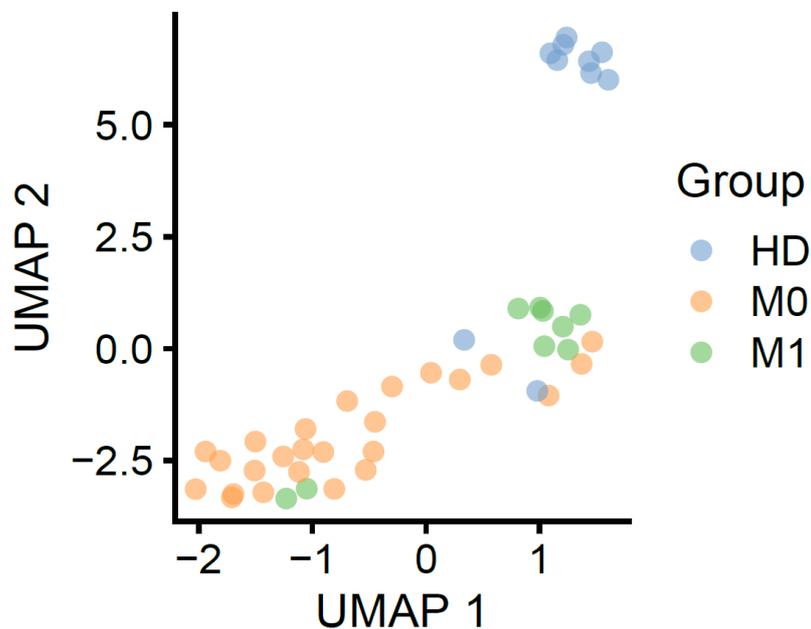


Abbildung 3 Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) Cluster von EpCAM^{high} Einzelzellen. Der Status der PatientInnen, von welchen die Zellen stammen, ist der farblichen Kodierung zu entnehmen (M0 und M1 = BrustkrebspatientInnen im jeweiligen Stadium, HD = healthy donor). Das Clustering in zwei Dimensionen identifizierte zwei klar trennbare Cluster, wobei eines ausschließlich Zellen von HDs enthält. Als nicht scharf abgrenzbare Gruppe liegen einige der M1 Zellen zusammen.

Anschließend sollte die Identität der einzelnen Cluster analysiert werden. Mithilfe der Microenvironment Cell Populations-counter (MCP-counter) Methode ist es möglich, das Vorkommen von acht Immunzellpopulationen und zwei Stromazellpopulationen anhand von Transkriptomdaten zu quantifizieren (Becht et al. 2016).

Der Abbildung 4 ist zu entnehmen, dass das Cluster der HD eine hohe Übereinstimmung der Expression mit B-Zellen zeigte. Auffallend war zudem ein schwaches Vorkommen dieser Signaturen auch in den Clustern der putativen DCCs, vor allem der B-Zell-Signatur und Neutrophilen-Signatur.

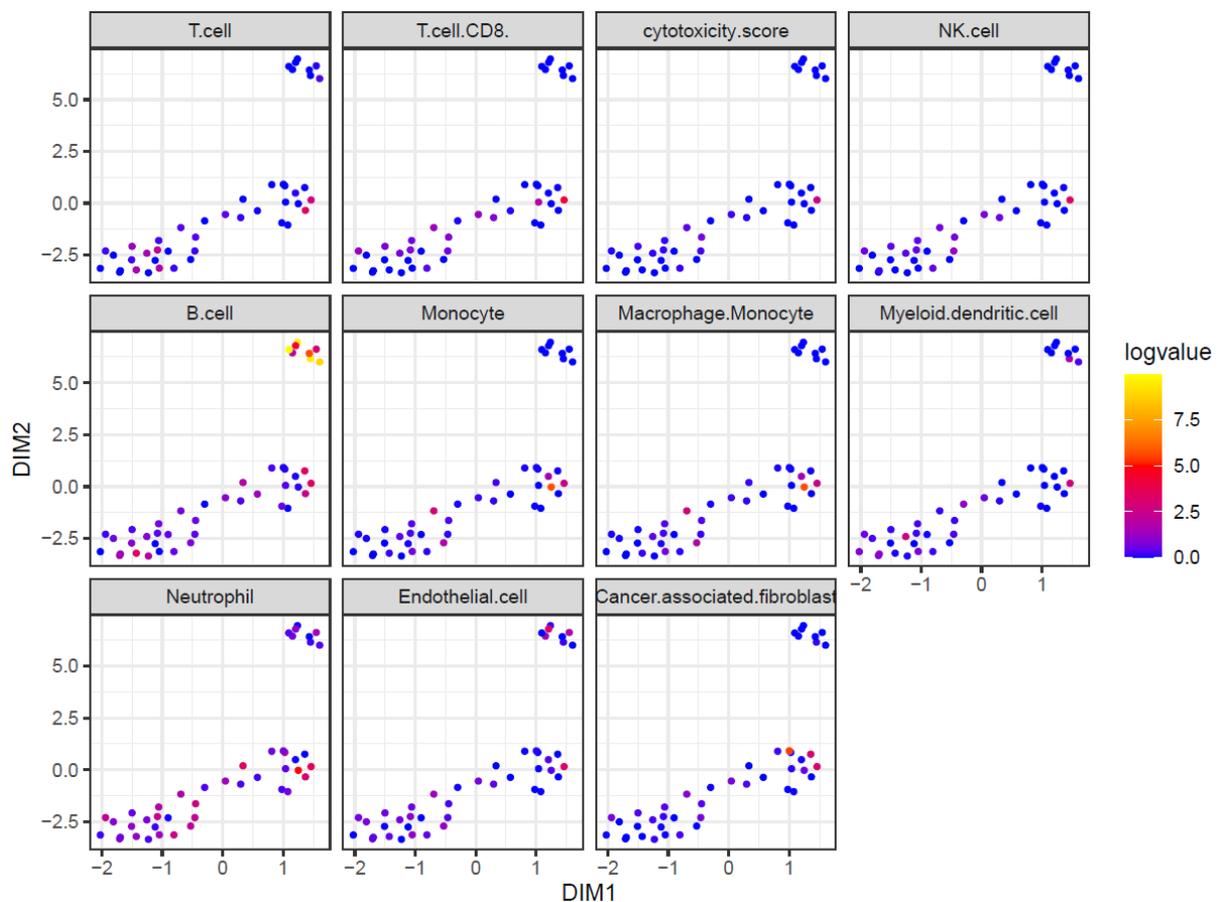


Abbildung 4 Analyse der Transkriptomdaten von EpCAM^{high} Zellen mithilfe der Microenvironment Cell Populations-counter Methode (MCP-counter). Dargestellt ist das Expressionsniveau der einzelnen Signaturen für die jeweiligen Zelltypen in jeder einzelnen Zelle. Das Clustering entspricht Abbildung 3. Aufgeführt ist die Analyse für acht verschiedene Immunzellen sowie zwei Stromazellpopulationen. Der farblich kodierte „logvalue“ gibt log-normalisiert an, wie stark die Expression der Signatur in der jeweiligen Zelle ist. Je höher der Wert, desto mehr entspricht die Expression der jeweiligen Population.

Da keine Plasmazellmarker in der Arbeit von Becht et al. beinhaltet waren, wurden die Zellen zusätzlich auf den Plasmazellmarker MZB1 getestet (Hay et al. 2018). Dabei zeigte sich im NCC-Cluster eine hohe Expression dieses Markers (Abbildung 5).

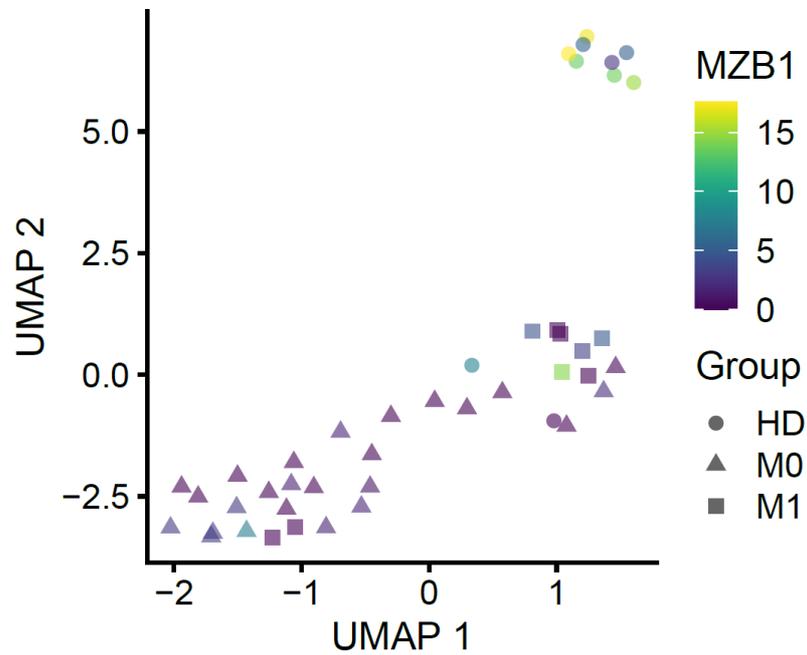


Abbildung 5 Expression des Plasmazellmarkers MZB1 in den Clustern gemäß UMAP. Zu sehen sind die zwei Cluster entsprechend den Analysen in Abbildung 3. Dargestellt ist die Expression des Markers MZB1.

Die Cluster der putativen DCCs wiesen entsprechend Abbildung 4 in geringer Ausprägung die Signaturen von Neutrophilen und B-Zellen auf. Das Vorkommen von Immunmarkern auf potenziellen DCCs sollte näher untersucht werden. Deshalb wurden die Cluster auf das Vorkommen von spezifischen Markern von 27 bekannten Populationen des menschlichen Knochenmarks getestet. Diese Marker entstammen einem menschlichen Knochenmarkatlas (Hay et al. 2018). Eine Überexpression in den putativen DCCs fand sich dabei entsprechend Abbildung 6 für die vier Marker RPS27 (T-Zellen), FTL (unreife Neutrophile), UHRF1 (lymphoide Progenitorzellen) und STMN1 (Pro-B-Zellen).

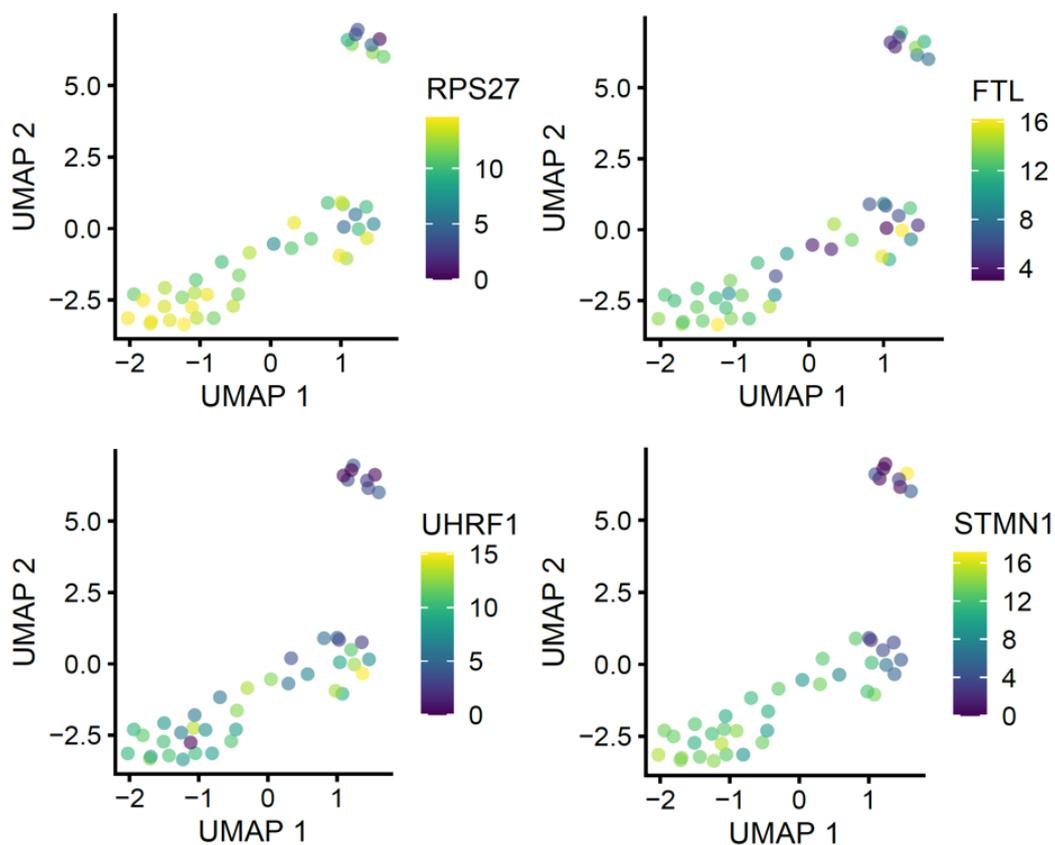


Abbildung 6 Expression der Marker mit hoher Expression in putativen DCCs. Dargestellt ist die Expression der vier Marker RPS27, FTL, UHRF1 und STMN1, die gemäß einem Knochenmarkatlas bestimmten Zelltypen entsprechen. Die Cluster sind entsprechend Abbildung 3 abgebildet.

Dabei stellte sich die Frage, ob es sich bei den putativen DCCs tatsächlich um diese genannten Populationen handelte, da die Signaturen nur zur Identifizierung von Zelltypen im Knochenmark entworfen worden sind. Auch eine Expression dieser Marker auf normalem oder kanzerösem Brustgewebe könnte dieses Expressionsmuster erklären. Als Vergleichszellen wurden daher Zellen aus einem Ansatz zur Modellierung von DCCs herangezogen. Hierbei handelte es sich um eine primäre Kultur von normalen Brustepithelzellen. Die genaue Methodik

der Gewinnung dieser Zellen und deren Herkunft kann der Arbeit von A. Grujovic entnommen werden (Grujovic 2019). Dabei ergaben sich entsprechend dem Proliferations- und sphärenbildendem Verhalten der Zellen eine Klassifikation in drei Gruppen, die sich zum Teil auch in drei Clustern gemäß UMAP widerspiegelte (Abbildung 7). Wie in Abbildung 7 zu erkennen, zeigten auch normale Brustepithelzellen eine Expression der vier Marker.

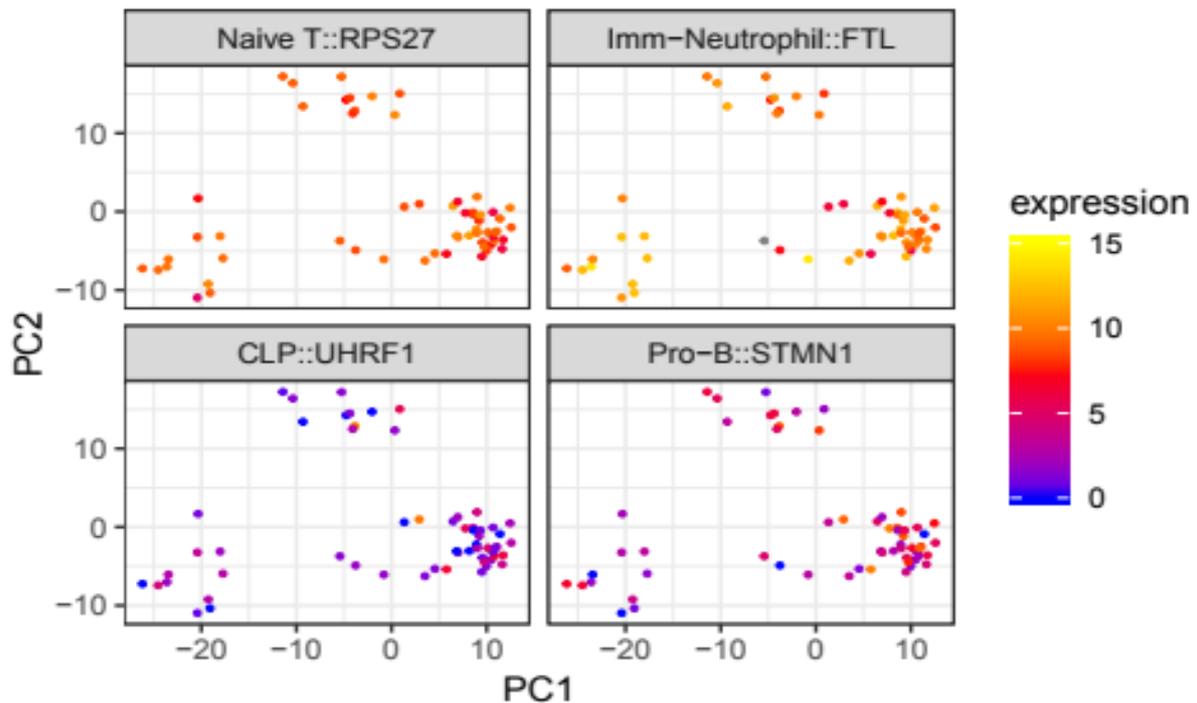


Abbildung 7 Expression der Marker mit hoher Expression in putativen DCCs in normalen Brustepithelzellen. Dargestellt sind die Marker, die entsprechend Abbildung 6 in DCCs überexprimiert sind. Dieselbe Analyse wurde an Zellen aus einer Kultur normaler Brustepithelzellen durchgeführt. Entsprechend des Proliferationsverhaltens und der sphärenbildenden Eigenschaft der Zellen gab es bei A. Grujovic eine Einteilung in drei Gruppen, die sich hier zum Teil in den drei Clustern widerspiegelt (Grujovic 2019).

4.2.2 Differenziell exprimierte Gene bei EpCAM^{high} Zellen von Kontroll- und BrustkrebspatientInnen

Es sollten Oberflächenmarker identifiziert werden, mit welchen EpCAM^{high} DCCs von NCCs unterschieden werden können. Alle Gene, die zum Gene Ontology term „integral component of membrane“ (GO: 001621; 5899 Gene) gehören, wurden auf die differenzielle Expression zwischen DCCs und NCCs hin untersucht. Damit sollte nach Oberflächenmarkern gesucht werden, die DCCs und NCCs voneinander unterscheiden. In der Heatmap (Abbildung 8) werden die Gene gezeigt, die in putativen DCCs überexprimiert waren. Außerdem sind die Gene abgebildet, die in NCCs eine Überexpression zeigten.

Auf Basis dieser Analyse wurden Gene zur weiteren Betrachtung ausgewählt. In der Population der DCCs fand sich kein Marker, der über alle Zellen hinweg exprimiert wurde und sich daher als Positivmarker eignen könnte. Deshalb wurden Marker aus der NCC-Population ausgewählt. Diese sollten zukünftig als Negativmarker bei der Detektion von EpCAM^{high} DCCs dienen, demnach also auf der Zellmembran von NCCs vorhanden sein. Hierfür wurden *CD27* und *CD319* (= *SLAMF7*) für die nachfolgenden Experimente ausgewählt. Bei den beiden Markern handelt es sich um Marker für Immunzellen, die unter anderem auf Plasma- und B-Zellen vorkommen (Woo et al. 2013; Grant et al. 2017). Zum einen wurden diese Marker gewählt, da sie in den meisten NCCs exprimiert waren und in den DCCs nicht oder nur schwach. Zum anderen gibt es für die beiden Marker als CD-Marker viele kommerziell erhältliche Antikörper mit einer großen Auswahl an konjugierten Fluorophoren.

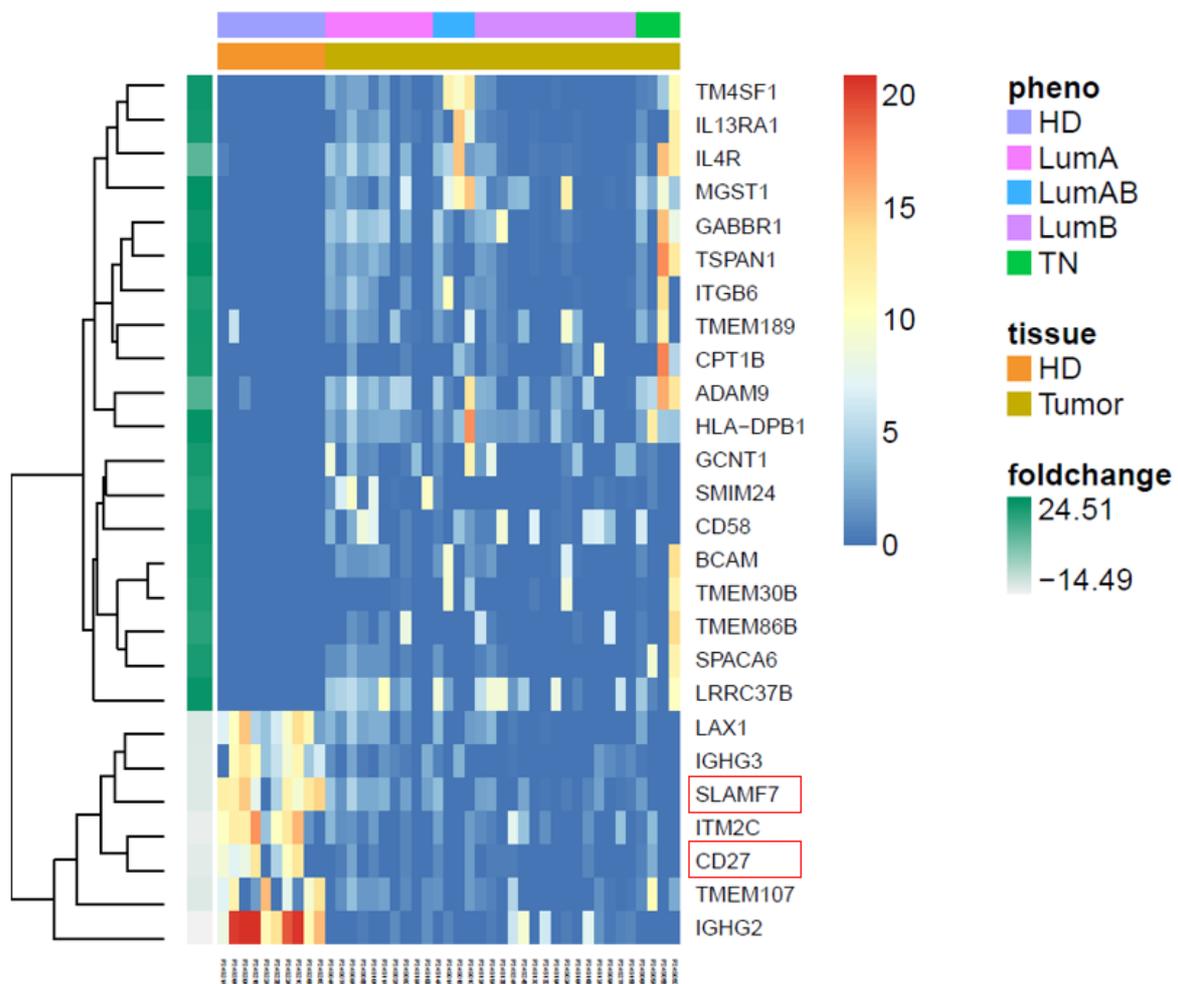


Abbildung 8 Differenziell exprimierte Gene von integralen Membrankomponenten zwischen NCCs und DCCs.

Die Heatmap zeigt die normalisierten log-normalisierte Readanzahl (= Expression) der jeweiligen Gene. Jede Reihe gibt dabei die Expression des rechts angeführten Gens an. Die farbigen Balken oben geben die Herkunft der Zelle an (Kontroll- oder BrustkrebspatientInnen mit Subtypen; HD = Healthy Donor, LumA/B = Luminal A/B, TN = Triple-negativ), die von je einer Spalte repräsentiert wird. Mit roten Rechtecken sind die zwei Gene hervorgehoben, die im Folgenden näher untersucht worden sind.

Analog zu der Oberflächenmarker-Analyse wurden auch die differenziell exprimierten Gene betrachtet, die nicht auf der Membran lokalisiert sind (Abbildung 34 im Anhang). Demzufolge sind unter anderem Immunglobuline in den NCCs vermehrt exprimiert. Diese werden durch Plasma- und B-Zellen produziert. Demnach weist die RNA-Sequenzierung sowohl bezüglich membranständiger als auch nicht-membranständiger Gene auf eine Identität der NCCs als Plasma- oder B-Zellen hin.

4.3 Durchflusszytometrie von Knochenmarkproben

Um die Expressionsdaten der RNA-Sequenzierung zu validieren, wurden KMP von Krebs- und KontrollpatientInnen (Absatz 4.1) mittels DZM auf die zuvor selektierten Marker CD27 und CD319 hin untersucht. Nach dem Entwurf des Panels (Absatz 4.3.1) war zusätzlich von Interesse, welche Auswirkungen der Depletion in der DZM zu erkennen sein würden (Absatz 4.3.2). Zur Untersuchung der Marker CD27 und CD319 wurde zunächst die leicht EpCAM⁺ Population (EpCAM^{dim}) betrachtet (Absatz 4.3.3). Abschließend wurde die Zielpopulation der Marker, die stark EpCAM⁺ Zellen (EpCAM^{high}), untersucht (Absatz 4.3.4).

4.3.1 Entwurf und Anwendung des Panels

Anfangs wurde ein Panel mit neun Farben entworfen, das nach der Färbung von Proben der ersten 18 PatientInnen auf ein kleineres Panel umgestellt wurde. Da es sich bei den Markern CD27 und CD319 um Marker für Immunzellen handelt, wurden zu Beginn Antikörper gegen zahlreiche Immunzellen (CD45, CD3, CD19, CD56, CD138) in das Panel eingeschlossen, um die Zellen näher charakterisieren zu können (Tabelle 4-4). Bei den letzten sieben PatientInnen wurde aus Kostengründen und bei nicht zu erwartendem zusätzlichen Informationsgewinn nicht mehr für CD3, CD19, CD56 und CD138 gefärbt.

Tabelle 4-4 Liste der Antikörper und ihres Verwendungszwecks des großen Panels.

Antigen	Fluorochrom	Zweck
EpCAM	PE	Identifizierung der DCCs oder NCCs
CD27	BV421	Validierung der RNA-Sequenzierung
CD319	PE-Dazzle	Validierung der RNA-Sequenzierung
CD45	APC	Identifizierung des Zelltyps: Leukozyt
CD3	FITC	Identifizierung des Zelltyps: T-Zelle
CD19	BV510	Identifizierung des Zelltyps: B-Zelle
CD56	PE-Cy7	Identifizierung des Zelltyps: NK-Zelle
CD138	PerCP/Cyanine5	Identifizierung des Zelltyps: Plasmazelle

4.3.2 Einfluss der Depletion auf die Zusammensetzung des Knochenmarks

Der Vorgang der Depletion ist sehr zeit- und kostenintensiv. Bei 22 der analysierten Proben war ein direkter Vergleich der Proben in der DZM vor und nach Depletion möglich. Die DZM-Analysen wurden deshalb dahingehend betrachtet, ob sich der gewünschte Effekt einstellte. Durch die Depletion sollte der Anteil der DCCs erhöht werden, indem potenziell kontaminierende Zelltypen entfernt wurden. Hierfür wurden Antikörper gegen CD33 (myeloische Zellen), CD11b (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen), Glycophorin A (Erythrozyten) und CD45 (Leukozyten) verwendet (siehe auch Absatz 3.1.1).

Durch die manuelle Zählung in der Fluoreszenzmikroskopie war die Zusammensetzung der Proben und die Veränderung der Zellzahlen durch die Depletion ersichtlich (Abbildung 9). Die Gesamtzahl der MNZ bei KrebspatientInnen sank um durchschnittlich 90 % (Wilcoxon-Test, $p < 0,0001$) und bei KontrollpatientInnen um 88% (Wilcoxon-Test, $p = 0,001$). Bei KrebspatientInnen waren vor Depletion 39 % der Zellen Erythrozyten, bei KontrollpatientInnen betrug dieser Anteil 52 %. Die Anzahl der Erythrozyten wurden bei KrebspatientInnen signifikant im Durchschnitt um 99% verringert (Wilcoxon-Test, $p < 0,0001$), bei KontrollpatientInnen um 80% (Wilcoxon-Test, $p = 0,02$).

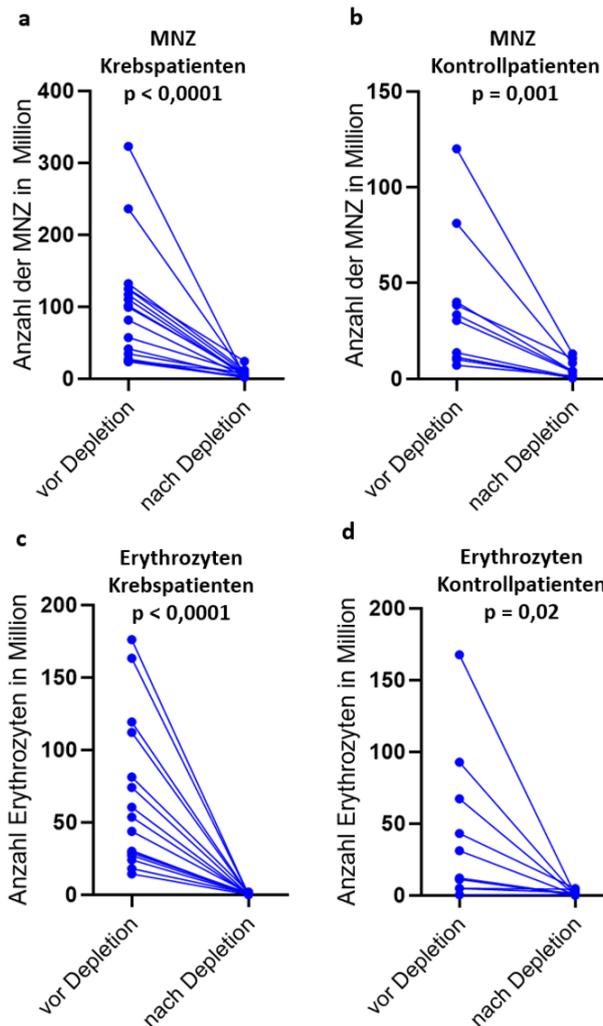


Abbildung 9 Änderung der Anzahl der mononukleären Zellen und Erythrozyten bei Kontroll- und KrebspatientInnen durch die Depletion. In (a) und (b) sind die Änderungen der Anzahl der mononukleären Zellen (MNZ) bei Krebs- und KontrollpatientInnen abgebildet. In (c) und (d) ist die Veränderung in der Anzahl der Erythrozyten bei den beiden Patientengruppen zu sehen. Die statistischen Tests wurden nach dem Wilcoxon-Test berechnet.

Durch die DZM war es zusätzlich möglich, die Änderung der Zusammensetzung der Proben durch die Depletion zu beurteilen. Die Proben wurden deshalb, sofern ausreichend Zellen vorhanden waren, sowohl vor als auch nach der Depletion für die DZM gefärbt. Wie unter Kapitel 3.1.1 erwähnt, wurden die Proben der ersten vier KontrollpatientInnen aus Acetabulum und Femur als zwei Proben behandelt. Daher ergibt sich für die Übersicht in Tabelle 4-5 eine höhere Probenanzahl als die Anzahl der eingeschlossenen PatientInnen. Tabelle 4-5 ist zu entnehmen, wie vielen Proben zu welchem Zeitpunkt der Depletion durch die DZM analysiert werden konnten.

Tabelle 4-5 Überblick über die gefärbten Knochenmarkproben in Bezug auf ihren Depletionsstatus.

	Gesamtzahl	Nur vor Depletion	Nur nach Depletion	Vor und nach Depletion
Knochenmarkproben	29	3	4	22

Für die Auswertung der Proben in der DZM nach Depletion ergab sich das Problem, dass die Proben bezüglich des Markers CD45 nicht mehr direkt zu den Proben vor Depletion vergleichbar waren. Zu beobachten war eine Verschiebung der Proben in Richtung APC-Positivität im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Depletion. Dies kam dadurch zustande, dass in der Depletion APC-gebundene Antikörper verwendet wurden (Absatz 3.1.1). Da nicht alle APC-gefärbten Zellen durch die Beads und den Magneten erfasst werden, ergibt sich für Proben nach Depletion eine APC-Hintergrundfärbung. Diese APC-Positivität war auch bei Proben der Isotyp-Kontrolle zu beobachten, wie in Abbildung 10 zu erkennen ist. Während vor der Depletion (a) der Grenzwert für eine APC-Positivität zwischen 1 und 10 gezogen werden konnte, lag dieser Wert nach Depletion (b) zwischen 10 und 100. Zudem fand sich nach Depletion eine APC-positive Population. Durch die APC-Hintergrundfärbung konnte die Grenze zwischen positiv und negativ nach Depletion nicht mehr aufgrund des Isotypen gezogen werden. Außerdem waren die APC-positiven Zellen nach Depletion nicht mehr spezifisch für CD45 positiv, sondern konnten auch CD33 oder CD11b positiv sein, da auch die Antikörper gegen diese Marker in der Depletion an APC gekoppelt waren.

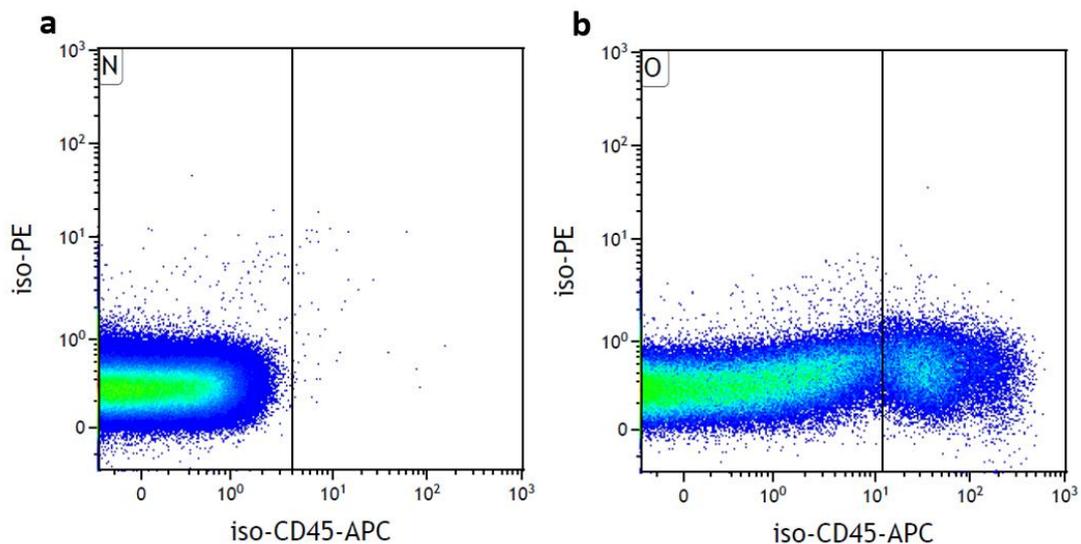


Abbildung 10 Einfluss der Depletion auf den Isotyp. Abgebildet ist der Dotplot der Isotyp-Kontrolle von APC aufgetragen gegen den Isotyp von PE der KMP desselben Kontrollpatienten. (a) vor Depletion. (b) nach Depletion. Nach der Depletion wurde der Grenzwert so gesetzt, dass die sichtbaren zwei Populationen zwischen Isotyp und neu APC-gefärbten Zellen getrennt worden sind. Die hier positiven Zellen stellen APC-markierte Zellen dar, die nicht durch die Magneten depletiert worden sind.

Aussagen über die Effektivität der Depletion von Erythrozyten durch Glycophorin A konnten nicht getroffen werden, da Erythrozyten wegen ihrer geringen Größe nicht durch das Durchflusszytometer berücksichtigt worden sind. Auch der Effekt von CD33 in der Depletion konnte nicht beurteilt werden, da keine myeloischen Markern im Panel verwendet worden sind. Von Interesse war daher, wie sich die Depletion von CD45 und CD11b auf die Probenzusammensetzung auswirkt. Wie Abbildung 11 zu entnehmen ist, fand sich sowohl vor als auch nach Depletion eine Population an leicht CD45⁺ (CD45^{dim}) Zellen. Diese exprimierte zum Teil die Immunmarker CD27, CD19, CD319 und CD138 und war sowohl vor als auch nach Depletion vorhanden. Durch Depletion verschwand allerdings eine Population an stark CD45⁺ (CD45^{high}) Zellen, die die Immunmarker in bestimmter Zusammensetzung trug. So wurden dadurch CD3⁺ Zellen fast vollständig depletiert und auch der Anteil an CD27⁺ Zellen wurde stark verringert.

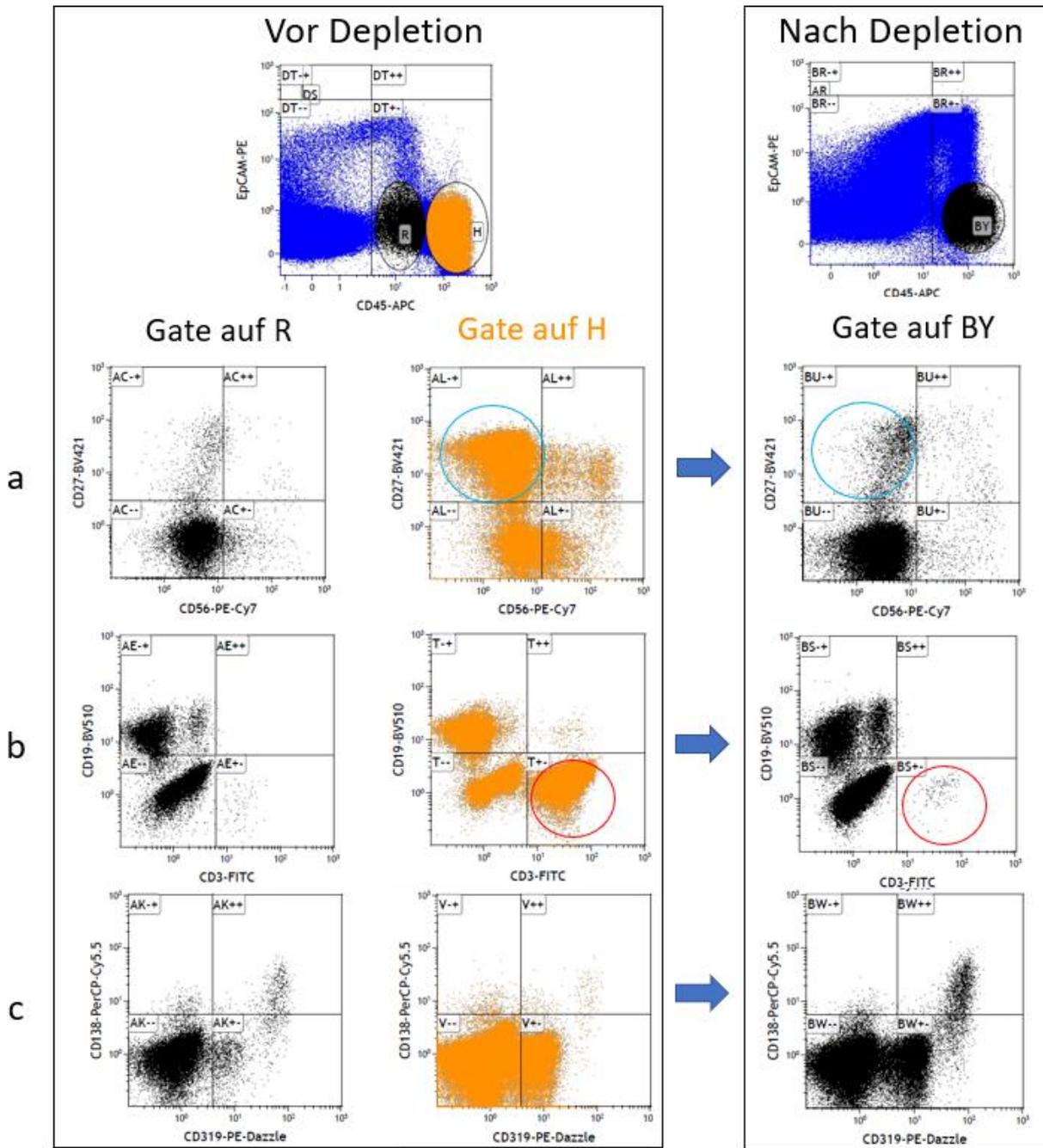


Abbildung 11 Auswirkung der Depletion auf die Zusammensetzung des Knochenmarks Dargestellt sind die Dotplots einer Probe desselben Kontrollpatienten vor (linker Kasten) und nach (rechter Kasten) Depletion. Der Dotplot in der ersten Reihe zeigt jeweils das CD45-Signal gegen das EpCAM-Signal. Dabei ist die oben erläuterte Verschiebung in Richtung APC-Positivität durch die Depletion zu erkennen, da die Grenze für die CD45-Positivität nach der Depletion weiter rechts zu finden ist. Anschließend wurde auf die EPCAM-negativen (EPCAM^{neg}) und leicht CD45-positiven (CD45^{dim}) (Gate R bzw. BY) bzw. stark CD45-positiven (CD45^{high}) (Gate H) Population gated. Die CD45^{dim} Zellen sind schwarz dargestellt, die CD45^{high} Zellen orange. Die Zellen in diesen Gates wurden hinsichtlich der Expression der verschiedenen Immunmarker untersucht. In den Reihen (a) bis (c) sind die verwendeten Immunmarker gegeneinander aufgetragen. Nach Depletion findet sich die CD45^{high} Population (H) nicht mehr, sodass sich die Immunmarkerzusammensetzung der Gates R und BY einander ähneln. Nach Depletion fehlen damit vor allem viele der CD27⁺ Zellen (blaue Kreise) und CD3⁺ Zellen (rote Kreise) im Gegensatz zu vor der Depletion.

Statistisch wurde untersucht, ob der Anteil der CD45-negativen Population an der betrachteten Zellpopulation, den lebenden mononukleären Zellen (MNZ), durch die Depletion steigt. Dies wäre durch die Verwendung des CD45-Antikörpers in der Depletion zu erwarten. In Bezug auf alle Proben gab es keine signifikante Anreicherung der CD45-negativen Zellen (Wilcoxon-Test, $p = 0,19$). Betrachtet man jedoch die Krebs- und KontrollpatientInnen getrennt, beobachtet man für die Proben der KrebspatientInnen eine signifikante Anreicherung, der Median stieg von 80,5 % auf 88,5 % (Wilcoxon-Test, $p = 0,03$). Hier und im Folgenden wird der Median der Patientengruppen betrachtet, da es einige extreme Werte gab, die zur Verzerrung der Durchschnittswerte führen. Bei den Proben der KontrollpatientInnen lag ein nicht signifikantes Absinken der CD45-negativen Population (83,4 % auf 83 %; Wilcoxon-Test, $p = 0,84$; Abbildung 12) vor.

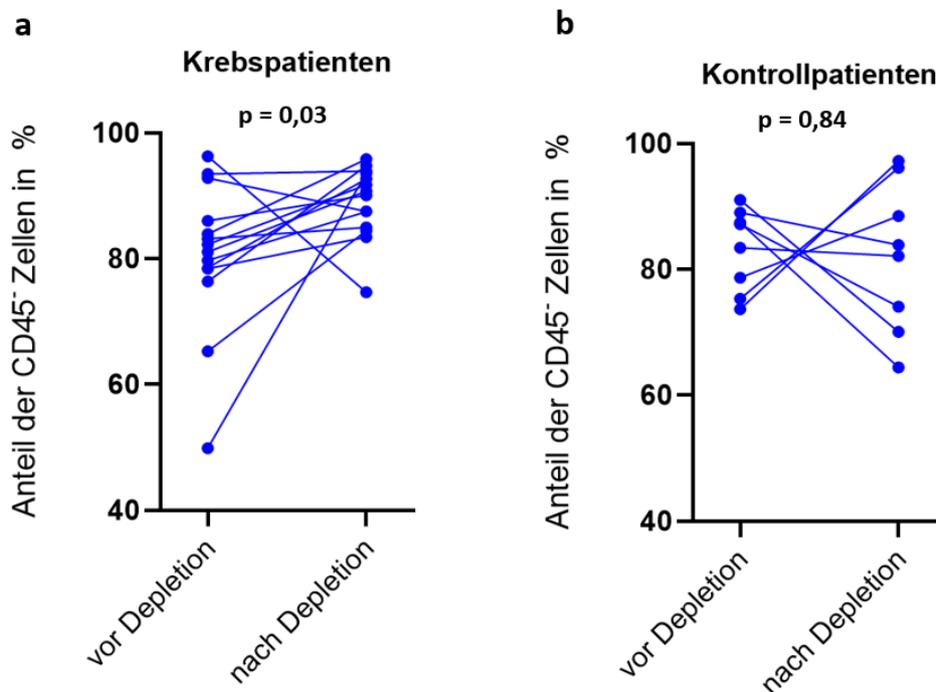


Abbildung 12 Veränderung des Anteils der CD45-negativen Zellen durch die Depletion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD45-negativen Zellen in Bezug auf die Gesamtpopulation der lebenden, mononukleären Zellen vor und nach Depletion bei Krebs- (a) und KontrollpatientInnen (b). Zwei verbundene Punkte stellen die Werte derselben Probe vor und nach Depletion dar. Die statistischen Berechnungen wurden mit den Zellzahlen und nicht den abgebildeten Prozentwerten nach dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

4.3.3 EpCAM^{dim} Population im Knochenmark

Beim Screening auf den Marker EpCAM sind im Fluoreszenzmikroskop zahlreiche leicht gefärbte Zellen (EpCAM^{dim} Zellen) sichtbar. Diese erschweren das Screenen auf die gesuchten stark EpCAM⁺ Zellen (EpCAM^{high} Zellen). Deshalb wurde die EpCAM^{dim} Population näher in der DZM betrachtet (Abbildung 13). Der durchschnittliche Anteil der EpCAM^{dim} Zellen an den lebenden MNZ der KMP stieg durch die Depletion statistisch signifikant (Wilcoxon-Test, $p < 0,001$) von durchschnittlich 2 % vor auf 15 % nach Depletion. Dabei lag der Wert vor Depletion sowohl bei Krebs- als auch bei KontrollpatientInnen bei 2%. Nach Depletion betrug der Wert bei KrebspatientInnen durchschnittlich bei 16 % und bei KontrollpatientInnen bei 13 % und unterschied sich dabei nicht signifikant (Mann-Whitney Test, $p = 0,32$).

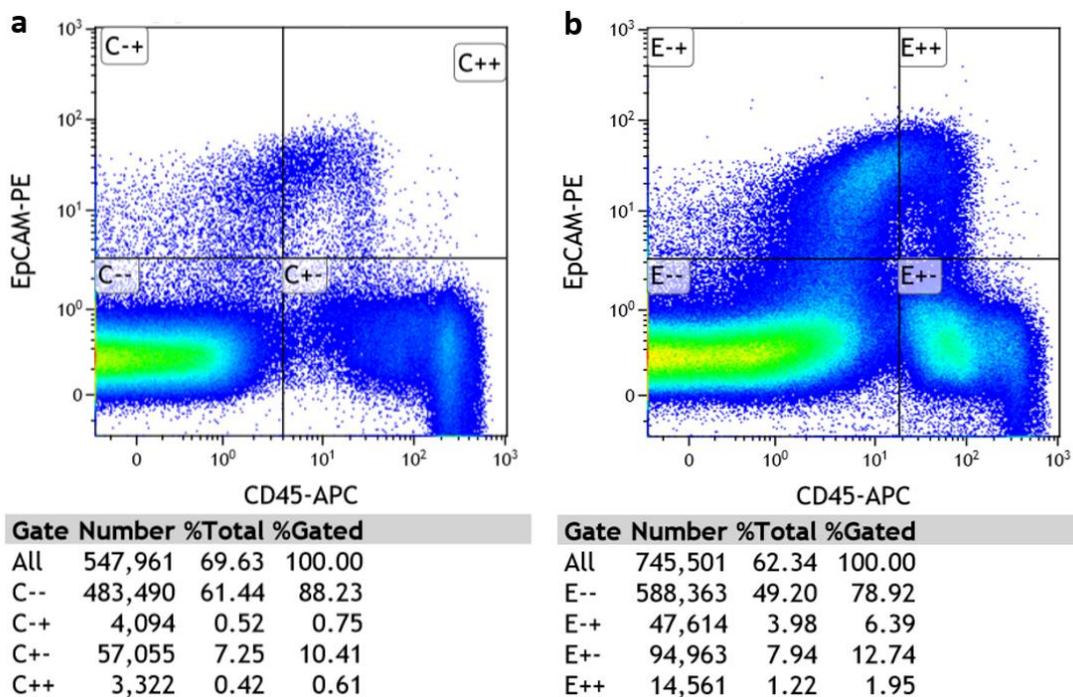


Abbildung 13 EpCAM^{dim} Population eines Kontrollpatienten. Es handelt sich um den Dotplot von CD45 gegen EpCAM einer Probe des gleichen Patienten vor (a) und nach (b) Depletion. Die EpCAM^{dim} Population findet sich in den Gates C-+ und C++ (a) bzw. E-+ und E++ (b). Die zugehörigen Isotypen finden sich in Abbildung 10. Der gesamte Anteil dieser Population lag bei dieser Probe bei 1,36 % bzw. 8,34 %.

4.3.3.1 Färbung ohne PE-Konjugate

Der detektierte Anteil der EpCAM^{dim} Zellen war höher als erwartet. Deshalb sollte geprüft werden, ob es sich dabei um eine echte Färbung oder ein Artefakt durch die Wahl der Fluorochrome des Multicolor-Panels handelte. Der Antikörper gegen EpCAM ist an das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Zusätzlich wurden bei der Färbung zwei Antikörper mit PE-Konjugaten verwendet, PE-Cy7 (CD56) und PE-Dazzle (CD319). Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese konjugierten Fluorochrome durch die Lagerung der gefärbten Proben bis zur Analyse in der DZM in ihre Bestandteile PE und Cy7 bzw. PE und Dazzle zerfielen. Dadurch könnte ein Signal im PE-Kanal hervorgerufen werden, das nicht durch EpCAM-PE hervorgerufen wird. Damit wäre der tatsächliche Anteil der EpCAM⁺ Zellen geringer als durch die DZM angegeben.

Um diesen Effekt experimentell zu ermitteln, wurde die gleiche Probe mit zwei unterschiedlichen Ansätzen gefärbt. In der einen Färbung wurden sämtliche Antikörper mit ihren konjugierten Fluorochromen des Multicolor-Panels (Tabelle 4-4) verwendet. In der zweiten Färbung hingegen wurde auf die Antikörper mit PE-Cy7 und PE-Dazzle verzichtet. Das ganze Experiment wurde für eine Probe sowohl vor als auch nach Depletion durchgeführt. Einen Tag nach der Färbung wurden die Proben in der DZM analysiert. Dabei wurde das Signal im PE-Kanal der zwei unterschiedlichen Färbungen verglichen. Abbildung 14 zeigt, dass sich der Anteil der EpCAM^{dim} Zellen durch das Weglassen der PE-Konjugate nur gering veränderte, dabei leicht stieg bzw. sogar kleiner wurde. So verringerte sich der Anteil der EpCAM^{dim} Zellen in Gate I vor Depletion von 1,98 % auf 1,23 %. Nach Depletion stieg der Wert dieser Population in Gate W von 4,85 % auf 6,12 %. Im Folgenden wurde deshalb davon ausgegangen, dass die PE-gefärbten Zellen auch tatsächlich positiv für EpCAM waren.

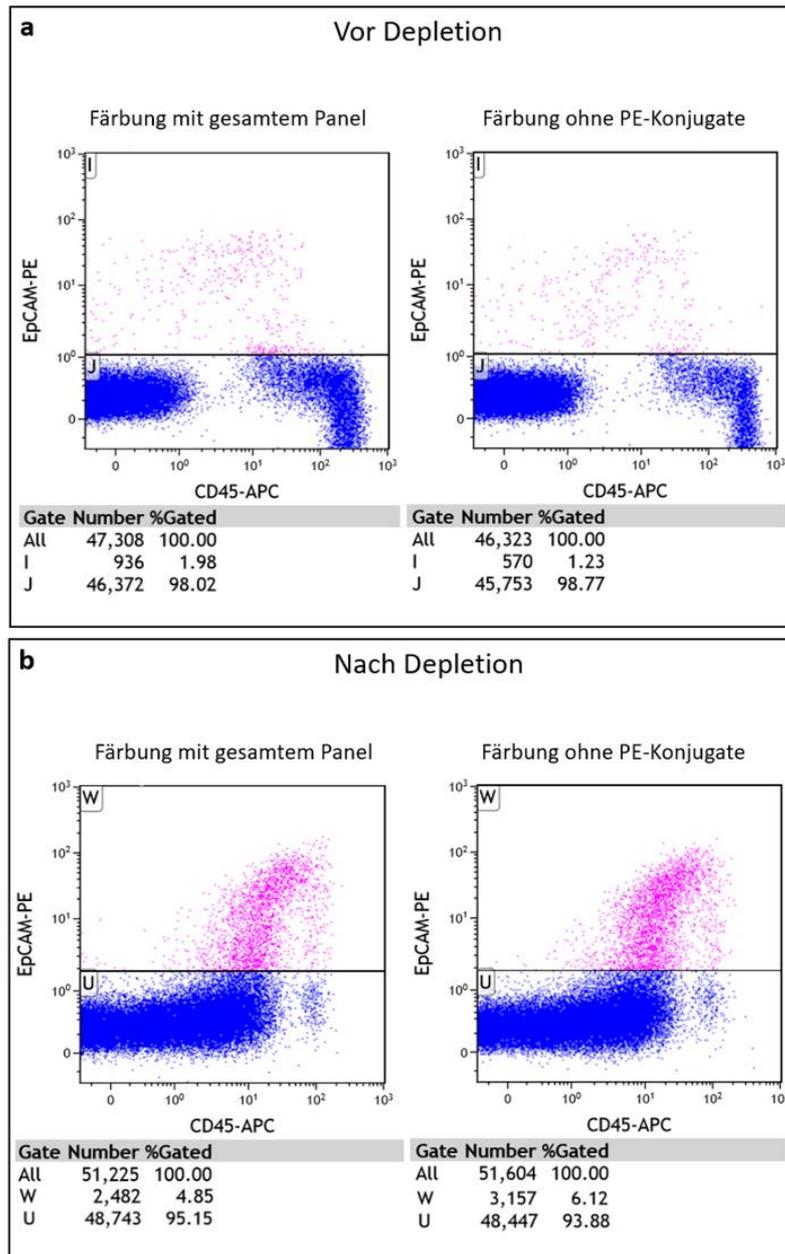


Abbildung 14 Färbung mit und ohne PE-Konjugate. Dargestellt sind je zwei Dotplots von CD45 gegen EpCAM der KMP desselben Patienten vor (a) und nach (b) der Depletion. Die jeweils linke Darstellung zeigt den Dotplot für die Färbung mit dem gesamten Panel. Die rechte Abbildung zeigt die Dotplots für die Färbung ohne die PE-Konjugate PE-Cy7 und PE-Dazzle.

4.3.3.2 *Leukozyten- und Lymphozytenmarker in der EpCAM⁺ Population*

Durch die RNA-Sequenzierung (Absatz 4.2) ergaben sich Hinweise, dass es sich bei den EpCAM⁺ Zellen um Immunzellen handeln könnte. Deshalb wurden die EpCAM⁺ Zellen eines Kontrollpatienten auf die Anwesenheit von Leukozyten- bzw. Lymphozytenmarkern geprüft (vor Depletion siehe Abbildung 15, nach Depletion siehe Abbildung 35 im Anhang). Als Marker für Leukozyten wurde CD45 verwendet, für Lymphozyten die Marker gemäß Tabelle 4-4. Anhand der Ergebnisse in der Durchflusszytometrie wurde der Anteil der EpCAM^{dim} Zellen berechnet, der - zusätzlich zu EpCAM - positiv für den jeweiligen Marker war (Tabelle 4-6). Demnach gab es für CD45 eine relevante Koexpression mit EpCAM, ca. ein Drittel der EpCAM^{dim} Zellen war ebenfalls CD45⁺. Für die verwendeten Lymphozytenmarker war jedoch nur ein geringer Anteil doppelt positiv für den jeweiligen Marker und EpCAM. Dies galt auch für die beiden ermittelten Marker CD27 und CD319, mit 95 % waren die meisten EpCAM^{dim} Zellen negativ für diese Marker. Durch die Depletion änderten sich diese Verhältnisse nur geringfügig, wie exemplarisch für einen Kontrollpatienten in Tabelle 4-6 zu sehen ist. Dabei ist die in Absatz 4.3.2 beschriebene Depletion der CD3⁺ Zellen zu erkennen. Außerdem sank wie zu erwarten der Anteil der CD45⁺ Zellen. Bei Betrachtung aller Proben sank der Anteil der EpCAM^{dim}/CD45⁺ Zellen an den EpCAM^{dim} Zellen durch die Depletion von 44 % auf 39 % (Wilcoxon-Test, $p = 0,0086$). Insgesamt handelte es sich also bei ca. einem Drittel der EpCAM^{dim} Zellen um Leukozyten, unter denen sich wenige Lymphozyten fanden.

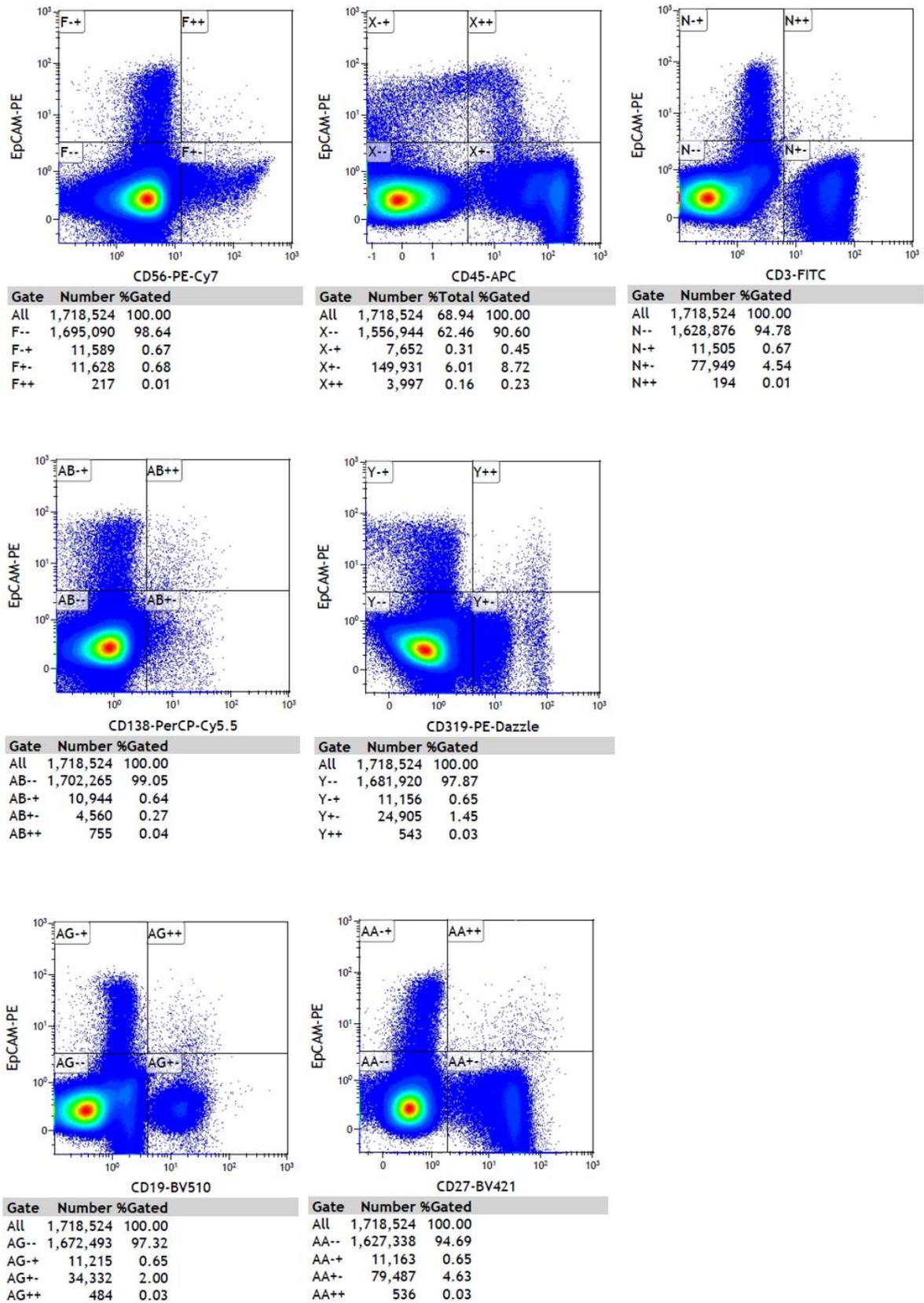


Abbildung 15 EpCAM^{dim} Population und Koexpression mit Immunmarkern. Dargestellt sind die Dotplots zur selben Probe eines Kontrollpatienten vor Depletion, in welchen jeweils EpCAM gegen CD45 oder einen Lymphozytenmarker aufgetragen ist. Die EpCAM^{dim} Population findet sich in den Gates -+ und ++, das Gate der doppelt positiven Zellen ist dabei in ++.

Tabelle 4-6 Anteil der doppelt positiven Zellen an der EpCAM^{dim} Population. Die Berechnung vor Depletion erfolgte durch die Werte in Abbildung 15 und Abbildung 35. Die Anzahl der doppelt positiven Zellen (Gate ++) wurde durch die Population der EpCAM^{dim} Zellen (Gate -+ addiert mit ++) dividiert. Die Werte nach Depletion wurden äquivalent berechnet (Abbildung 35 im Anhang).

Anteil doppelt positiver Zellen an EpCAM^{dim} Population	CD45	CD319	CD27	CD3	CD56	CD138	CD19
Vor Depletion	34 %	5 %	5 %	2 %	2 %	6 %	4 %
Nach Depletion	31 %	5 %	5 %	0 %	3 %	5 %	5 %

4.3.4 EpCAM^{high} Population im Knochenmark

Die Marker CD27 und CD319 fanden sich nur bei einer geringen Prozentzahl der EpCAM^{dim} Zellen (Tabelle 4-6), während bei der RNA-Sequenzierung der Großteil der NCCs diese Marker trug (Absatz 4.2.2). Bei der Isolation der sequenzierten NCCs war das Auswahlkriterium jedoch eine hohe EpCAM-Intensität, die über die leichte Färbung des Hintergrundes hinausging. Diese Hintergrundfärbung entspricht dabei am ehesten den EpCAM^{dim} Zellen. Deshalb wurden im Folgenden die Zellen betrachtet, die eine sehr hohe Expression von EpCAM aufwiesen (EpCAM^{high}). Diese stimmen damit am ehesten mit den Zellen überein, die beim manuellen EpCAM-Screening am Mikroskop im Knochenmark von KrebspatientInnen als potenzielle DCCs oder bei KontrollpatientInnen als NCCs isoliert werden würden.

4.3.4.1 Spike-in Versuch zum Setzen des EpCAM^{high} Gates

Es galt für die Analyse der KMP in der Durchflusszytometrie ein Gate für EpCAM^{high} Zellen zu setzen. Die in das Gate eingeschlossenen Zellen sollten entsprechend ihrer EpCAM-Intensität den DCCs und NCCs unter dem Fluoreszenzmikroskop entsprechen. Dafür wurde ein Spike-in-Versuch durchgeführt. Verwendet wurden Zellen von Prostata-Krebszelllinien, die eine bekannte mittlere bis hohe EpCAM-Intensität in der Fluoreszenzmikroskopie aufweisen. Diese Zellen wurden mit dem Knochenmark eines Kontrollpatienten vermengt (siehe auch Absatz 3.10.3). Sowohl die gemischte Probe als auch jeweils die Zelllinien und das Knochenmark separat wurden anschließend mittels DZM analysiert. Die verwendeten Krebszelllinien, PC3 und DU-145, haben demnach in der DZM im Vergleich zum Knochenmark eine EpCAM-Intensität, die den stärker gefärbten EpCAM⁺ Zellen des Knochenmarks entspricht und noch darüber hinausgeht (Abbildung 16).

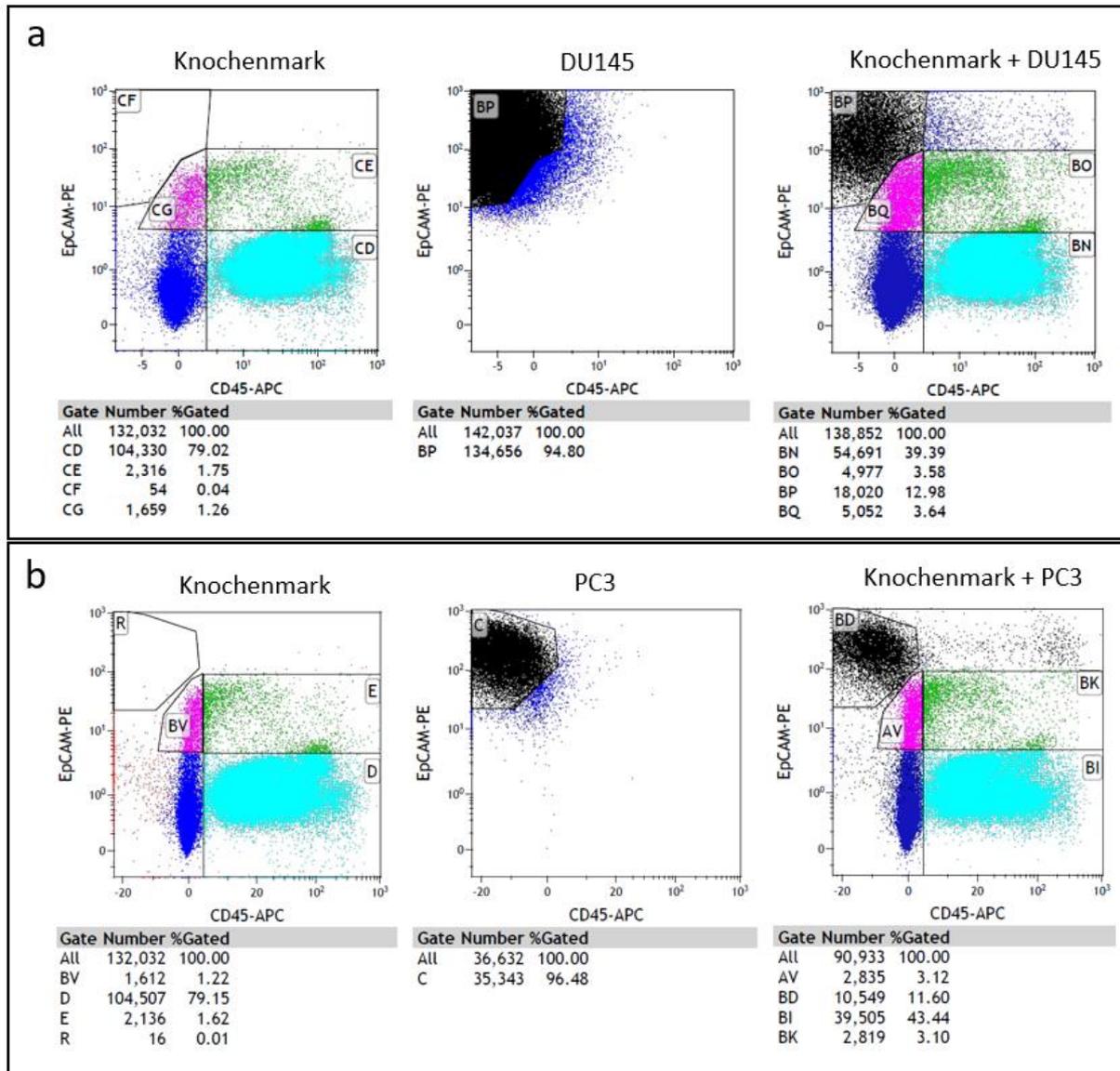


Abbildung 16 Spike-in-Versuch zum Setzen des EpCAM^{high} Gates. Untersucht wurde die EpCAM-Intensität der Zelllinien DU-145 (a) und PC3 (b) im Vergleich zum Knochenmark eines Kontrollpatienten. Abgebildet sind von links nach rechts jeweils die Dotplots von CD45 gegen EpCAM der Proben des Knochenmarks, der jeweiligen Zelllinie und des Spike-in-Ansatzes.

Entsprechend der EpCAM-Intensität dieser Prostata-Zelllinien wurde anschließend ein EpCAM^{high} Gate gesetzt, das als Grundlage für die Analyse aller KMP genutzt wurde. Dieses Gate liegt über der Hintergrundfärbung des Knochenmarks. Zusätzlich hat das Gate einen kleinen Sicherheitsabstand zur EpCAM^{dim} Population, um zu gewährleisten, dass sich die Zellen in diesem Gate vom Rest der Zellen durch ihre stärkere EpCAM-Färbung abheben (Abbildung 17). In dieses Gate fallen ca. ein Drittel bis die Hälfte der verwendeten Prostata-Krebszelllinien. Durch das Spike-in-Experiment wurde gezeigt, dass die Zellen in diesem Gate unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind und sich von der Hintergrundfärbung des Knochenmarks abheben.

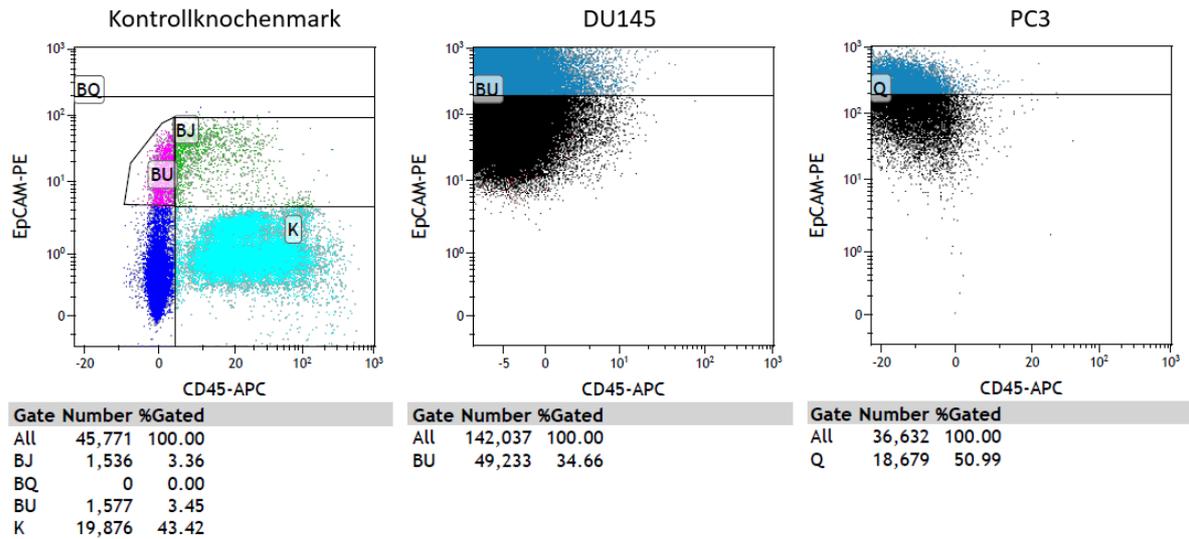


Abbildung 17 EpCAM^{high} Gate bei einer Knochenmarkprobe und bei Prostata-Krebszelllinien. Gezeigt werden die Dotplots von CD45 gegen EpCAM bei der Durchflusszytometrie der KMP eines Kontrollpatienten vor Depletion sowie der Zelllinien DU145 und PC3. Das EpCAM^{high} Gate BQ hat bei der KMP einen Sicherheitsabstand zur EpCAM^{dim} Population. Bei dieser Probe befand sich keine Zelle in diesem Gate. Bei den Krebszelllinien fallen ein Drittel bis die Hälfte der Zellen in dieses Gate (BU bzw. Q).

4.3.4.2 Häufigkeitsvergleich von EpCAM^{high} Zellen in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe des EpCAM^{high} Gates wurden die Proben von Kontroll- und KrebspatientInnen mittels Durchflusszytometrie auf Vorkommen von Zellen in diesem Gate untersucht. Darin befanden sich die mutmaßlichen DCCs sowie NCCs. Zellen im EpCAM^{high} Gate fanden sich nach Depletion bei 11 von 16 (69 %) Proben der KrebspatientInnen und 9 von 10 (90 %) Proben der KontrollpatientInnen. Die Anzahl der Zellen lag dabei zwischen 0 bis 22 Zellen bei den Krebs- und 0 bis 21 bei KontrollpatientInnen. Der prozentuale Anteil der EpCAM^{high} Population an allen MNZ unterschied sich zwischen den beiden Patientengruppen nicht signifikant (Mann-Whitney Test, $p = 0,34$, siehe Abbildung 18).

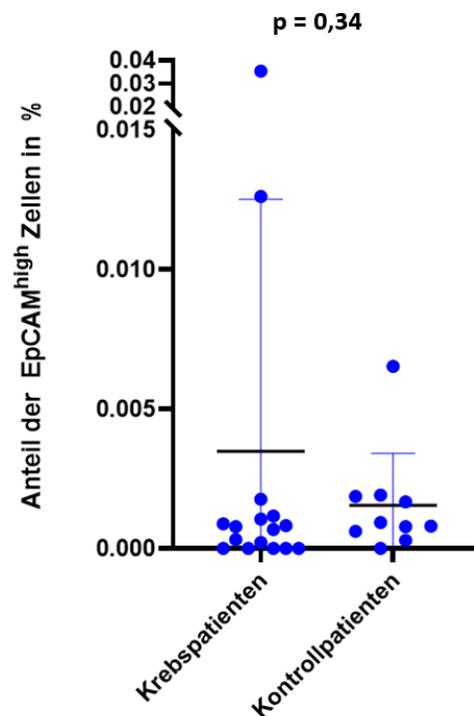


Abbildung 18 Anteil der EpCAM^{high} Zellen in Prozent bei Krebs- und KontrollpatientInnen nach Depletion. Angegeben ist der prozentuale Anteil der EpCAM^{high} Zellen an den lebenden MNZ der jeweiligen Probe in der Durchflusszytometrie. Eingezeichnet sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Nach dem Mann-Whitney Test ergab sich hier kein signifikanter ($p = 0,34$) Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen.

Die Ergebnisse des Screenings am Fluoreszenzmikroskop und der Durchflusszytometrie sollten verglichen werden, da beide Verfahren dazu dienen, EpCAM⁺ DCCs zu detektieren. Dabei wurde für beide Methoden derselbe EpCAM-Antikörper verwendet. Der Anteil der EpCAM^{high} Zellen an den jeweils betrachteten MNZ wurde zwischen Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie verglichen. Um die Analyse vergleichbarer zu machen, wurden nur die

Proben der Durchflusszytometrie eingeschlossen, die nach Depletion gefärbt worden sind, da dies dem Zeitpunkt des Screenens mit dem Fluoreszenzmikroskop entsprach.

Von den 26 Proben nach Depletion (Tabelle 4-5) wurde in 18 Fällen ein Screening mit Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Da zwei dieser Proben unter einem anderen Fluoreszenzmikroskop betrachtet worden sind und damit nicht vergleichbar zu den restlichen Ergebnissen waren, wurden von diesen 18 Proben nur 16 in die Analyse eingeschlossen. Darunter waren die Proben von 15 KrebspatientInnen und einem Kontrollpatienten. Während in der Fluoreszenzmikroskopie 63% dieser Proben mindestens eine EpCAM^{high} Zelle aufwies, betrug dieser Anteil für die gleichen Proben in der Durchflusszytometrie 75%.

In Abbildung 19 wurden die Anzahl der EpCAM^{high} Zellen an den MNZ gegeneinander aufgetragen. Die Anzahl der EpCAM^{high} Zellen pro Probe wurde für beide Verfahren auf eine Zellzahl von einer Million MNZ normalisiert. Demnach lag eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen des EpCAM-Screenings durch die Fluoreszenzmikroskopie und dem Vorkommen von EpCAM^{high} Zellen in der Durchflusszytometrie vor.

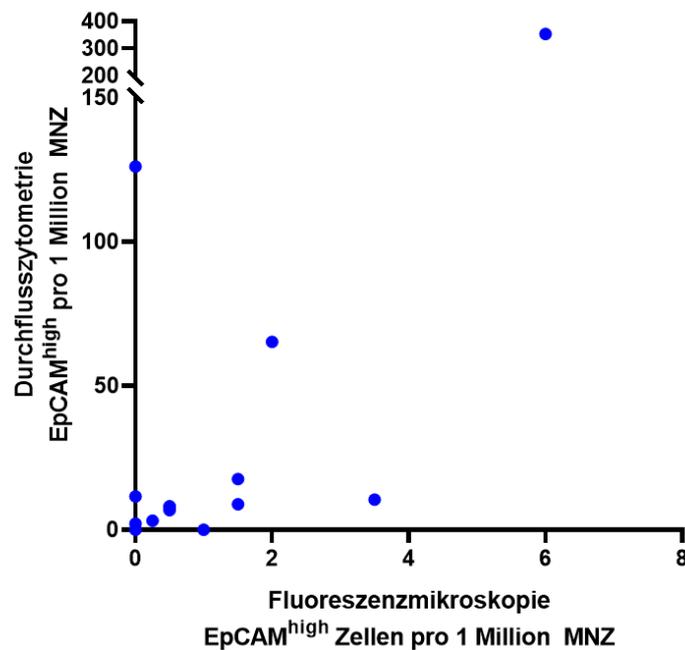


Abbildung 19 Korrelation der Anzahl der EpCAM^{high} Zellen in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie. Auf der x-Achse ist die Anzahl der beim Screenen durch das Fluoreszenzmikroskop entdeckten EpCAM^{high} Zellen aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen im EpCAM^{high} Gate bei der Durchflusszytometrie zu sehen. Beide Werte wurden auf das Vorkommen von EpCAM^{high} Zellen pro einer Million MNZ normalisiert. Der Korrelationstest nach Spearman ergab eine signifikante Korrelation ($r=0,53$, $p=0,0386$).

Betrachtet man die EpCAM^{high} Rate bei allen verfügbaren Proben, betrug der Mittelwert aller 18 im Fluoreszenzmikroskop gescreener Proben 1,02 EpCAM^{high} Zellen pro einer Million MNZ. Bei der Durchflusszytometrie betrug dieser bei 26 Proben nach Depletion 26 Zellen pro einer Million MNZ (Mann-Whitney Test, $p = 0,0005$). Da es bei dieser geringen Stichprobengröße einzelne Proben mit sehr hohen Werten in der Durchflusszytometrie gab, wurde zusätzlich der Median betrachtet. Dieser beträgt 0,5 EpCAM^{high} Zellen pro Million MNZ für die Fluoreszenzmikroskopie und 7,9 für die Durchflusszytometrie (Abbildung 20).

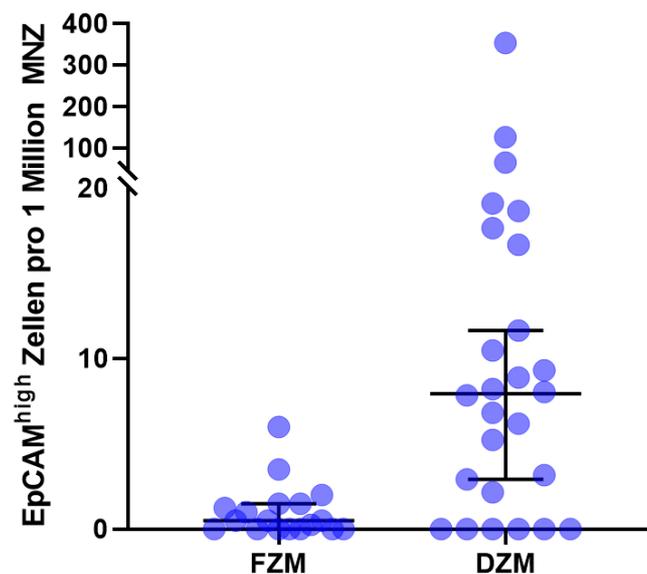


Abbildung 20 Anzahl der EpCAM^{high} Zellen pro 1 Million MNZ in der Fluoreszenzmikroskopie (FZM) und Durchflusszytometrie (DZM). Bei der FZM wurden 18 Proben berücksichtigt (16 Krebs- und 2 KontrollpatientInnen), bei der DZM 26 Proben (19 Krebs- und 7 KontrollpatientInnen). Abgebildet ist der Median mit 95 % Konfidenzintervall. Nach dem Mann-Whitney Test ist der Unterschied statistisch signifikant ($p = 0,0005$).

4.3.4.3 Population der mutmaßlichen DCCs

Da die gesuchten echten DCCs negativ für CD45 sein sollten, wurde der CD45-negative Anteil der EpCAM^{high} Zellen zwischen den Krebs- und KontrollpatientInnen verglichen. Hier würde man in der Gruppe der KrebspatientInnen durch das potenzielle Vorkommen von DCCs einen höheren Anteil in Bezug auf alle EpCAM^{high} Zellen erwarten. Bei KrebspatientInnen waren 55 % der EpCAM^{high} Zellen negativ für CD45, bei den KontrollpatientInnen 57 %, wobei sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte (Mann-Whitney Test, $p = 0,72$, Abbildung 21). Insgesamt hatten 9 von 16 (56 %) der KrebspatientInnen EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen und 7 von 10 (70 %) der KontrollpatientInnen. Bei den KrebspatientInnen waren 6 von 11 (55 %) der

Proben von BlasenkrebspatientInnen positiv für potenzielle DCCs, 3 der 4 (75 %) Proben von Brustkrebspatientinnen und 0 von 1 (0 %) Prostatakrebs-Probe.

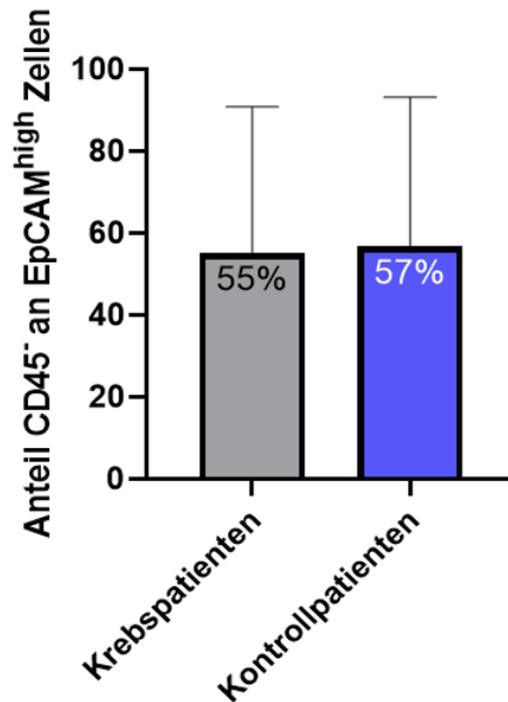


Abbildung 21 Anteil der CD45-negativen Zellen an allen EpCAM^{high} Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der EpCAM^{high} Zellen von Krebs- und KontrollpatientInnen, die CD45-negativ waren. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Nach dem Mann-Whitney Test ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen ($p = 0,72$).

Von Interesse war auch, ob sich der Anteil der $\text{EpCAM}^{\text{high}}/\text{CD45}^-$ Zellen, der mutmaßlichen DCC-Fraktion, durch die Depletion erhöhte. Abbildung 22 zeigt, dass sich der Anteil der $\text{EpCAM}^{\text{high}}/\text{CD45}^-$ Zellen (b) an den MNZ bei KrebspatientInnen durch die Depletion signifikant erhöhte (Wilcoxon-Pratt-Test, $p = 0,039$). Dabei stieg die Frequenz der DCCs im Durchschnitt von 1,7 Zellen pro 100.000 MNZ auf 3 pro 100.000. Das Vorkommen der $\text{EpCAM}^{\text{high}}$ Zellen unabhängig von ihrem CD45-Status (a) sowie der $\text{EpCAM}^{\text{high}}/\text{CD45}^+$ (c) Zellen wurde dabei nicht signifikant verändert (Wilcoxon-Pratt-Test, $p = 0,12$ bzw. $p = 0,90$).

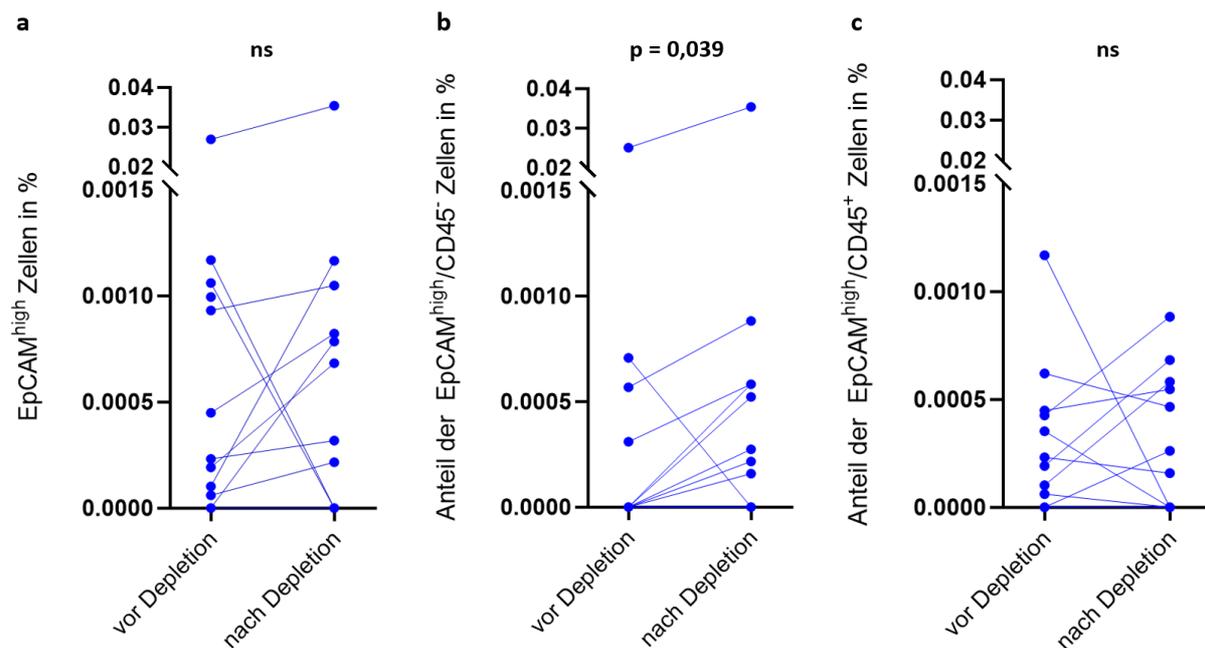


Abbildung 22 Veränderung des Anteils der $\text{EpCAM}^{\text{high}}$ durch die Depletion bei KrebspatientInnen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der $\text{EpCAM}^{\text{high}}$ Zellen an allen lebenden MNZ vor und nach Depletion bei KrebspatientInnen abhängig von ihrem CD45-Status. Zwei verbundene Punkte bilden die Werte derselben Probe vor und nach Depletion ab. In (a) sind alle $\text{EpCAM}^{\text{high}}$ Zellen aufgetragen, in (b) die CD45^- und in (c) die CD45^+ $\text{EpCAM}^{\text{high}}$ Zellen. Nach dem Wilcoxon-Pratt-Test ergaben sich für (a) und (c) keine signifikanten Unterschiede, in (b) liegt der p-Wert bei 0,039.

Bei den Proben von KontrollpatientInnen erhöhte sich der Anteil der EpCAM^{high} Zellen (a) signifikant (Abbildung 23, Wilcoxon-Pratt-Test, $p = 0,016$). Demgegenüber gab es für keine der beiden CD45⁻ (b) oder CD45⁺ (c) Populationen (Wilcoxon-Pratt-Test, $p = 0,63$) eine Anreicherung von EpCAM^{high} Zellen. Insgesamt reicherte die Depletion also spezifisch die Zielpopulation der EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen in KrebspatientInnen an. Auch bei Proben von den KontrollpatientInnen erhöhte sich der Anteil der EpCAM^{high} Zellen.

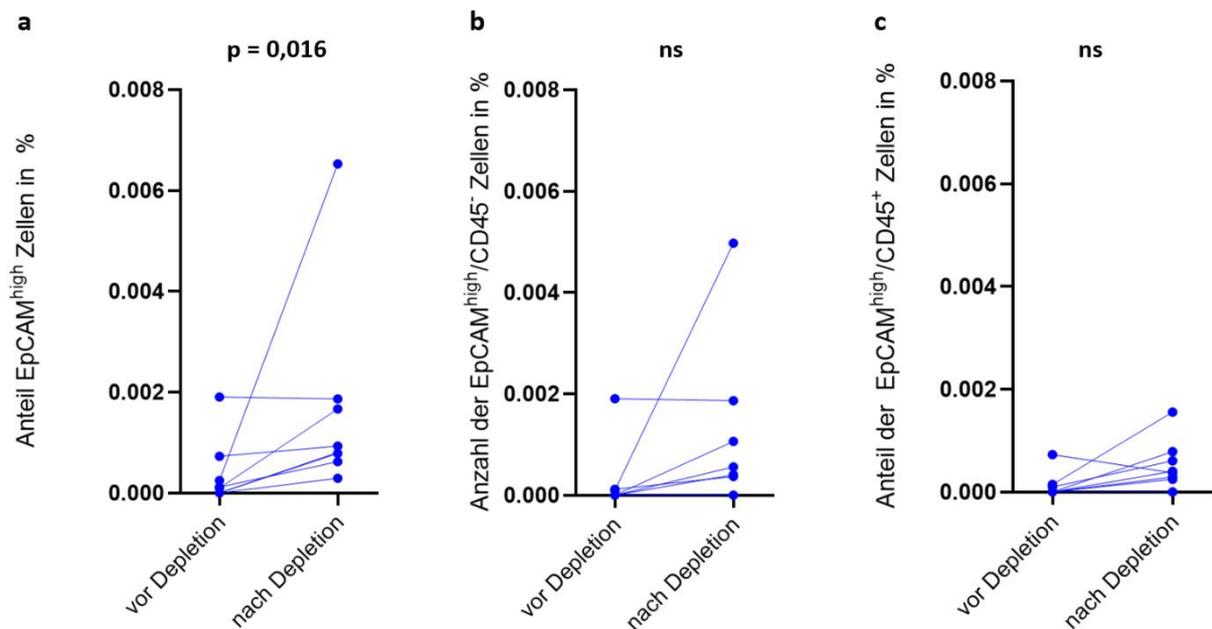


Abbildung 23 Veränderung des Anteils der EpCAM^{high} Zellen durch die Depletion bei KontrollpatientInnen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der EpCAM^{high} Zellen an allen lebenden MNZ vor und nach Depletion bei KontrollpatientInnen abhängig von ihrem CD45-Status. Zwei verbundene Punkte bilden die Werte derselben Probe vor und nach Depletion ab. In (a) sind alle EpCAM^{high} Zellen aufgetragen, in (b) die CD45⁻ und in (c) die CD45⁺ EpCAM^{high} Zellen. Nach dem Wilcoxon-Pratt-Test ergaben sich für (b) und (c) keine signifikanten Unterschiede, in (a) liegt der p-Wert bei 0,016.

4.3.4.4 CD27 und CD319 bei EpCAM^{high} Zellen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung wurde analysiert, ob CD27 und CD319 auf den EpCAM^{high} Zellen exprimiert sind. Entsprechend der Sequenzierung sind CD27 und CD319 häufiger auf NCCs zu erwarten und seltener auf DCCs. Die folgenden Analysen beruhen auf den Ergebnissen der DZM zu den Zellen im EpCAM^{high} Gate. Einbezogen wurden die Proben nach Depletion. Im EpCAM^{high} Gate befanden sich bei den 16 Proben der KrebspatientInnen insgesamt 57 Zellen und bei den 10 Proben der KontrollpatientInnen 54 Zellen, die für die folgenden Analysen herangezogen wurden.

Die Expression von CD27 und CD319 wurde in drei verschiedenen EpCAM^{high} Populationen überprüft: Sowohl in der gesamten Population der EpCAM^{high} Zellen (CD45-negativ und

positiv) als auch in den Populationen der EpCAM^{high} Zellen getrennt nach ihrem CD45-Status. Dies ergab sich aus folgender Überlegung: Die EpCAM^{high} Population ist die Population, die tatsächlich am Mikroskop isoliert wird und daher betrachtet werden soll. Im Idealfall sollten nach Depletion hier keine CD45⁺ Zellen mehr vorliegen, was aber, wie in Absatz 4.3.2 dargestellt, nicht der Fall ist. Demnach ist in der EpCAM^{high} Population ein größerer Anteil an NCCs zu erwarten als in der EpCAM^{high}/CD45⁻ Population. In der EpCAM^{high}/CD45⁻ Population sollten sich unter anderem DCCs befinden. In der EpCAM^{high}/CD45⁺ Population hingegen sollten sich hauptsächlich NCCs finden, da DCCs negativ für CD45 sein sollten. Exemplarisch wird in Abbildung 24 gezeigt, wie bei der Auswertung vorgegangen wurde.

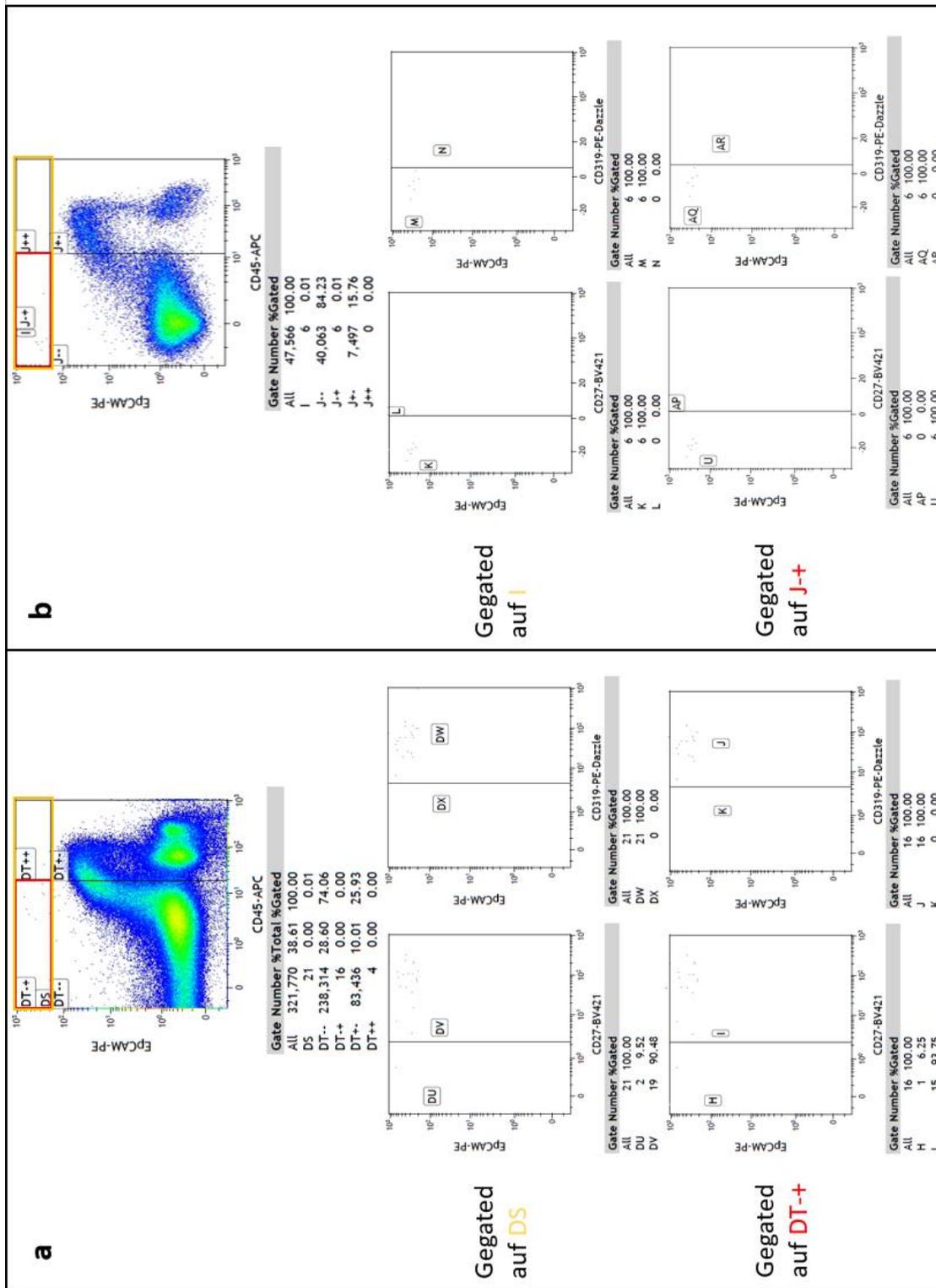


Abbildung 24 Verwendete Gates und Vorgehen bei der Analyse der EpCAM^{high} Zellen. Exemplarisch soll hier anhand der Dotplots einer KMP eines Kontroll- (a) und eines Krebspatienten (b) gezeigt werden, wie die Werte in Abbildung 25 gewonnen wurden. In der ersten Reihe ist der jeweilige Dotplot von CD45 gegen EpCAM zu sehen. Auf die hier farblich markierten Gates beziehen sich die zwei folgenden Reihen. Das gelbe Gate (DS bzw. I) setzt sich zusammen aus dem roten Gate DT-+ bzw. J-+ und dem Gate DT++ bzw. J++. Das gelbe Gate (DS bzw. I) schließt dabei alle EpCAM^{high} Zellen ein, das rote Gate (DT-+ bzw. J-+) nur die EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen. In den linken und rechten Spalten sind die Dotplots von EpCAM gegen CD27 bzw. CD319 abgebildet, bezogen auf das gelbe Gate (zweite Reihe) bzw. das rote Gate (dritte Reihe).

Die Zellen der KontrollpatientInnen zeigten dabei im EpCAM^{high} Gate durchschnittlich zu 74 % den Marker CD27 und zu 89 % den Marker CD319 (Abbildung 25a). Die Daten aus Abbildung 25 wurden verwendet, um die Markerexpression innerhalb der jeweiligen Patientengruppen zu vergleichen (Abbildung 26). Zwischen den drei EpCAM^{high} Populationen gab es abhängig vom CD45-Status bei den KontrollpatientInnen keine signifikanten Unterschiede für das Vorkommen der beiden Marker (Abbildung 26). Die NCCs exprimierten also unabhängig von ihrer CD45-Expression zu einem Großteil die Marker CD27 und CD319.

Betrachtet man die EpCAM^{high} Zellen der KrebspatientInnen, ergibt sich hier ein anderes Bild. Hier waren die Marker CD27 und CD319 im gesamten EpCAM^{high} Gate (Abbildung 25a) und im EpCAM^{high}/CD45⁻ Gate (Abbildung 25b) signifikant seltener vorhanden als bei den KontrollpatientInnen. Am geringsten waren die Werte bei den EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen, mit 24 % positiven Zellen für CD27 und 36 % für CD319. Dies kommt vermutlich daher, dass in diesem Gate die mutmaßlichen DCCs enthalten sind, die diese Marker entsprechend der RNA-Sequenzierung gar nicht oder nur selten exprimieren. Im EpCAM^{high}/CD45⁺ Gate (Abbildung 25c) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und KrebspatientInnen hinsichtlich der Marker-Positivität, was damit erklärt werden kann, dass sich hier bei beiden Patientengruppen die NCCs befinden.

Die unterschiedliche Expression von CD27 und CD319 zwischen den EpCAM^{high}/CD45-negativen und -positiven Gates bei KrebspatientInnen war statistisch signifikant (Abbildung 26). Da DCCs kein CD45 exprimieren und im CD45-positiven Gate nicht vorkommen sollten, stimmt dies mit den RNA-Sequenzierungs-Ergebnissen überein.

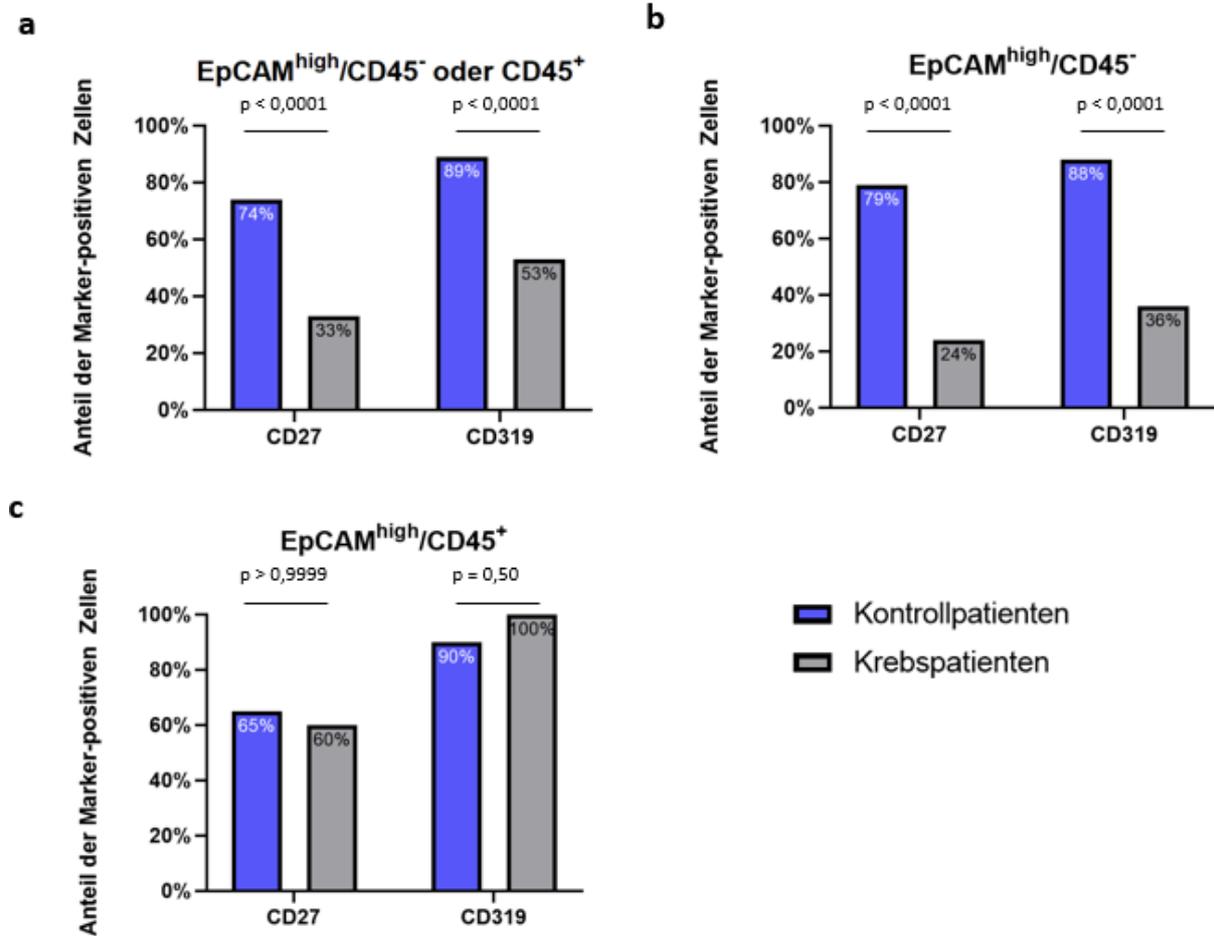


Abbildung 25 Anteil der CD27- und CD319-positiven Zellen an den EpCAM^{high} Zellen bei Kontroll- und KrebspatientInnen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der EpCAM^{high} Zellen, die positiv für CD27 oder CD319 waren. In (a) wurden die Zellen des gesamten EpCAM^{high} Gates betrachtet (siehe auch oranges Gate in Abbildung 24), in (b) nur die Zellen im EpCAM^{high}/CD45⁻ Gate (entspricht rotem Gate in Abbildung 24) und in (c) die EpCAM^{high}/CD45⁺ Zellen. In (b) befinden sich die mutmaßlichen DCCs. Nach dem Fisher's exact test, der mit den jeweiligen Zellzahlen berechnet wurde, waren die Unterschiede zwischen Krebs- und KontrollpatientInnen in (a) und (b) statistisch signifikant, in (c) hingegen nicht.

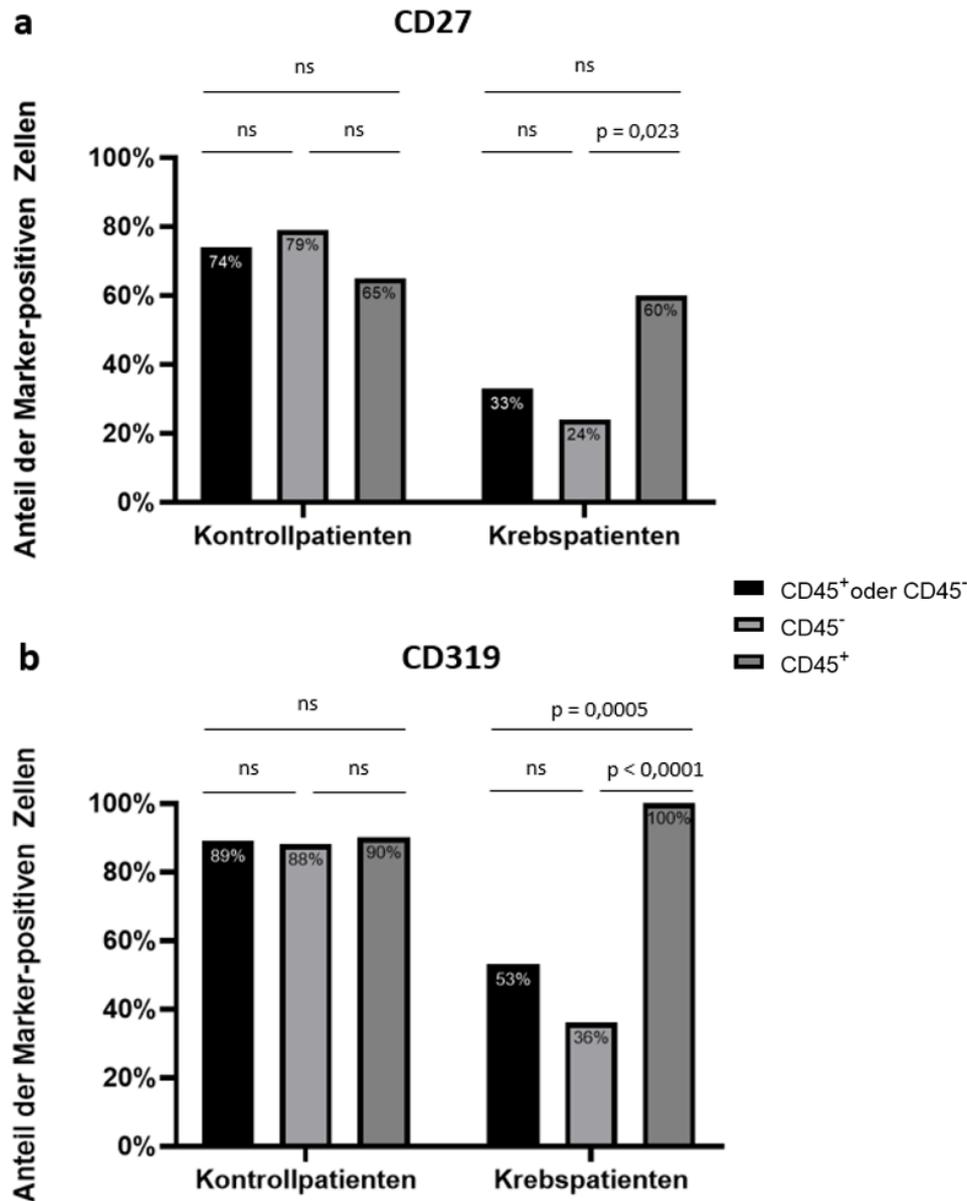


Abbildung 26 Signifikanzwerte innerhalb der Patientengruppen für unterschiedliche EpCAM^{high} Populationen. Dargestellt sind die Werte aus Abbildung 25, diesmal nach den Markern CD27 (a) und CD319 (a) und den Patientengruppen gruppiert. Hier war von Interesse, ob sich innerhalb der Gruppe der Kontroll- oder KrebspatientInnen der Anteil der Marker-positiven Zellen zwischen den EpCAM^{high} Populationen abhängig vom CD45-Status ändert. Signifikante Werte ergaben sich dabei für die Unterschiede zwischen den Zellen von EpCAM^{high}/CD45-negativen und CD45-positiven Zellen bei KrebspatientInnen für CD27 und CD319. Die Signifikanzwerte wurden mit dem Fisher's exact test berechnet.

4.4 Doppelfärbung EpCAM und CD27 mit CD319 für das Fluoreszenz-Mikroskop

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bestätigten die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung, dass CD319 und CD27 signifikant häufiger auf mutmaßlichen NCCs vorkommen. Daher sollten diese Oberflächenmarker genutzt werden, um den Screening-Vorgang spezifischer für DCCs zu machen. Hierfür wurde als Ansatz eine zusätzliche Färbung zu EpCAM beim Screening-Vorgang im Fluoreszenzmikroskop mit den Markern CD319 und CD27 gewählt.

4.4.1 Auswahl der Fluorochrome

Aufgrund der limitierten Filteranzahl des verfügbaren Fluoreszenzmikroskops stellte sich die Auswahl von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen kompliziert dar. Letztendlich wurden beide Marker CD319 und CD27 auf das Fluorochrom AF647 und damit auf den APC-Kanal des Mikroskops gelegt. Bei einer positiven Zelle konnte also nicht unterschieden werden, für welchen der beiden Marker die Zelle positiv war. Da die Färbung nach der Depletion stattfand, die mit APC-konjugierten Antikörpern durchgeführt worden ist, konnte eine positive Zelle zusätzlich auch für CD11b, CD33 oder CD45 positiv sein. Dabei sind aber all diese Marker Ausschlussmarker. Eine APC-positive Zelle war damit mutmaßlich keine DCC, sodass die Färbung dennoch auf diese Weise durchgeführt werden konnte. Insgesamt wurden die KMP von sechs PatientInnen sowie Zellen der Zelllinie MCF7 auf diese Art und Weise gefärbt.

4.4.2 Färbung der Knochenmarkproben

Bei den gefärbten KMP handelte es sich um die Proben von drei Blasen- und zwei BrustkrebspatientInnen sowie von einem Kontrollpatienten. Bei der ersten Färbung wurde zusätzlich eine ungefärbte Probe unter dem Mikroskop betrachtet sowie die angefertigte Isotyp-Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Proben sind in Abbildung 27 zu sehen. Dabei fiel das Vorhandensein einer Färbung der Zellen im APC-Kanal auf, die in der gefärbten, aber auch in der ungefärbten Probe und Isotyp-Kontrolle auftrat. Erklärbar ist dies durch die vorher durchgeführte Depletion der Zellen. Wie in Absatz 4.3.2 bereits erläutert, ist die Depletion nicht vollständig effektiv, sodass auch nach dem Durchfluss durch das Depletionsröhrchen APC-gefärbte Zellen in der Probe vorhanden sind. Da es sich aber wie erwähnt bei den APC-gekoppelten Markern um Ausschlussmarker handelt, wurden die Proben trotz positiver ungefärbter Probe und Isotyp-Kontrolle weiter analysiert.

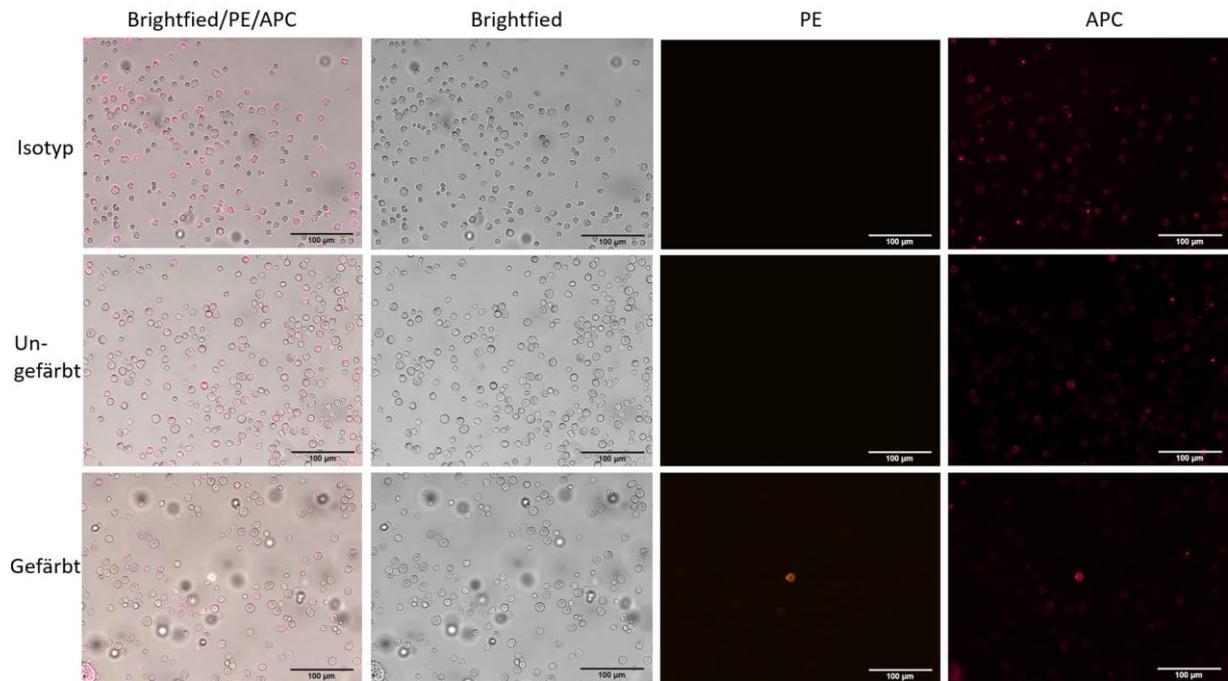


Abbildung 27 Fotos der Immunfluoreszenzfärbung einer Knochenmarkprobe. Abgebildet sind Fotos des Fluoreszenzmikroskops derselben KMP eines Blasenkrebspatienten nach Depletion. Die Fotos zeigen die drei Ansätze (Isotyp, ungefärbt, gefärbt) in zwanzigfacher Vergrößerung. Zu jedem Ansatz sind die Bilder in den einzelnen Kanälen (Brightfield, PE, APC) zu sehen sowie in einer Überlagerung der drei Kanäle (Brightfield/PE/APC). Während man im PE-Kanal nur eine Färbung bei der tatsächlich gefärbten Probe sehen kann, findet man im APC-Kanal auch in der Isotyp-Kontrolle und ungefärbten Probe gefärbte Zellen. Die Intensität der Färbung wurde zur besseren Darstellung in den Färbungen graphisch verstärkt (Scaling Intensitäten APC left 550 nm right 960 nm, PE left 560 nm right 5250 nm).

Von den sechs gefärbten KMP waren zwei Proben negativ für EpCAM^{high} Zellen. Bei den übrigen vier PatientInnen fanden sich insgesamt neun EpCAM^{high} Zellen, wovon eine in Abbildung 28 abgebildet ist. Im APC-Kanal zeigte diese Zellen auch eine APC-Färbung.

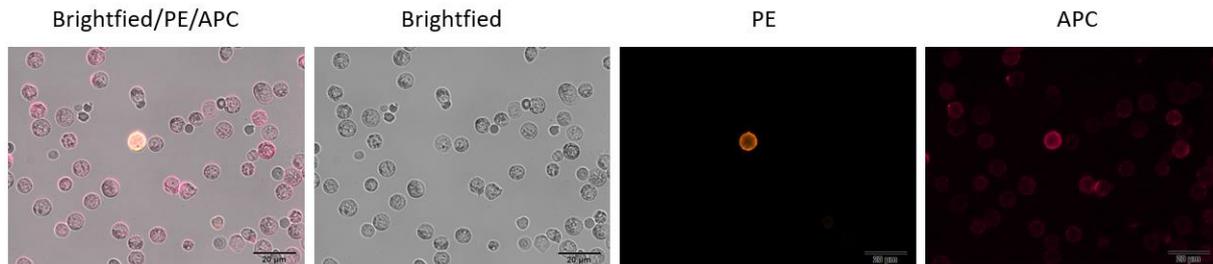


Abbildung 28 EpCAM-positive Zelle in den verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen. Abgebildet sind die Fotos aus der Fluoreszenzmikroskopie einer KMP einer Brustkrebspatientin. Die Kanäle sind identisch mit den aus Abbildung 27, die Vergrößerung liegt bei Faktor vierzig. Die Intensität der Färbung wurde zur besseren Darstellung in allen Färbungen graphisch bearbeitet (Scaling Intensitäten APC left 653 nm right 1360 nm, PE left 560 nm right 5250 nm).

Bei den gefärbten KMP waren alle neun Zellen sowohl für EpCAM als auch im APC-Kanal positiv. Damit hatten all diese Zellen mindestens einen der Negativmarker, was auf ihre Identität als NCCs hindeutete. Da sechs der Zellen von KrebspatientInnen stammten, hätten sich unter den EpCAM^{high} Zellen auch potenzielle DCCs befinden können. Diese müssten aber negativ im APC-Kanal sein. Entsprechend der Ergebnisse der Färbung fanden sich also keine DCCs unter den sechs EpCAM^{high} Zellen.

Da die Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome PE und AF647 leicht überlappen, konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine stark positive Färbung durch EpCAM im PE-Kanal zu einer Positivität im APC-Kanal führte. Damit würden alle EpCAM^{high} Zellen eine Färbung im APC-Kanal aufweisen, unabhängig von einer tatsächlichen Färbung durch die Negativmarker. Um dies zu prüfen wurde eine Kontrollfärbung auf Brustkrebszelllinien durchgeführt.

4.4.3 Kontrolle der Überlappung der Fluoreszenzkanäle

Mithilfe der Färbung einer Brustkrebszelllinie sollte untersucht werden, ob stark EpCAM-positive Zellen im PE-Kanal eine Färbung im APC-Kanal zeigen. Ausgewählt wurde hierfür die Brustkrebszelllinie MCF7, die stark EpCAM-positive Zellen enthält. In einem ersten Ansatz wurden die Zellen ausschließlich mit EpCAM-PE gefärbt. Hier sollte die in Absatz 4.4.2 beschriebene potenzielle Überlappung der Emissionsspektren der zwei verwendeten Fluoreszenzkanäle untersucht werden. In einem zweiten Ansatz wurden die MCF7 Zellen wie die KMP in Absatz 4.4.2 zusätzlich für die Marker CD27 und CD319 mit dem Fluorochrom AF647 gefärbt. Wie in Absatz 4.5 beschrieben, sind MCF7 Zellen negativ für CD27 und für

CD319 so schwach positiv, dass dies nicht im Fluoreszenzmikroskop detektierbar ist. Durch diesen Ansatz sollte ausgeschlossen werden, dass es eine unspezifische Bindung der Antikörper gegen CD27 und CD319 an EpCAM-positive Zellen gibt. Die ungefärbten Proben und Isotypen waren in diesem Experiment sowohl im PE- als auch im APC-Kanal negativ (Abbildung 29).

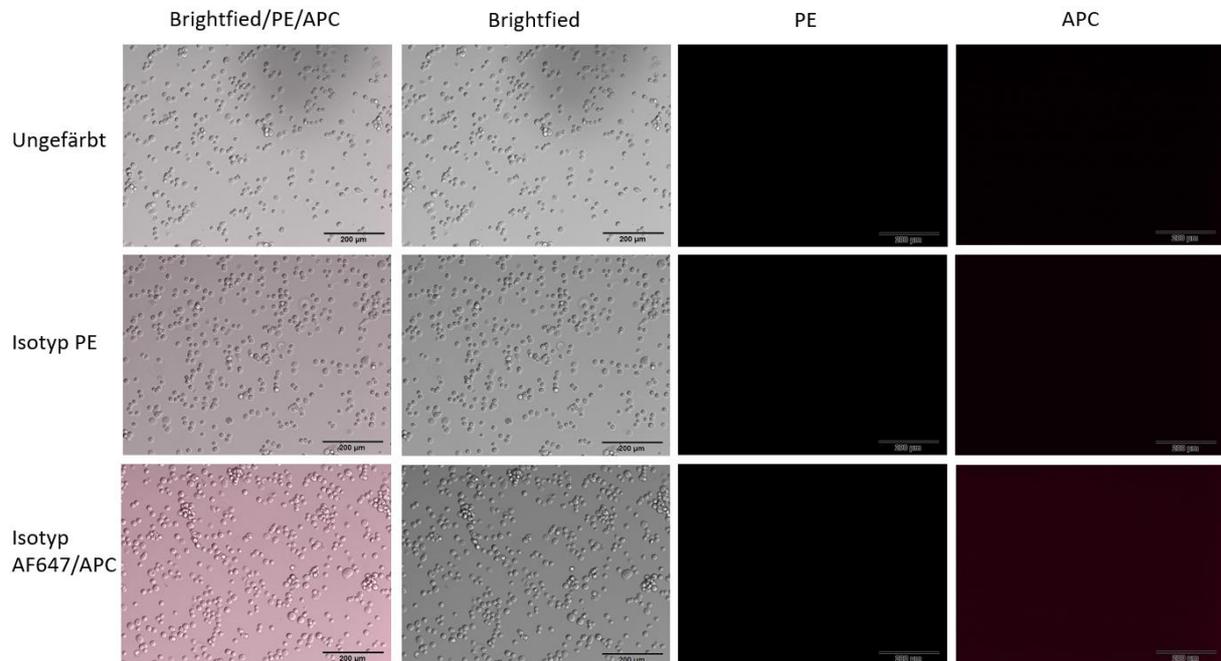


Abbildung 29 Ungefärbte Probe und Isotypkontrollen von MCF7. Dargestellt sind die Fotos aus der Fluoreszenzmikroskopie der MCF7 Zellen. Die erste Zeile zeigt die Aufnahmen der ungefärbten Probe. In der zweiten Reihe ist die Isotyp-Kontrolle für die Färbung des ersten Ansatzes mit EpCAM auf PE zu sehen sowie in der zweiten Reihe die Isotyp-Kontrolle für die Färbung des zweiten Ansatzes mit EpCAM sowie CD27 und CD319 auf AF647. Die Vergrößerung liegt bei dem Faktor zwanzig. Die Intensität der Färbung wurde verstärkt (Scaling Intensitäten APC left 653 nm right 2300 nm, PE left 560 nm right 7000 nm).

Anschließend wurden die EpCAM^{high} Zellen im APC-Kanal betrachtet. Wie in Abbildung 30 zu sehen, zeigten diese Zellen weder im ersten noch im zweiten Ansatz eine Färbung im APC-Kanal. Demnach ist die Überlappung der Emissionsspektren oder eine unspezifische Bindung der Antikörper nicht sichtbar und führt zu keinem wahrnehmbaren falschen Signal im APC-Kanal. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellen in Absatz 4.4.2 um Zellen handelte, die tatsächlich Negativmarker auf ihrer Oberfläche trugen.

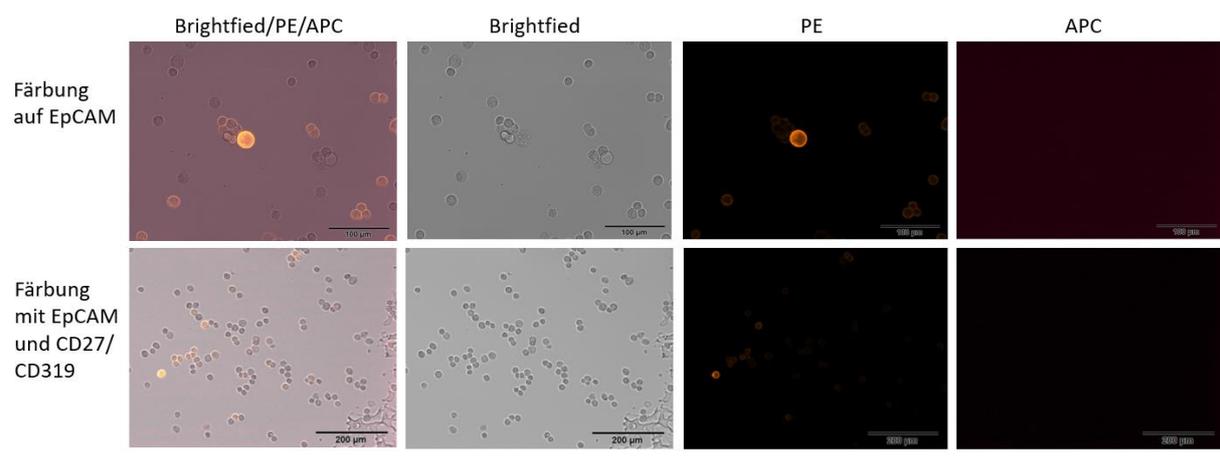


Abbildung 30 Stark EpCAM-positive Zellen in gefärbten MCF7-Proben. Zu sehen sind Fotos aus der Fluoreszenzmikroskopie von gefärbten MCF7-Zellen. Die Bilder der ersten Reihe in vierzigfacher Vergrößerung stammen aus dem ersten Ansatz, in dem nur EpCAM gefärbt wurde. In der zweiten Reihe sind in zwanzigfacher Vergrößerung die Bilder des zweiten Ansatzes zu sehen, in dem zusätzlich CD27 und CD319 gefärbt wurden. Die Verstärkung der Intensitäten erfolgte entsprechend Abbildung 29.

4.5 Färbung von Brustkrebs- und Vorläuferzelllinien auf CD27 und CD319

DCCs müssen in ihren Eigenschaften nicht mit dem Primärtumor übereinstimmen, wie in Absatz 1.4 erläutert. Dennoch sollte untersucht werden, ob Brustkrebszelllinien oder Zelllinien von Brustkrebs-Vorstufen die Marker CD319 und CD27 exprimieren. Da es sich bei den Markern um Negativmarker handelt, sollten sie nicht auf DCCs vorkommen. Kommen die Marker nicht auf Zelllinien von Brustkrebs oder deren Vorläufern vor, so ist dies zumindest ein Hinweis, dass sie weniger wahrscheinlich auf DCCs zu erwarten sind.

4.5.1 Färbung für die Durchflusszytometrie

Insgesamt sieben Zelllinien (Tabelle 4-7) wurden auf die Expression von EpCAM, CD319 und CD27 mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Tabelle 4-7 Gefärbte Zelllinien in der Durchflusszytometrie und ihre Eigenschaften.

Zelllinie	Eigenschaft
MCF 10A (erworben bei ATCC)	Brustepithelzellen, prä-maligne, nicht tumorigen
MCF 10A (parent)	Brustepithelzellen, prä-maligne, nicht tumorigen
MCF 10 (PI3K mutiert)	Brustepithelzellen, prä-maligne, nicht tumorigen
MCF7	Brustkrebs, von Metastase abstammend
MDA-MB-231	Brustkrebs, von Metastase abstammend
SKBR3	Brustkrebs, von Metastase abstammend
T-47D	Brustkrebs, von Metastase abstammend

Die Ergebnisse der Färbung für CD27 und CD319 sind in Abbildung 31 zu sehen. Bei CD27 gab es keine relevante Verschiebung des Peaks der gefärbten Probe zur Isotyp-Kontrolle und damit keine CD27 Expression der Zellen. Bei den Histogrammen von CD319 war für alle Zelllinien eine kleine Verschiebung des Peaks in der gefärbten Probe im Vergleich zum Isotyp zu finden. Für CD319 lag also eine leichte Positivität bei den Zelllinien vor.

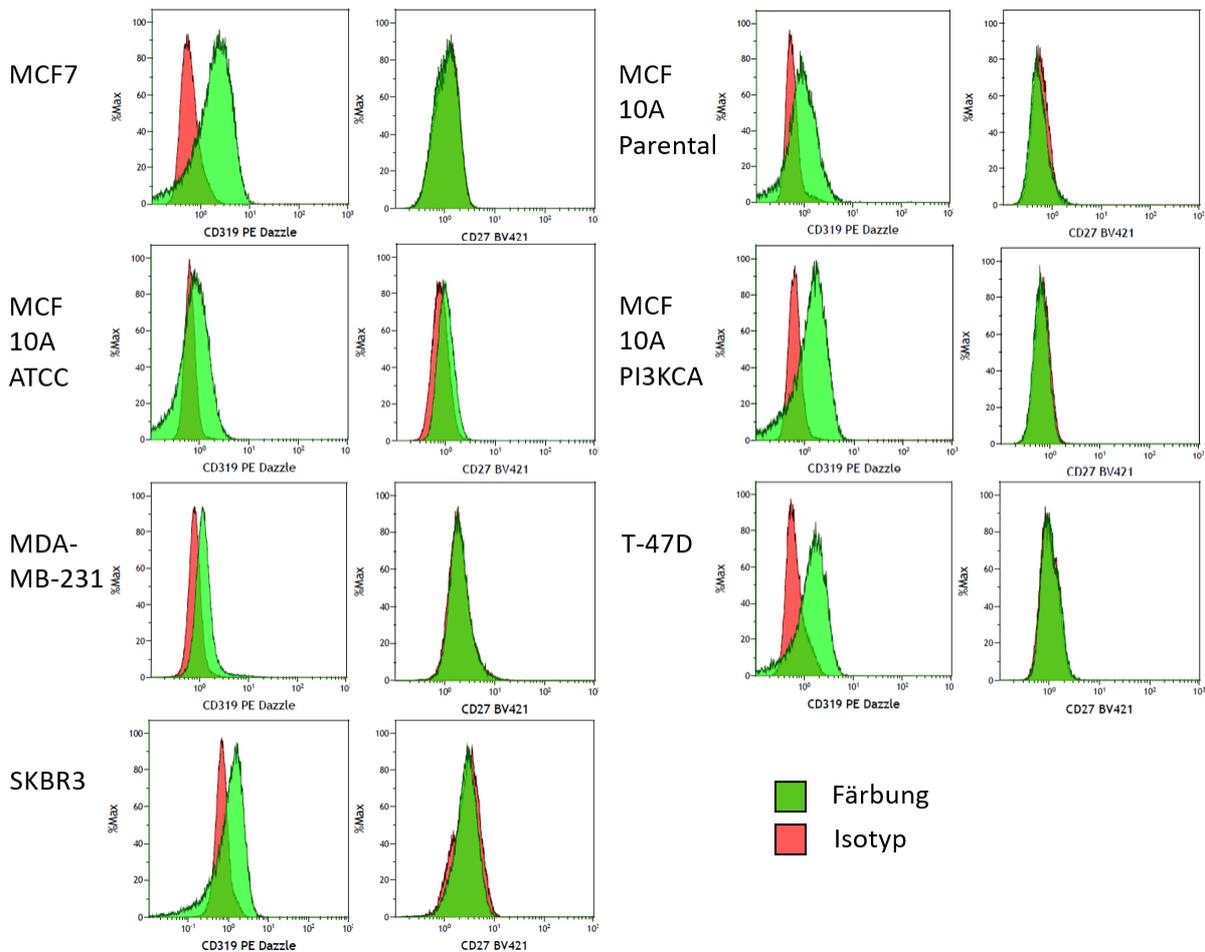


Abbildung 31 Expression von CD319 und CD27 in Brustkrebs- und Vorläuferzellen. Dargestellt sind die Histogramme der Durchflusszytometrie der Brustkrebs- und Vorläuferzelllinien. Zu jeder Zelllinie finden sich zwei Histogramme, die die Expression von CD319 (links) bzw. CD27 (rechts) darstellen. Aufgetragen ist jeweils der Isotyp (rot) und die gefärbte Probe (grün).

4.5.2 Färbung für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Das Durchflusszytometer hat eine höhere Sensitivität für Fluoreszenzsignale als das menschliche Auge bei der Fluoreszenzmikroskopie. Deshalb sollte geprüft werden, ob die in der Durchflusszytometrie sichtbare Färbung der Zelllinien für CD319 auch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist, da dieses das Mittel zum Screening der KMP darstellt. Ausgewählt wurde hierfür die Zelllinie MCF7, da hier entsprechend den Histogrammen die

stärkste Färbung für CD319 vorlag. Verwendet wurde derselbe Antikörper wie in der Durchflusszytometrie, sodass für CD319 das Fluorochrom PE-Dazzle zum Einsatz kam. Als Positivkontrolle wurden periphere mononukleäre Blutzellen gefärbt, die unter dem Fluoreszenzmikroskop CD319-gefärbte Zellen aufwiesen (Abbildung 32). Demnach funktionierte die Färbung und die MCF7-Zellen konnten hinsichtlich ihrer Färbung für CD319 ausgewertet werden. Wie in Abbildung 32 zu sehen, war im Fluoreszenzmikroskop bei den gefärbten MCF7-Zellen keine Färbung detektierbar. Folglich sind die Zelllinien sehr schwach für CD319 in der Durchflusszytometrie positiv, aber unter der für das Auge sichtbaren Schwelle.

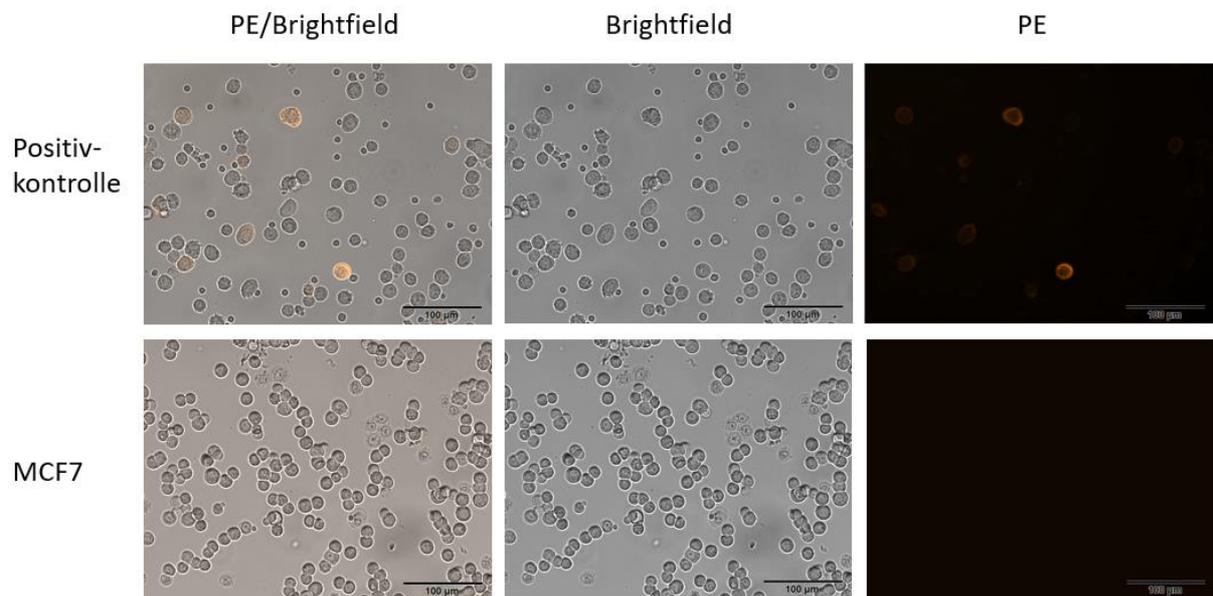


Abbildung 32 CD319-Färbung von MCF7- und Kontrollzellen. Zu sehen sind Fotos aus der Fluoreszenzmikroskopie in den Kanälen Brightfield, PE und in der Überlagerung der beiden (PE/Brightfield; Scaling Intensität PE-Kanal left 710 nm right 2900 nm).

5 Diskussion

Lediglich 6 % der Brustkrebspatientinnen haben bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Metastasen. Allerdings entwickeln sich bei 20-50 % der Frauen mit einem initial lokal beschränkten Brustkrebs im Verlauf der Erkrankung Metastasen (Lu et al. 2009). Liegen Metastasen vor, so beträgt das 5-Jahres-Überleben nur 26 %, während es bei lokalisierter Brustkrebserkrankung bei 98,8 % und regionaler Erkrankung bei 85,5 % liegt (Howlader et al. 2019). Demnach gilt es, das Entstehen von Metastasen zu verhindern. Metastasen entwickeln sich aus einzelnen disseminierten Tumorzellen (disseminated cancer cells, DCCs; Sosa et al. 2014). Diese haben sich bereits vor der Entfernung des Primärtumors im Körper verteilt und können somit auch bei einer anfangs lokal begrenzten Brustkrebserkrankung zur Ausbildung von Metastasen führen (Klein 2009). Um dies zu verhindern, müssen DCCs näher erforscht werden, um eine zielgerichtete Therapie gegen diese zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurden DCCs im Rahmen dieser Arbeit detektiert und charakterisiert. DCCs werden dabei für Forschungszwecke im Knochenmark mit dem Marker EpCAM detektiert. Dieser Marker kommt auch auf Nicht-Krebszellen (non cancer cells, NCC) im Knochenmark von KontrollpatientInnen vor. Das Vorkommen von NCCs führt zu einer Kontamination der mutmaßlichen DCC-Fraktion (Choemmel et al. 2004) und könnten Messergebnisse verfälschen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit NCCs im Vergleich zu DCCs näher untersucht.

5.1 Detektion von DCCs mittels Durchflusszytometrie

Um DCCs mittels EpCAM zu detektieren, wurde zuerst die Immunfluoreszenz mit anschließender Mikromanipulation verwendet (Klein et al. 1999; Klein et al. 2002; Magbanua et al. 2015). Neue Ansätze detektierten DCCs auch mittels Durchflusszytometrie (DZM), beispielsweise bei Erkrankten an Brustkrebs (Magbanua et al. 2018) und Prostatakrebs (Cackowski et al. 2019). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde zur Analyse der Oberflächenmarker von mutmaßlichen DCCs und NCCs ein DZM-basierter Ansatz gewählt. Dabei mussten Selektionskriterien für eine potenzielle DCC festgelegt werden. Da es sich hierbei um eine nicht standardisierte Methode handelt, werden diese Kriterien im Folgenden mit den Arbeiten von Magbuana et al. und Cackowski et al. verglichen.

Ein erstes festzulegendes Kriterium war die Intensität der EpCAM-Färbung einer Zelle in der DZM. Im Knochenmark von KontrollpatientInnen finden sich leicht EpCAM-positive Zellen, die EpCAM^{dim} Zellen (Absatz 4.3.4). Dagegen ist EpCAM in Karzinomen häufig sehr stark exprimiert (Göttlinger et al. 1986; Schlimok et al. 1987; Riethmüller et al. 1994; Schnell et al. 2013). Unter den stark EpCAM-positiven Zellen im Knochenmark, den EpCAM^{high} Zellen,

finden sich demnach DCCs. Bei den in der Fluoreszenzmikroskopie isolierten EpCAM^{high} Zellen fanden sich Zellen, die durch Aberrationen in ihrem genomischen Profil als Krebszellen klassifiziert werden konnten (Irlbeck 2019).

Für die EpCAM-Intensität musste daher in der DZM ein Intensitäts-Schwellenwert festgelegt werden, ab welchem eine Zelle als EpCAM^{high} bezeichnet wurde und dadurch als DCC in Frage kam. In der vorliegenden Arbeit wurde das EpCAM^{high} Gate anhand eines Spike-in-Versuches mit den EpCAM⁺ Zelllinien PC3 und DU145 gesetzt. Diese Zellen zeigen eine mittlere bis hohe EpCAM-Intensität (Gužvić et al. 2014). Ein Drittel bis die Hälfte der Zelllinien befanden sich im gesetzten EpCAM^{high} Gate (Absatz 4.3.4.1). Magbanua und Park wählten zum Setzen dieses Gates einen vergleichbaren Ansatz und verwendeten ebenfalls die Zelllinie PC3 und zusätzlich die Brustkrebszelllinie SKBR3. Auch bei ihnen waren ca. 30 % der PC3-Zellen im EpCAM^{high} Gate (Magbanua und Park 2013; Magbanua et al. 2018). Cackowski et al. bezeichnete die Population als EpCAM^{high}, die fünfmal so intensiv für EpCAM wie die EpCAM^{dim} Population war (Cackowski et al. 2019).

Neben der EpCAM-Intensität wurden weitere Kriterien für potenzielle DCCs festgelegt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine immunomagnetische Depletion mit CD45 durchgeführt, zusätzlich musste eine potenzielle DCC in der DZM negativ für CD45 sein (Absatz 4.3.4.3). Auch bei Magbanua et al. und Cackowski et al. mussten potenzielle DCCs EpCAM^{high} und CD45⁻ in der DZM sein. CD45 als Marker für hämatopoetische Zellen und Leukozyten wird häufig in der Immunzytochemie oder DZM als Negativmarker für DCCs verwendet (Choemmel et al. 2004; Wang et al. 2009; Magbanua et al. 2018; Rheinländer et al. 2018; Cackowski et al. 2019). Allerdings konnte für DCCs von Prostatakarzinom-Patienten gezeigt werden, dass diese zu 19 % das Transkript für CD45 exprimierten (Gužvić et al. 2014). Außerdem zeigten nur 20-28 % der EpCAM^{high} NCCs von KontrollpatientInnen ein Transkript für CD45 (Haunschild 2013). Das Vorliegen des Transkripts von CD45 ist demnach kein suffizienter Marker, um DCCs von NCCs zu unterscheiden. Auf Proteinebene fehlen entsprechende Daten. So wurden die Zellen mit einem CD45 Transkript bei Gužvić et al. nach einer CD45-Depletion gewonnen und wurden demnach nicht durch die Depletion erfasst. Dennoch könnte die Verwendung von CD45 als Negativmarker für DCCs auf Proteinebene eine Limitation der vorliegenden Arbeit darstellen. So besteht die Möglichkeit, dass CD45⁺ DCCs depletiert worden sind, wodurch sie von weiteren Analysen ausgeschlossen worden sind.

Während die Kriterien hinsichtlich EpCAM und CD45 zwischen den verschiedenen DZM-Ansätzen relativ einheitlich waren, variierten die weiteren Kriterien. Bei Cackowski et al. mussten die Zellen in der DZM neben CD45 auch negativ für Glykophorin A, CD34 und

Alkalische Phosphatase sein. Damit sollten neben den hämatopoetischen Zellen (CD45) auch erythroide Zellen (Glykophorin A), hämatopoetische Stammzellen (CD34) und osteoblastische Zellen (Alkalische Phosphatase) aus der DCC-Population ausgeschlossen werden (Cackowski et al. 2019). Wie in den Absätzen 5.2 und 5.3 dargelegt, eignen sich Glykophorin A und CD34 grundsätzlich, um kontaminierende EpCAM⁺ NCCs aus der DCC-Population auszuschließen. Glykophorin A wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Negativmarker verwendet, allerdings im Rahmen der Depletion und nicht in der DZM.

Die von Cackowski et al. verwendete Alkalische Phosphatase ist jedoch auch als Stammzellmarker bekannt (Štefková et al. 2015). Da die Entstehung von Krebs auch auf Zellen mit Stammzell-Eigenschaften zurückgeführt wird (Liu und Wicha 2010; Luo et al. 2015), ist es fraglich, ob damit DCCs negativ selektiert werden sollten. Eine Expression der Alkalischen Phosphatase ist beispielsweise bei Prostatakrebszellen gefunden worden (Rao et al. 2016). Dadurch ist ein fälschlicher Ausschluss von DCCs durch diesen Marker möglich. Während Cackowski et al. in der DZM demnach insgesamt engere, dabei aber ggf. ungeeignete Kriterien für eine potenzielle DCC anlegten, sind die Kriterien von Magbanua et al. vergleichbar zu den Ausgangskriterien der vorliegenden Arbeit.

Neben den unterschiedlichen DZM-Kriterien unterschieden sich die Ansätze auch in der Aufarbeitung der Knochenmarkproben (KMP), was eine Vergleichbarkeit erschwert. In vorliegender Arbeit wurden zusätzlich zu CD45 die Marker CD33, CD11b und Glykophorin A in die Depletion eingeschlossen. Diese richten sich gegen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen (CD11b; Elghetany 2002; Gorczyca et al. 2011; Rheinländer et al. 2018), myeloischen Zellen (CD33; Elghetany 2002) bzw. erythroide Zellen (Glykophorin A; Hu et al. 2013). Im Gegensatz dazu wurde bei Magbanua et al. und Cackowski et al. keine Negativselektion der KMP, sondern eine Positivselektion mittels einer Anreicherung von EpCAM-positiven Zellen durchgeführt (Magbanua et al. 2018; Cackowski et al. 2019).

Sowohl bei Magbanua et al. als auch bei Cackowski et al. wurde nach der DZM ein Sorting der Zellen angeschlossen. Die isolierten Pools potenzieller DCCs wurden mittels aCGH bzw. Sequenzierung der Exons analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich in der potenziellen DCC-Population, die entsprechend den oben genannten Kriterien sortiert worden war, Zellen mit genomischen Aberrationen fanden. Entsprechende Zellen aus einer Kontrollgruppe wurden dabei jedoch nicht bezüglich Aberrationen analysiert (Magbanua et al. 2018; Cackowski et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit konnte aus logistischen Gründen kein Sorting mit anschließender Analyse des Genoms durchgeführt werden. Da Magbanua et al. vergleichbare

Kriterien zur Findung von DCCs anlegten, weist dies darauf hin, dass sich unter den potenziellen DCCs der DZM dieser Arbeit auch tatsächlich aberrante DCCs befanden.

Die Detektion von EpCAM^{high} Zellen bzw. DCCs mittels DZM stellt im Gegensatz zur Detektion mittels FZM eine neuere und noch nicht standardisierte Methode dar. Deshalb wurden die Detektionsraten der beiden Methoden im Folgenden verglichen. Im direkten Vergleich gepaarter Proben, die sowohl in der DZM als auch in der FZM analysiert worden sind, zeigte sich in der DZM ein höherer Anteil an Proben mit EpCAM^{high} Zellen. So waren in der FZM 63% der betrachteten Proben positiv für EpCAM^{high} Zellen, während dies in der DZM 75% waren. Außerdem fand sich eine signifikant höhere durchschnittliche Anzahl an detektierten EpCAM^{high} Zellen. Im Median wurden in der FZM 0,5 Zellen pro 1 Million MNZ detektiert, bei der DZM lag diese Zahl bei 7,9 (Absatz 4.3.4.2). Trotz dieser Unterschiede ergab sich in der Analyse der gepaarten Proben eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Detektion in der FZM und DZM. Dies könnte auf eine höhere Sensitivität der DZM hinweisen, sodass eine Probe mit geringer DCC-Anzahl mittels der DZM als positiv gewertet wurde bzw. bei einer positiven Probe mehr Zellen detektiert wurden. Auch bei Magbanua et al. lag der gefundene mutmaßliche DCC-positive Anteil an Patientenproben über dem in der Literatur beschriebenen mithilfe der FZM detektierten Anteil. So waren in ihrem Patientenkollektiv aus Patientinnen mit frühem Brustkrebs in der Durchflusszytometrie 68 % der Proben positiv für mutmaßliche DCCs (Magbanua et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit lag dieser Wert bei 75 %, allerdings bei einer geringen Probenanzahl von nur vier Proben. Damit liegen die Positiv-Raten über dem Wert für M0-Patientinnen, der mittels Immunfluoreszenz ermittelt wurde, welcher bei 56 % bzw. 40,5 % lag (Haunschild 2013; Irlbeck 2019). Die Diskrepanz der Positiv-Raten zwischen DZM und FZM begründen auch Magbuana et al. mit der höheren Sensitivität der Durchflusszytometrie, weisen aber auch auf eine möglicherweise sinkende Spezifität hin (Magbanua et al. 2018).

Proben der KrebspatientInnen dieser Arbeit waren gemäß den genannten Kriterien EpCAM^{high}/CD45⁻ zu 56 % positiv für DCCs. Dabei waren 6 von 11 (55 %) der Proben von BlasenkrebspatientInnen positiv, 3 der 4 (75 %) Proben von Brustkrebspatientinnen und 0 von 1 (0 %) Proben des Prostatakrebspatienten (Absatz 4.3.4.3). Aufgrund der geringen Probenanzahl pro Krebsart ist hier ein Vergleich zur Literatur nur eingeschränkt sinnvoll. Bei 70 % der KontrollpatientInnen fanden sich Zellen, die EpCAM^{high}/CD45⁻ waren, deren Entität weiter bestimmt werden sollte (Absatz 5.4).

5.2 Einfluss der Depletion auf die Zusammensetzung des Knochenmarks

Die Depletion soll dazu dienen, die relative Häufigkeit von DCCs im Vergleich zu den MNZ in der KMP zu erhöhen. Dadurch müssen weniger Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie gescreent werden. Außerdem sinkt bei gleicher gescreenter Zellzahl die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Befundes. Die verwendeten Antikörper sind gegen CD33 (myeloische Zellen), CD11b (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen), Glycophorin A (Erythrozyten) und CD45 (Leukozyten) gerichtet. Da das Verfahren sehr zeit- und kostenintensiv ist, wurde es im Rahmen der durchgeführten Experimente näher betrachtet. Durch die Zählung in der Fluoreszenzmikroskopie war ersichtlich, dass die absolute Anzahl der MNZ durch die Depletion um 88 % bei Kontroll- und 90 % bei KrebspatientInnen verringert worden ist. Der Anteil der Erythrozyten sank bei KontrollpatientInnen um 80 %, bei KrebspatientInnen um 99 %. Die geringere Effektivität der Depletion bei KontrollpatientInnen lässt sich vermutlich auf die unterschiedliche Herkunft der Proben zurückführen. Die Proben der KontrollpatientInnen aus dem Acetabulum und Femur enthielten im Median 52 % Erythrozyten. Dies machte einen höheren Anteil aus als bei den KrebspatientInnen, bei welchen die Proben aus dem Beckenkamm gewonnen wurden und der Anteil an Erythrozyten bei 39 % lag. Deshalb wurde zum Erreichen derselben Endzellzahl die Säule bei den KontrollpatientInnen mit mehr Zellen beladen als bei den KrebspatientInnen, was zu der geringeren Effektivität der Depletion geführt haben könnte.

Neben den absoluten Zahlen war vor allem die Veränderung in der Zusammensetzung der Proben von Interesse, die durch die DZM ermittelt worden ist. In der DZM konnten dabei keine Aussagen über die Effektivität der Depletion von Erythrozyten durch Glycophorin A (CD235) getroffen werden, da Erythrozyten wegen ihrer geringen Größe nicht durch die DZM berücksichtigt worden sind. Glycophorin A könnte jedoch potenziell auch in Frage kommen, um erythroiden Vorläufer (Absatz 5.3) zu depletieren. Diese sind mit einem ca. doppelt so großem Durchmesser wie Erythrozyten auch durch die DZM erfassbar (Lammers et al. 2002; Ovchynnikova et al. 2018). Erythroide Vorläufer sind unter anderem auch EpCAM^{dim}. Der Anteil von EpCAM^{dim} Zellen sank jedoch durch die Depletion nicht, sondern stieg sogar relativ durch die Depletion durch die anderen Marker von 2 % auf 15 % (Absatz 4.3.3). Dass die EpCAM^{dim} erythroiden Vorläufer nicht zu einem größeren Anteil durch Glycophorin A depletiert wurden, ist durch die unterschiedliche Expression der Marker in der Entwicklung von Erythrozyten zu erklären. Mit steigendem Differenzierungsgrad der erythroiden Vorstufen nimmt die Expression von EpCAM ab (Lammers et al. 2002). Gleichzeitig nimmt die Expression von Glycophorin A zu (Abbildung 33). Erythrozytäre Vorstufen exprimieren also

zur Zeit der EpCAM-Expression noch kein oder wenig Glykophorin A (Lammers et al. 2002). Dadurch kann nur ein Teil der EpCAM^{dim} Zellen durch Glykophorin A depletiert werden und EpCAM^{dim} Zellen verbleiben in der Probe. Die effektive Depletion anderer Zellen, die EpCAM^{dim} sind, kann dann zum relativen Anstieg der EpCAM^{dim} Population führen.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Depletion von CD45 und CD11b auf die Probenzusammensetzung auswirkte. Durch das Vorkommen von CD11b auf heterogenen Zelltypen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen) ohne übergreifenden Marker, ist der Effekt dieses Antikörpers in der Depletion nicht quantifizierbar. Der Anteil der CD45⁻ Zellen stieg bei KrebspatientInnen durch die Depletion signifikant von 80,5 % auf 88,5 %. Bei KontrollpatientInnen gab es jedoch keine signifikante Änderung des CD45⁻ Anteils (Absatz 4.3.2). Dies kann wiederum auf die oben erwähnte unterschiedliche Probenzusammensetzung zwischen den beiden Patientengruppen zurückgeführt werden.

Der Effekt der Depletion durch CD33 konnte nicht direkt beurteilt werden, da keine myeloischen Markern im Panel verwendet worden sind. CD33⁺ Zellen sind aber zum Großteil auch positiv für CD45⁺ (Elghetany 2002; Hartmann 2006). Deshalb war die Depletion von CD33⁺ Zellen indirekt durch ein Ansteigen des CD45⁻ Anteils zu beobachten.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen, wurden durch die Depletion vor allem CD45^{high} Zellen depletiert, wohingegen CD45^{dim} Zellen in der Probe verblieben. Unter den depletierten CD45^{high} Zellen fanden sich vor allem CD3⁺ und CD27⁺ Zellen. CD3 ist ein T-Zellmarker (Jacob et al. 2017), was für eine effektive Depletion der T-Zellen spricht. CD27 kommt auf 90-100% der T-Zellen vor, was zu der Annahme passt, dass durch die Depletion vor allem T-Zellen depletiert worden sind (Lens et al. 1995). Die effektive Depletion von CD3⁺ Zellen durch CD45 konnte auch bei C. Hartmann beobachtet werden. Die bei ihr vorliegende effektive Depletion von CD19⁺ Zellen hingegen konnte nicht bestätigt werden (Hartmann 2006).

Zusammenfassend trug die Depletion dazu bei, dass Erythrozyten effektiv depletiert wurden. Die Depletion durch CD45 war vor allem für CD45^{high} Zellen effektiv, bei welchen es sich größtenteils um T-Zellen handelte. Im Gegensatz dazu konnten CD45^{dim} Zellen nicht in größerem Ausmaß depletiert werden. Dies war trotz der Verwendung des Markers CD33 der Fall, der diese CD45^{dim} Zellpopulation beinhalten sollte (Hartmann 2006).

In Bezug auf potenzielle DCCs (EpCAM^{high}/CD45⁻) konnte deren Frequenz bei KrebspatientInnen durch die Depletion signifikant von durchschnittlich 1,7 auf 3 Zellen pro 100.000 mononukleären Zellen erhöht werden. Auch bei KontrollpatientInnen erhöhte sich der Anteil an EpCAM^{high} Zellen (Absatz 4.3.4.4). Durch das Verfahren der Depletion müssen also weniger Zellen gescreent werden, um potenzielle NCCs oder DCCs zu detektieren.

5.3 EpCAM^{dim} Zellen bei KontrollpatientInnen

EpCAM⁺ Zellen kommen im Knochenmark von KontrollpatientInnen vor (Klein 2003; Choessel et al. 2004). Wie bei KrebspatientInnen auch, muss dabei differenziert werden zwischen EpCAM^{dim} und EpCAM^{high} Zellen. EpCAM^{dim} Zellen waren bei allen PatientInnen der vorliegenden Arbeit in der DZM vorhanden, während EpCAM^{high} Zellen nur bei einem Teil der KontrollpatientInnen zu finden waren (Absatz 4.3.4.2).

In der DZM machten die EpCAM^{dim} Zellen vor der Depletion im Durchschnitt einen Anteil von 2 % an allen mononukleären Zellen (MNZ) aus (Absatz 4.3.3). Bei Lammers et al. betrug dieser Anteil 5%, ebenfalls mittels DZM bestimmt (Lammers et al. 2002). EpCAM^{dim} Zellen in KMPs von KontrollpatientInnen fanden sich in der Immunfluoreszenz bei Klein et al. in einer Frequenz von 0,1% bis 0,01% an allen MNZ. In allen drei Ansätzen wurde vor der Zählung eine Dichtezentrifugation mittels Ficoll bzw. Percoll durchgeführt (Pantel et al. 1996; Klein et al. 2002; Lammers et al. 2002). Die Unterschiede in der Häufigkeit der EpCAM^{dim} Zellen zwischen DZM und Immunfluoreszenz können durch die höhere Sensitivität der Durchflusszytometrie erklärt werden (Magbanua et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der EpCAM^{dim} Färbung um eine echte Färbung handelte und diese nicht durch einen Zerfall der konjugierten Fluorochrome PE-Cy7 und PE-Dazzle entstand (Absatz 4.3.3.1).

Das in dieser Arbeit nachgewiesene häufige Vorkommen von EpCAM-positiven Zellen im Knochenmark bei KontrollpatientInnen ist auch wichtig für mögliche diagnostische Ansätze. So fanden Pachmann et al. im peripheren Blut eine sehr hohe Anzahl an EpCAM-positiven Zellen, bis zu 100.000 pro Milliliter und damit ein Zehnfaches der bis dahin gefundenen Werte. Anhand der Dynamik der Anzahl dieser Zellen machten sie das Ansprechen auf eine Chemotherapie fest. Zwar fand die Gruppe unter ihren Bedingungen bei 97 % der KontrollpatientInnen keine EpCAM-positiven Zellen. Dennoch stellt sich die Frage, ob es sich wirklich bei all diesen EpCAM-positiven Zellen tatsächlich um DCCs gehandelt hat. So wurde kein genomischer Nachweis für Mutationen erbracht (Pachmann et al. 2008). Da aber zumindest im Knochenmark 2 % der Zellen EpCAM positiv sind, ist dies ein Hinweis, dass solche Zellen auch im peripheren Blut vorkommen könnten. Eine Verwendung dieser Zellen als Marker für das Ansprechen auf eine Chemotherapie sollte daher überprüft werden.

Da die EpCAM^{dim} Zellen das Screenen nach EpCAM^{high} Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie erschweren, war die Identität dieser Zellen von Interesse. Zur Charakterisierung der Population standen dabei die Leukozyten- und Immunzellmarker aus Tabelle 4-4 zur Verfügung. In ca. einem Drittel der EpCAM^{dim} Zellen war CD45 als Marker für Leukozyten oder hämatopoetische Zellen koexprimiert. Dagegen waren zwei Drittel der EpCAM^{dim} Zellen

negativ für CD45. Die in das Panel der DZM eingeschlossenen lymphoiden Marker für Natürliche Killer-, Plasma-, B- und T-Zellen waren nur in geringer Prozentzahl (0-6 %) auf den EpCAM^{dim} Zellen exprimiert (Absatz 4.3.3.2). Anhand der verwendeten Marker konnten die übrigen EpCAM^{dim} Zellen nicht näher charakterisiert werden. Dass die EpCAM^{dim} Zellen mit 5% eine niedrige Expression von CD27 und CD319 zeigten (Tabelle 4-6) widerspricht nicht den durchgeführten RNA-Sequenzieranalysen, die eine Überexpression dieser Marker zeigten (Abbildung 8). Dies liegt darin begründet, dass die analysierten Zellen EpCAM^{high} Zellen waren und nicht wie die hier betrachteten Zellen nur EpCAM^{dim}.

Lammers et al. konnten mit ihren Markern in der DZM die Identität der EpCAM^{dim} Population näher bestimmen. Die EpCAM^{dim} Zellen wurden dabei als unreife erythroide Zellen identifiziert. Dabei zeigten die Zellen eine hohe Koexpression für die drei Marker CD71, E-Cadherin und CD34. Diese Marker wären damit grundsätzlich geeignet, die EpCAM^{dim} Population zu verringern und werden im Folgenden näher betrachtet. Da sich die Markerzusammensetzung der erythropoetischen Zellen im Verlauf ihrer Entwicklung verändert (Abbildung 33), können auch die EpCAM^{dim} Zellen näher charakterisiert werden und neue potenzielle Negativmarker eingegrenzt werden.

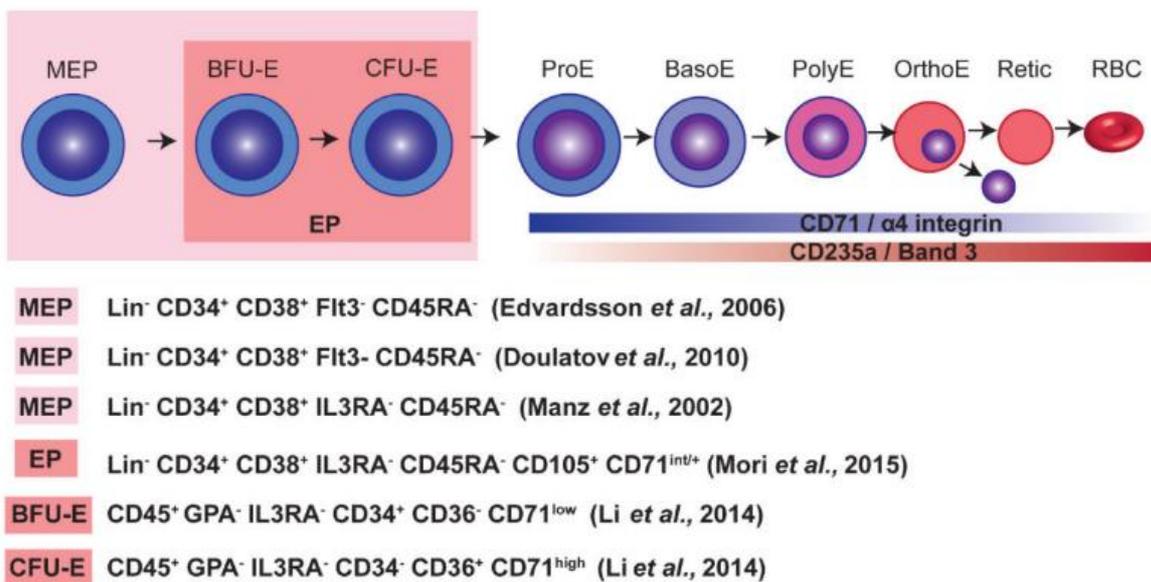


Abbildung 33 Schritte der Differenzierung der erythropoetischen Linie im Knochenmark. Der Megakaryozyten- und Erythrozyten-Progenitor (MEP) entwickelt sich zu den klonogenen Vorläufern, der erythroiden Burst-forming unit (BFU-E) und der erythroiden Colony-forming unit (CFU-E). Die nächsten Schritte gehen über den Proerythroblasten (ProE), den basophilen (BasoE), polychromatischen (PolyE) und orthochromatischen Erythroblasten (OrthoE) zum Retikulozyten (Retic) und schließlich zum roten Blutkörperchen (Red blood cell, RBC). Angegeben ist ein Überblick über die aktuellen Strategien diese Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker zu isolieren. Der Marker CD235a entspricht Glykophorin A. Abbildung und Unterschrift nach Nandakumar et al. 2016.

Ein Viertel der EpCAM^{dim} Zellen war zugleich positiv für CD34 (Lammers et al. 2002). CD34 ist ein Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen und geht im Stadium der erythroiden Colony-forming unit (CFU-E) verloren (Abbildung 33; Jacob et al. 2017). Unter den EpCAM^{dim} Zellen fanden sich also ca. ein Viertel klonogene erythroide Vorläufer (CD34⁺) und zu ca. drei Vierteln weiter differenzierte CFU-Es und Erythroblasten (CD34⁻). Dabei besitzen diese Zellpopulationen auch eine unterschiedliche Expression von CD45. Während die klonogenen Vorläufer bis zum Stadium der erythroiden Burst-forming unit (BFU-E) CD34⁺/CD45⁺ sind (Abbildung 33; Li et al. 2014), zeigen Erythroblasten keine Expression von CD45 mehr und sind damit CD34⁻/CD45⁻ (Jacob et al. 2017). Dementsprechend könnte es sich gemäß der Arbeit von Lammers et al. bei den EpCAM^{dim} Zellen dieser Arbeit um CD34⁺/CD45⁺ BFU-Es und CD34⁻/CD45⁻ Erythroblasten gehandelt haben. So sind bei Lammers et al. 72 % der Zellen negativ für CD34. Diese Zellen könnten den in vorliegender Arbeit gefundenen 66 % CD45-negativen EpCAM^{dim} Zellen entsprechen.

CD34 wäre also grundsätzlich ein geeigneter Marker, um im Rahmen einer Depletion zusätzlich zu CD45 ein Viertel der EpCAM^{dim} Zellen zu reduzieren. Der Marker CD34 wurde wegen dieser bekannten Koexpression mit EpCAM bei Cackowski et al. als Negativmarker für DCCs bei verwendet (Cackowski et al. 2019). Wie bereits erläutert sollte ein potenzieller Negativmarker nicht auf Brustkrebszellen vorkommen. Dadurch könnten DCCs mit Oberflächenmerkmalen vom Ursprungsgewebe der Brust fälschlicherweise depletiert werden. In verschiedenen Arbeiten wurde CD34 in histologischen Schnitten von Brustkrebspräparaten detektiert (Chen et al. 2015; Zhao und Li 2018). Dabei war die Expression von CD34 mit einem verkürzten Überleben assoziiert (Maschio et al. 2014). Da CD34 unter anderem ein Endothelzellmarker ist, wurden durch die Färbung von Brustkrebspräparaten die tumorbedingten neugebildeten Gefäße angefärbt (Chen et al. 2015). Eine Expression von CD34 auf Brustkrebszelllinien selbst fand sich bisher nicht (Choemmel et al. 2004). Da diese Brustkrebszellen die Ausgangszellen von DCCs sind und nicht die sekundär entstehenden Endothelzellen, könnte sich CD34 trotz der Expression in Tumorpräparaten als Negativmarker eignen. Für weitere Experimente wäre daher eine DZM-Analyse sinnvoll, in der die Koexpression von CD34 und EpCAM auf Knochenmarkzellen bestätigt wird. Außerdem sollten DCCs oder Brustkrebszelllinien auf eine CD34-Expression getestet werden.

Von Interesse wäre vor allem, die CD45⁻/CD34⁻ Erythroblasten durch Marker zu verringern, da diese durch die bisher durchgeführte Depletion mit CD45 nicht erreicht werden. Bei Lammers et al. waren 96 % der EpCAM^{dim} Zellen CD71⁺ und 97 % E-Cadherin⁺ (Lammers et al. 2002). Dies spricht dafür, dass es sich bei dem Großteil der kontaminierenden EpCAM^{dim} Zellen um

CFU-Es und frühe Erythroblasten handelt, bei welchen diese Markerexpression typisch ist (Abbildung 33; Armeanu et al. 2000; Li et al. 2014; Ohgami et al. 2014). Wie in Absatz 5.2 erläutert, eignet sich Glykophorin A nicht, um diese frühen Zellen zu detektieren, da es erst bei späteren Erythroblasten auftritt (Abbildung 33; Lammers et al. 2002; Nandakumar et al. 2016). Der Transferrinrezeptor CD71 ist assoziiert mit Zellwachstum und erhöhter DNA-Synthese (Habashy et al. 2010). Da der Rezeptor auch auf Brustkrebszellen überexprimiert wird, ist dieser Marker nicht als Negativmarker einsetzbar (Habashy et al. 2010).

Eine Expression des Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin kommt vor allem auf Epithelzellen vor (Schnell et al. 2013). So ist dieses Protein auch auf normalem Brustepithel und Brustkrebszellen exprimiert, sodass es sich ebenfalls nicht als Negativmarker eignet (Horne et al. 2018). Wie erwähnt ist eine Expression dieses Markers auf frühen Erythroblasten und Normoblasten bekannt. Lymphoide Zellen und alle anderen Zellen der myeloiden Reihen exprimieren dabei zu keinem Zeitpunkt E-Cadherin (Armeanu et al. 2000; Ohgami et al. 2014). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass die EpCAM^{dim} Zellen nur zu 0-6 % Lymphozytenmarker exprimierten (Absatz 4.3.3.2).

Gemäß Abbildung 33 exprimieren die Erythroblasten früher Stadien neben CD71 auch das Protein $\alpha 4$ Integrin (Nandakumar et al. 2016). Da CD71 nicht als Negativmarker verwendet werden kann, wäre dies ein interessantes Protein, das die EpCAM^{dim} Population effektiv verringern könnte. Integrine stellen eine wichtige Verbindung der Zelle mit der extrazellulären Matrix her und können somit Signale an die Zelle weiterleiten. Eine Rolle von Integrinen generell bei der Entstehung von Krebs wird diskutiert (Pontier und Muller 2008a, 2008b). Bei Brust-Sarkomen wurde auch speziell das $\alpha 4$ Integrin detektiert (Lee et al. 2012). Da dieses Protein sehr hilfreich bei der Verminderung der EpCAM^{dim} Population sein könnte, wäre eine Untersuchung von DCCs und Brustkrebszelllinien auf das Vorkommen von $\alpha 4$ Integrin sinnvoll.

5.4 Identifizierung von EpCAM^{high} Zellen bei KontrollpatientInnen als Plasmazellen

EpCAM^{high} Zellen, bei denen es sich nicht um DCCs, sondern um NCCs handelt, können zu falsch positiven Ergebnissen bei der Feststellung einer minimalen Resterkrankung führen. Die Kontamination der Population der potenziellen DCCs durch NCCs wird bei M0-Patientinnen auf 7,4 bis 74 % geschätzt (Choemmel et al. 2004). Dadurch werden aufwendige Analysen an gesunden Zellen durchgeführt, die sich durch eine spezifischere Detektion vermeiden lassen könnten (Haunschild 2013; Irlbeck 2019). Darum wurden NCCs identifiziert und

charakterisiert. Daraus sollten Methoden entwickelt werden, um zwischen den EpCAM^{high} DCCs und NCCs unterscheiden zu können (Absatz 5.5).

In dem DZM-basierten Ansatz dieser Arbeit zur Detektion von NCC waren 90 % der Proben von KontrollpatientInnen positiv für EpCAM^{high} Zellen. Dies unterschied sich nicht signifikant zu den 69 % positiven Proben bei KrebspatientInnen (Absatz 4.3.4.2). Die Positiv-Rate bei KontrollpatientInnen in der DZM lag somit über dem Wert von 56 % bzw. 50 %, der mittels Fluoreszenzmikroskopie festgestellt wurde (Gužvić et al. 2014; Irlbeck 2019).

Zur Unterscheidung von DCCs und NCCs wurden bereits verschiedene PCR-basierte Ansätze getestet. Gužvić et al. konnten keine mRNA-basierte PCR-Signatur (Endpunkt-PCR) finden, die zwischen Prostata-DCCs und NCCs unterscheiden konnte. Eingeschlossen waren dabei 17 Marker, die epithelial, Prostata-spezifisch, Tumor-spezifisch, hämatopoetisch oder erythroid waren (Gužvić et al. 2014). Auch C. Irlbeck entwickelte zur Unterscheidung von DCCs und NCCs eine mRNA-basierte PCR-Signatur (qPCR). Dabei waren Gene eingeschlossen, die spezifisch für M0-DCCs bzw. NCCs sind. Während die Signatur zwischen M0-DCCs und NCCs unterscheiden konnte, funktionierte die Separierung zwischen M1-DCCs und NCCs nicht mit denselben Markern (Irlbeck 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Ansatz gewählt, bei welchem DCCs und NCCs anhand einer Färbung von Oberflächenmarkern unterschieden werden sollten. Dadurch wäre schon im Gewinnungsprozess der Zellen eine spezifischere Selektion der potenziellen DCCs möglich. Anhand einer RNA-Sequenzierung wurden Gene identifiziert, die in DCCs von Brustkrebspatientinnen und NCCs differenziell exprimiert waren. Bei der Isolation dieser Zellen war eine hohe EpCAM-Intensität in der Fluoreszenzmikroskopie das Auswahlkriterium. Bei der Auswertung der Sequenzierung wurden Gene betrachtet, die Teil der Zellmembran sind, sowie Gene, die kein Bestandteil der Membran sind. Für NCCs fanden sich dabei Hinweise, dass es sich bei dieser Population um B- oder Plasmazellen handeln könnte. Die am stärksten exprimierten Genen der Membran waren bei NCCs die Gene *LAX1*, *IGHG3*, *CD319*, *ITM2C*, *CD27*, *TMEM107* und *IGHG2* (Abbildung 8). All diese Gene sind bekannt für ihr Vorkommen auf Immunzellen (Zhu et al. 2002; Woo et al. 2013; Grant et al. 2017). Dabei kommen diese Oberflächenmoleküle auch auf B- oder Plasmazellen vor. Für Plasmazellen ist die Expression von drei dieser Gene (*CD319*, *ITM2C* und *TMEM107*) sogar charakteristisch (Trezise et al. 2018; Uhlen et al. 2019; Soh et al. 2021). Unter den differenziell exprimierten Genen, die nicht Teil der Membran sind, fanden sich zahlreiche Immunglobuline (Abbildung 34 im Anhang). Immunglobuline werden von Plasmazellen und B-Zellen produziert (Agematsu et al. 1997;

Borghesi und Milcarek 2006). Dies bestärkte die Annahme, dass es sich bei den NCCs um Plasma- oder B-Zellen handeln könnte.

Zur genaueren Charakterisierung der DCC und NCCs wurde ein Verfahren zur Dimensionsreduktion angewendet, die Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP, Abbildung 3). Dabei ergaben sich zwei Cluster, wobei eines nur NCCs beinhaltete. Dies unterstreicht, dass es sich bei den EpCAM^{high} Zellen von KontrollpatientInnen um eine eigene Zellpopulation handelt und nicht um DCCs von PatientInnen mit einer bisher nicht detektierten Krebserkrankung.

Allerdings clusterten auch zwei Zellen von KontrollpatientInnen gemeinsam mit Zellen von KrebspatientInnen. Die Zellen dieser Analysen stammen aus dem Kollektiv von C. Irlbeck. Er konnte zeigen, dass eine dieser beiden Zellen in der Low-Pass-Analyse ein aberrantes Genom aufwies. Das Genom der zweiten Zelle ließ sich mittels mCGH und Low-Pass nicht eindeutig klassifizieren. Bei einem Durchschnittsalter der KontrollpatientInnen dieses Kollektivs von 66,2 Jahren wäre eine noch nicht entdeckte Tumorerkrankung dieser PatientInnen ein möglicher Erklärungsansatz für das Clustern mit den Krebszellen (Irlbeck 2019). Aufgrund des damaligen Ethikvotums ist ein Follow-Up bei den PatientInnen leider nicht möglich gewesen. Mithilfe bioinformatischer Methoden zur Einschätzung der Knochenmarkpopulationen konnten die NCCs näher charakterisiert werden (Becht et al. 2016; Hay et al. 2018). Auch diese bestätigten, dass es sich bei den NCCs um B-Zellen und Plasmazellen handelte (Abbildung 4 und Abbildung 5). Eine vermeintliche Signatur von Knochenmarkpopulationen auf DCCs konnte entkräftet werden, da sich diese Marker auch auf normalen Brustepithelzellen befanden (Abbildung 6 und Abbildung 7).

NCCs von KontrollpatientInnen wurden auch von Cackowski et al. untersucht. Die analysierten NCCs erfüllten dabei in der DZM die von ihnen gewählten Kriterien für DCCs, die Absatz 5.1 zu entnehmen sind. Pools dieser NCCs wurden sortiert und ihre RNA sequenziert. Bei der Genexpressionsanalyse mittels der gene set enrichment analysis (GSEA) ergab sich die höchste Anreicherung für die Gruppen der „Immunglobulinproduktion“ und der „Produktion von molekularen Mediatoren der Immunantwort“. Um die Immunzellzusammensetzung genauer zu bestimmen, wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zusätzlich durch den CIBERSORT Algorithmus analysiert. Auch hier ergab sich, dass B-Zellen, insbesondere Plasmazellen, unter den NCCs waren. Als Folge dessen schlugen sie vor, Plasmazellmarker als Negativmarker für DCCs einzuführen (Cackowski et al. 2019). Dies entspricht somit mit den Ergebnissen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNA-Sequenzierung.

5.5 CD27 und CD319 als Marker für NCCs

Durch die RNA-Sequenzierung ergaben sich CD27 und CD319 als mögliche Oberflächenmarker für NCCs in Abgrenzung zu DCCs. Bei CD27 handelt es sich um ein Oberflächenprotein, das zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehört. Das Protein kommt auf B-, Plasma-, NK- und T-Zellen vor (Lens et al. 1995; Boekel et al. 2007). CD27 ist ein kostimulatorisches Molekül für Lymphozyten. Es reguliert Funktion, Überleben und Differenzierung von B-, Plasma-, NK- und T-Zellen (van Montfrans et al. 2012). Dabei haben nur CD27⁺ B-Zellen im Gegensatz zu CD27⁻ B-Zellen die Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion (Agematsu et al. 1997). Auch die hier sequenzierten NCCs zeigten eine solche Expression von Immunglobulinen (Abbildung 34). CD27⁺ B-Zellen zeigen außerdem hohe Level an Adhäsionsstrukturen. Dies wurde als Hinweis gesehen, dass CD27⁺ B-Zellen prädisponiert sind, Zell-Zell-Interaktionen auszubilden (Maurer et al. 1990). Auch EpCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül. Dies ist ein Hinweis, dass CD27 und EpCAM in B-Zellen koexprimiert sein könnten.

CD319 ist ein Oberflächenprotein, das zur Familie der „Signaling lymphocytic activation molecules“ (SLAM) gehört. Die SLAM-Moleküle sind auf Immunzellen exprimiert und können zur Immunzellaktivierung und -inhibition führen. Der Marker CD319 kommt auf zahlreichen Immunzellen vor: auf aktivierten T-Zellen, B-, Plasma-, NK-Zellen, dendritischen Zellen sowie Monozyten und Makrophagen (Veillette 2010; Woo et al. 2013). Dabei zeigen Plasmazellen und B-Zellen die stärkste Expression von CD319 (Hsi et al. 2008).

Ziel war es, das differenzielle Vorkommen der Marker auf NCCs und DCCs zu bestätigen. Anschließend sollte für das Screening-Verfahren eine Doppelfärbung zusätzlich zu EpCAM mit CD27 und CD319 als Ausschlussmarker zu entwickelt werden. Dies hat zum Ziel, das Verfahren spezifischer für DCCs zu machen. Demnach sollten die beiden Marker auf DCCs möglichst nicht vorkommen. Wie Abbildung 8 zu entnehmen, kommen *CD27* und *CD319*, wie alle anderen aufgeführten NCC-Marker auch, in geringer Expression auch in DCCs vor. Dabei ist die RNA-Sequenzierung sehr sensitiv und möglicherweise lag nur das Transkript, aber kein Protein vor. Deshalb sollte geprüft werden, ob die Marker tatsächlich auf den Zellen zu finden sind. In Ermangelung von existierenden DCC-Zelllinien wurde dies anhand von Brustkrebszelllinien, die von Metastasen abstammen, sowie Vorläuferzelllinien getestet. Auch wenn die Eigenschaften von Primärtumor, Metastase und DCCs nicht übereinstimmen müssen (Schmidt-Kittler et al. 2003; Klein 2009; Redig und McAllister 2013), so ist die Markerzusammensetzung auf den Zelllinien zumindest ein Hinweis auf das Vorkommen der Marker auf DCCs. In der DZM waren die verwendeten Zelllinien negativ für CD27. Für CD319

ergab sich dabei eine leichte Positivität (Absatz 4.5.1). Diese konnte jedoch in der Fluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden (Absatz 4.5.2). Dies weist darauf hin, dass CD27 und CD319 auf DCCs nicht oder nur unter der in der Fluoreszenzmikroskopie detektierbaren Schwelle vorkommen. Auch in der Literatur fanden sich keine Hinweise, dass CD27 oder CD319 bei Brustkrebs exprimiert ist. So wurde gezeigt, dass CD319 nicht auf dem lobulärem Brustadenokarzinom exprimiert ist (Hsi et al. 2008). Dadurch eigneten sich die Marker grundsätzlich als Negativmarker von DCCs.

Anschließend wurden die EpCAM^{high} Zellen aus KMP von Krebs- und KontrollpatientInnen auf das Vorkommen von CD27 und CD319 geprüft (Absatz 4.3.4.4). Betrachtet wurden die EpCAM^{high} Zellen in Abhängigkeit von ihrem CD45-Status. Während unter den EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen DCCs zu erwarten waren, sollten die EpCAM^{high}/CD45⁺ Zellen hauptsächlich NCCs sein. Daher würde man bei KrebspatientInnen anteilig mehr EpCAM^{high}/CD45⁻ und bei KontrollpatientInnen mehr EpCAM^{high}/CD45⁺ erwarten. Dies zeigte sich jedoch nicht, da sich die CD45-Positivität in beiden EpCAM^{high} Populationen nicht signifikant unterschied (Abbildung 21). Dies könnte durch die geringe Frequenz der DCCs gegenüber der auch bei KrebspatientInnen vorkommenden NCCs erklärbar sein.

Bei KontrollpatientInnen waren die Marker CD27 und CD319 gleichmäßig in allen EpCAM^{high} Populationen vorhanden, unabhängig vom CD45-Status der Zellen. Plasmazellen können im Knochenmark sowohl CD45⁺ als auch CD45⁻ sein, sodass die gleichmäßige Verteilung über alle EpCAM^{high} Zellen hinweg plausibel ist (Pellat-Deceunynck und Bataille 2004). CD27 war dabei in 74% der Zellen und CD319 in 89 % der Zellen exprimiert.

Bei KrebspatientInnen war die Markerexpression der EpCAM^{high} Zellen abhängig von ihrem CD45-Status. So hatten nur 24 % der EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen den Marker CD27 und 36 % den Marker CD319. Bei den EpCAM^{high}/CD45⁺ Zellen hingegen waren 60 % der Zellen CD27⁺ und 100 % CD319⁺. Dieser signifikante Unterschied ist dadurch erklärbar, dass sich bei den KrebspatientInnen unter den EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen DCCs fanden, die CD27⁻ und CD319⁻ waren.

Da sich entsprechend der RNA-Analysen und DZM die beiden Marker CD27 und CD319 signifikant häufiger auf NCCs als auf mutmaßlichen DCCs fanden, wurde anschließend eine Färbung für die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt (Absatz 4.4). Beim Screening wurde zusätzlich zu EpCAM für die Marker CD27 und CD319 gefärbt, um doppelt positive Zellen als NCCs zu identifizieren. Dabei wurde ausgeschlossen, dass eine positive EpCAM-Färbung zu einer unspezifischen Färbung für CD27 und CD319 führt (Absatz 4.4.3). Alle gefundenen

EpCAM^{high} Zellen bei KrebspatientInnen waren dabei doppelt positiv für EpCAM oder einen der beiden Negativmarker (Absatz 4.4.2). Folglich handelte es sich bei diesen um NCCs.

5.6 Limitationen der Arbeit

Eine Limitation dieser Arbeit war die geringe Anzahl an eingeschlossenen KMP. So standen für die DZM Knochenmarkproben von nur sieben KontrollpatientInnen und 18 KrebspatientInnen zur Verfügung. Da nicht bei jeder Probe jede Analyse durchgeführt werden konnte, beruhen manche Auswertungen auf noch weniger Proben. Beispielsweise wurden nicht alle Proben in der Fluoreszenzmikroskopie betrachtet (Absatz 4.3.4.2) oder vor und nach Depletion gefärbt (Absatz 4.3.2). Dadurch konnten für die paarweisen Analysen zum Teil nur wenige Proben eingeschlossen werden.

Insbesondere die geringe Anzahl der eingeschlossenen Brustkrebspatientinnen stellte ein Problem dar. Da die Kooperation mit der Gynäkologie erst etabliert werden musste, konnten Proben von nur fünf Brustkrebspatientinnen analysiert werden. Um das Patientenkollektiv zu erweitern, wurden deshalb auch Proben von PatientInnen anderer Krebs-Entitäten eingeschlossen, und zwar von BlasenkrebspatientInnen und einem Prostatakrebspatienten. Die RNA-Sequenzierung bezüglich der Oberflächenmarker bezog sich jedoch auf den Vergleich von Zellen von Brustkrebs- zu KontrollpatientInnen (Absatz 4.2). Auch bei Blasen- und Prostatakrebs handelt es sich, wie auch bei Brustkrebs, um Karzinome. Bei Prostatakarzinomen ist die Verwendung von EpCAM zur Detektion von DCCs etabliert, bei Blasenkrebs bisher nur der Marker Zytokeratin (Gužvić et al. 2014; Retz et al. 2011). Dennoch muss die Übertragbarkeit der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung auf diese Krebstypen geprüft werden. Da mit CD319 und CD27 jedoch Marker betrachtet worden sind, die auf NCCs vorkommen, eigneten sich die KrebspatientInnen dennoch als Vergleichsgruppe zu den KontrollpatientInnen.

Da die Knochenmarkproben der KontrollpatientInnen nicht durch eine Punktion des Beckenkammes, sondern eine Abschabung der Hüftpfanne und Femurs gewonnen wurden, ist eine vergleichende Analyse möglicherweise nicht uneingeschränkt sinnvoll.

Die Problematik der Verwendung des Markers CD45 als Negativmarker für DCCs wurde in Absatz 5.1 erläutert.

Eine weitere Limitation der Arbeit lag in dem Setzen und der Validierung des EpCAM^{high} Gates. Das EpCAM^{high} Gate zur Detektion von DCCs und NCCs wurde anhand eines Spike-in-Experimentes gesetzt (Absatz 4.3.4.1). Dabei wurden ähnliche Vorgehensweisen wie in anderen Arbeitsgruppen verfolgt (Magbanua et al. 2018; Cackowski et al. 2019). Durch das

Spike-in-Experiment wurde sichergestellt, dass die Zellen im EpCAM^{high} Gate unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren. Dabei konnte aber keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Zellen in diesem Gate tatsächlich eine vergleichbare EpCAM-Intensität wie die unter dem Fluoreszenzmikroskop isolierten Zellen hatten. Des Weiteren wurde keine Analyse des Genoms der Zellen im EpCAM^{high} Gate durchgeführt. Dadurch gibt es bislang keinen Nachweis, dass sich in dieser Population tatsächlich DCCs mit genomischen Aberrationen fanden. Dies ist im Rahmen weiterer Projekte geplant.

6 Zusammenfassung

Die meisten Todesfälle an Brustkrebs sind durch die Folgen von Metastasen bedingt, die sich aus disseminierten Tumorzellen (disseminated cancer cells, DCCs) entwickeln. Um DCCs zielgerichtet therapieren zu können, müssen diese sicher identifiziert und molekular charakterisiert werden. Die Detektion von DCCs erfolgt in Knochenmarkproben anhand des Oberflächenmarkers EpCAM. Dabei zeigen DCCs eine hohe Expression dieses Markers (EpCAM^{high}). Allerdings kommen auch im Knochenmark von KontrollpatientInnen EpCAM^{high} Zellen (non cancer cells, NCCs) sowie leicht EpCAM-positive Zellen (EpCAM^{dim}) vor. Dies führt zu einer Kontamination der mutmaßlichen DCC-Fraktion. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, NCCs und DCCs näher zu charakterisieren und dadurch das Screening nach DCCs spezifischer für diese zu gestalten.

In einer RNA-Sequenzierung von NCCs und DCCs wurden die differenziell exprimierten Gene zwischen den beiden Gruppen identifiziert sowie Clusteranalysen durchgeführt. Dabei zeigten sich die NCCs als eigenes Cluster und die RNA-Signatur wies auf eine B-Zell- oder Plasmazell-Identität der NCCs hin. Zwei Plasma- bzw. B-Zellmarker, CD27 und CD319, wurden daraufhin als potenzielle Marker für NCCs ausgewählt. Knochenmarkproben von Kontroll- und KrebspatientInnen wurden in der Durchflusszytometrie auf das Vorkommen von EpCAM^{high} Zellen untersucht. Dabei kamen CD27 und CD319 bei EpCAM^{high} Zellen von KontrollpatientInnen signifikant häufiger vor als bei den EpCAM^{high} Zellen von KrebspatientInnen. Aufgrund dieser Ergebnisse handelt es sich bei NCCs wahrscheinlich um Plasma- oder B-Zellen. Diese könnten durch die Verwendung von CD27 und CD319 als Negativmarker im Rahmen einer Depletion oder Doppelfärbung zu einer spezifischeren Erkennung von DCCs führen. Dadurch ließen sich zum einen Zeit und Kosten sparen durch gezieltere Analysen von DCCs. Zum anderen könnte dies zu einer spezifischeren Erkennung von Patientinnen mit DCCs und einem damit einhergehenden erhöhten Risiko für Metastasen führen.

Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit das Verfahren der Durchflusszytometrie für DCCs etabliert werden. Dadurch können mehr und schneller Knochenmarkproben untersucherunabhängig auf das potenzielle Vorkommen von DCCs getestet werden. Durch die Durchflusszytometrie der Knochenmarkproben war es außerdem möglich, die Effektivität der durchgeführten Depletion zu bestätigen, sodass diese weiterhin durchgeführt werden sollte. Darüber hinaus konnte die EpCAM^{dim} Population im Knochenmark näher als erythroide Vorläuferzellen charakterisiert werden, sodass potenzielle Marker zur weiteren Reduktion dieser Population identifiziert werden konnten.

7 Literaturverzeichnis

Agematsu, K.; Nagumo, H.; Yang, F. C.; Nakazawa, T.; Fukushima, K.; Ito, S. et al. (1997): B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. In: *European journal of immunology* 27 (8), S. 2073–2079. DOI: 10.1002/eji.1830270835.

Aguirre-Ghiso, Julio A. (2007): Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. In: *Nature reviews. Cancer* 7 (11), S. 834–846. DOI: 10.1038/nrc2256.

Armeanu, Sorin; Müller, Claudia A.; Klein, Gerd (2000): Involvement of E-cadherin in the Development of Erythroid Cells; Subject Heading. In: *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 5 (4), S. 307–316. DOI: 10.1080/10245332.2000.11746524.

Balzar, M.; Winter, M. J.; Boer, C. J. de; Litvinov, S. V. (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 77 (10), S. 699–712. DOI: 10.1007/s001099900038.

Becht, Etienne; Giraldo, Nicolas A.; Lacroix, Laetitia; Buttard, Bénédicte; Elarouci, Nabila; Petitprez, Florent et al. (2016): Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. In: *Genome Biology* 17 (1), S. 218. DOI: 10.1186/s13059-016-1070-5.

Bidard, François-Clément; Vincent-Salomon, Anne; Sigal-Zafrani, Brigitte; Rodrigues, Manuel; Diéras, Véronique; Mignot, Laurent et al. (2008): Time to metastatic relapse and breast cancer cells dissemination in bone marrow at metastatic relapse. In: *Clinical & experimental metastasis* 25 (8), S. 871–875. DOI: 10.1007/s10585-008-9203-1.

Boekel, Edwin ten; Siegert, Carl E.; Vrieling, Gert-Jan; van Dam, Veerle C.; Ceelen, Auke; Kieviet, Wim de (2007): Analyses of CD27++ plasma cells in peripheral blood from patients with bacterial infections and patients with serum antinuclear antibodies. In: *Journal of clinical immunology* 27 (5), S. 467–476. DOI: 10.1007/s10875-007-9099-6.

Borghesi, Lisa; Milcarek, Christine (2006): From B Cell to Plasma Cell: Regulation of V(D)J Recombination and Antibody Secretion. In: *IR* 36 (1-3), S. 27–32. DOI: 10.1385/IR:36:1:27.

Breast Cancer Association Consortium (2021): Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. In: *The New England journal of medicine* 384 (5), S. 428–439. DOI: 10.1056/NEJMoa1913948.

Brennan, M. E.; Houssami, N. (2012): Evaluation of the evidence on staging imaging for detection of asymptomatic distant metastases in newly diagnosed breast cancer. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 21 (2), S. 112–123. DOI: 10.1016/j.breast.2011.10.005.

Brierley, James; Gospodarowicz, Mary K.; Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.

Cackowski, Frank C.; Wang, Yugang; Decker, Joseph T.; Sifuentes, Christopher; Weindorf, Steven; Jung, Younghun et al. (2019): Detection and isolation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. In: *The Prostate* 79 (14), S. 1715–1727. DOI: 10.1002/pros.23896.

Chambers, Ann F.; Groom, Alan C.; MacDonald, Ian C. (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (8), S. 563–572. DOI: 10.1038/nrc865.

Chen, Zhanhong; Xu, Shenhua; Xu, Weizhen; Huang, Jian; Zhang, G. U.; Lei, Lei et al. (2015): Expression of cluster of differentiation 34 and vascular endothelial growth factor in breast cancer, and their prognostic significance. In: *Oncology letters* 10 (2), S. 723–729. DOI: 10.3892/ol.2015.3348.

Chéry, Lisly; Lam, Hung-Ming; Coleman, Ilsa; Lakely, Bryce; Coleman, Roger; Larson, Sandy et al. (2014): Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways. In: *Oncotarget* 5 (20), S. 9939–9951. DOI: 10.18632/oncotarget.2480.

Choesmel, Valérie; Anract, Philippe; Høifødt, Hanne; Thiery, Jean-Paul; Blin, Nathalie (2004): A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases. In: *Cancer* 101 (4), S. 693–703. DOI: 10.1002/cncr.20391.

Chu, Justin; Sadeghi, Sara; Raymond, Anthony; Jackman, Shaun D.; Nip, Ka Ming; Mar, Richard et al. (2014): BioBloom tools: fast, accurate and memory-efficient host species sequence screening using bloom filters. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (23), S. 3402–3404. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu558.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2019): Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. In: *The Lancet* 394 (10204), S. 1159–1168. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31709-X.

Csardi, Gabor; Nepusz, Tamas (2006): The igraph software package for complex network research. In: *InterJournal Complex Systems* (1695).

Dobin, Alexander; Davis, Carrie A.; Schlesinger, Felix; Drenkow, Jorg; Zaleski, Chris; Jha, Sonali et al. (2013): STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (1), S. 15–21. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635.

Elghetany, M. Tarek (2002): Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. In: *Blood cells, molecules & diseases* 28 (2), S. 260–274. DOI: 10.1006/bcmd.2002.0513.

European Medicines Agency (2009): REMOVAB EPAR summary for the public.

European Medicines Agency (2017): Removab Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union.

Ewing, James (1928): Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. In: *Br. J. Surg.* 16 (61), S. 174–175. DOI: 10.1002/bjs.1800166126.

Fehm, Tanja; Braun, Stephan; Muller, Volkmar; Janni, Wolfgang; Gebauer, Gerhard; Marth, Christian et al. (2006): A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. In: *Cancer* 107 (5), S. 885–892. DOI: 10.1002/cncr.22076.

Gorczyca, Wojciech; Sun, Zhong-Yi; Cronin, William; Li, Xiaoyu; Mau, Sophal; Tugulea, Sorina (2011): Immunophenotypic pattern of myeloid populations by flow cytometry analysis. In: *Methods in cell biology* 103, S. 221–266. DOI: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00010-3.

Göttlinger, H. G.; Funke, I.; Johnson, J. P.; Gokel, J. M.; Riethmüller, G. (1986): The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. In: *International journal of cancer* 38 (1), S. 47–53. DOI: 10.1002/ijc.2910380109.

Grant, Emma J.; Nüssing, Simone; Sant, Sneha; Clemens, E. Bridie; Kedzierska, Katherine (2017): The role of CD27 in anti-viral T-cell immunity. In: *Current opinion in virology* 22, S. 77–88. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.12.001.

Grujovic, Ana (2019): Regulation of dormancy in disseminated breast cancer cells.

Gupta, Gaorav P.; Massagué, Joan (2006): Cancer metastasis: building a framework. In: *Cell* 127 (4), S. 679–695. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.001.

Gužvić, Miodrag; Braun, Bernhard; Ganzer, Roman; Burger, Maximilian; Nerlich, Michael; Winkler, Sebastian et al. (2014): Combined genome and transcriptome analysis of single disseminated cancer cells from bone marrow of prostate cancer patients reveals unexpected transcriptomes. In: *Cancer research* 74 (24), S. 7383–7394. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0934.

Habashy, Hany Onsy; Powe, Desmond G.; Staka, Cindy M.; Rakha, Emad A.; Ball, Graham; Green, Andrew R. et al. (2010): Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. In: *Breast cancer research and treatment* 119 (2), S. 283–293. DOI: 10.1007/s10549-009-0345-x.

Hagemester, Frederick B.; Buzdar, Aman U.; Luna, Mario A.; Blumenschein, George R. (1980): Causes of death in breast cancer a clinicopathologic study. In: *Cancer* 46 (1), S. 162–167. DOI: 10.1002/1097-0142(19800701)46:1<162::aid-cnrcr2820460127>3.0.co;2-b.

Hartkopf, Andreas D.; Taran, Florin-Andrei; Wallwiener, Markus; Hahn, Markus; Becker, Sven; Solomayer, Erich-Franz et al. (2014): Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 50 (15), S. 2550–2559. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.06.025.

Hartmann, Claudia Helena (2006): Grundlagen für zielgerichtete adjuvante Therapien solider Tumore: Eine Methode zur Analyse der globalen Genexpression einzelner metastatischer Vorläuferzellen. Ludwig-Maximilians Universität, München.

Haunschild, Gundula (2013): Nachweis und molekulare Charakterisierung EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patienten.

Hay, Stuart B.; Ferchen, Kyle; Chetal, Kashish; Grimes, H. Leighton; Salomonis, Nathan (2018): The Human Cell Atlas bone marrow single-cell interactive web portal. In: *Experimental Hematology* 68, S. 51–61. DOI: 10.1016/j.exphem.2018.09.004.

Heiss, Markus M.; Murawa, Pawel; Koralewski, Piotr; Kutarska, Elzbieta; Kolesnik, Olena O.; Ivanchenko, Vladimir V. et al. (2010): The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized

phase II/III trial. In: *International journal of cancer* 127 (9), S. 2209–2221. DOI: 10.1002/ijc.25423.

Horne, Hisani N.; Oh, Hannah; Sherman, Mark E.; Palakal, Maya; Hewitt, Stephen M.; Schmidt, Marjanka K. et al. (2018): E-cadherin breast tumor expression, risk factors and survival: Pooled analysis of 5,933 cases from 12 studies in the Breast Cancer Association Consortium. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 6574. DOI: 10.1038/s41598-018-23733-4.

Hosseini, Hedayatollah; Obradović, Milan M. S.; Hoffmann, Martin; Harper, Kathryn L.; Sosa, Maria Soledad; Werner-Klein, Melanie et al. (2016): Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. In: *Nature* 540 (7634), S. 552–558. DOI: 10.1038/nature20785.

Houssami, Nehmat; Macaskill, Petra; Marinovich, M. Luke; Morrow, Monica (2014): The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis. In: *Annals of surgical oncology* 21 (3), S. 717–730. DOI: 10.1245/s10434-014-3480-5.

Howlander, N.; Am Noone; Krapcho, M.; Miller, D.; Brest, A.; Yu, M. et al. (2019): SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016. based on November 2018 SEER data submission, postes to the SEER web site. Hg. v. National Cancer Institute. Bethesda, MD. Online verfügbar unter https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/sections.html, zuletzt aktualisiert am 2019., zuletzt geprüft am 20.03.2020.

Hsi, Eric D.; Steinle, Roxanne; Balasa, Balaji; Szmania, Susann; Draksharapu, Aparna; Shum, Benny P. et al. (2008): CS1, a Potential New Therapeutic Antibody Target for the Treatment of Multiple Myeloma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (9), S. 2775–2784. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4246.

Hu, Jingping; Liu, Jing; Xue, Fumin; Halverson, Gregory; Reid, Marion; Guo, Anqi et al. (2013): Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. In: *Blood* 121 (16), S. 3246–3253. DOI: 10.1182/blood-2013-01-476390.

Huang, Junjie; Chan, Paul S. F.; Lok, Veeleah; Chen, Xiao; Ding, Hanyue; Jin, Yinzi et al. (2021): Global incidence and mortality of breast cancer: a trend analysis. In: *Aging (Albany NY)* 13 (4), S. 5748–5803. DOI: 10.18632/aging.202502.

Huang, Li; Yang, Yanhong; Yang, Fei; Liu, Shaomin; Zhu, Ziqin; Lei, Zili; Guo, Jiao (2018): Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). In: *International journal of molecular medicine* 42 (4), S. 1771–1785. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3764.

Irlbeck, Christoph (2019): Molecular characterization of disseminated cancer cells isolated from patients with luminal B type breast cancer.

Jacob, Marie-Christine; Souvignet, Alice; Pont, Julie; Solly, Françoise; Mondet, Julie; Kesr, Sanae et al. (2017): One tube with eight antibodies for 14-part bone marrow leukocyte differential using flow cytometry. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 92 (4), S. 299–309. DOI: 10.1002/cyto.b.21369.

Katalinic, Alexander; Eisemann, Nora; Kraywinkel, Klaus; Noftz, Maria R.; Hübner, Joachim (2019): Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German

mammography screening program. In: *International journal of cancer*. DOI: 10.1002/ijc.32767.

Keller, Patricia J.; Arendt, Lisa M.; Skibinski, Adam; Logvinenko, Tanya; Klebba, Ina; Dong, Shumin et al. (2012): Defining the cellular precursors to human breast cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8), S. 2772–2777. DOI: 10.1073/pnas.1017626108.

Klein, C. A.; Schmidt-Kittler, O.; Schardt, J. A.; Pantel, K.; Speicher, M. R.; Riethmüller, G. (1999): Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8), S. 4494–4499. DOI: 10.1073/pnas.96.8.4494.

Klein, Christoph A. (2003): The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection. In: *Advances in cancer research* 89, S. 35–67.

Klein, Christoph A. (2009): Parallel progression of primary tumours and metastases. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (4), S. 302–312. DOI: 10.1038/nrc2627.

Klein, Christoph A. (2011): Framework models of tumor dormancy from patient-derived observations. In: *Current opinion in genetics & development* 21 (1), S. 42–49. DOI: 10.1016/j.gde.2010.10.011.

Klein, Christoph A. (2013): Selection and adaptation during metastatic cancer progression. In: *Nature* 501 (7467), S. 365–372. DOI: 10.1038/nature12628.

Klein, Christoph A.; Seidl, Stefan; Petat-Dutter, Karina; Offner, Sonja; Geigl, Jochen B.; Schmidt-Kittler, Oleg et al. (2002): Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. In: *Nature biotechnology* 20 (4), S. 387–392. DOI: 10.1038/nbt0402-387.

Lammers, Reiner; Giesert, Christina; Grünebach, Frank; Marxer, Anke; Vogel, Wichard; Bühring, Hans-Jörg (2002): Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. In: *Experimental Hematology* 30 (6), S. 537–545. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00798-1.

Lee, Kyung-Min; Han, Wonshik; Kim, Jong Bin; Shin, Incheol; Ko, Eunyoung; Park, In Ae et al. (2012): The CD49d+/high subpopulation from isolated human breast sarcoma spheres possesses tumor-initiating ability. In: *International journal of oncology* 40 (3), S. 665–672. DOI: 10.3892/ijo.2011.1289.

Leitlinienprogramm Onkologie (2021): S3-Leitlinie Mammakarzinom. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Version 4.4. Online verfügbar unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.4.pdf.

Lens, S. M.; Jong, R. de; Hintzen, R. Q.; Koopman, G.; van Lier, R. A.; van Oers, R. H. (1995): CD27-CD70 interaction: unravelling its implication in normal and neoplastic B-cell growth. In: *Leukemia & lymphoma* 18 (1-2), S. 51–59. DOI: 10.3109/10428199509064922.

- Li, Jie; Hale, John; Bhagia, Pooja; Xue, Fumin; Chen, Lixiang; Jaffray, Julie et al. (2014): Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. In: *Blood* 124 (24), S. 3636–3645. DOI: 10.1182/blood-2014-07-588806.
- Liao, Yang; Smyth, Gordon K.; Shi, Wei (2013): The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. In: *Nucleic acids research* 41 (10), e108. DOI: 10.1093/nar/gkt214.
- Litvinov, S. V.; Balzar, M.; Winter, M. J.; Bakker, H. A.; Briaire-de Bruijn, I. H.; Prins, F. et al. (1997): Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. In: *The Journal of cell biology* 139 (5), S. 1337–1348. DOI: 10.1083/jcb.139.5.1337.
- Liu, Mengmeng; Yang, Jing; Xu, Bushu; Zhang, Xing (2021): Tumor metastasis: Mechanistic insights and therapeutic interventions. In: *MedComm* 2 (4), S. 587–617. DOI: 10.1002/mco2.100.
- Liu, Suling; Wicha, Max S. (2010): Targeting breast cancer stem cells. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (25), S. 4006–4012. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.5388.
- Lu, Jing; Steeg, Patricia S.; Price, Janet E.; Krishnamurthy, Savitri; Mani, Sendurai A.; Reuben, James et al. (2009): Breast cancer metastasis: challenges and opportunities. In: *Cancer research* 69 (12), S. 4951–4953. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0099.
- Lun, Aaron T. L.; McCarthy, Davis J.; Marioni, John C. (2016): A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. In: *F1000Research* 5, S. 2122. DOI: 10.12688/f1000research.9501.2.
- Luo, Ming; Clouthier, Shawn G.; Deol, Yadwinder; Liu, Suling; Nagrath, Sunitha; Azizi, Ebrahim; Wicha, Max S. (2015): Breast cancer stem cells: current advances and clinical implications. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1293, S. 1–49. DOI: 10.1007/978-1-4939-2519-3_1.
- Luzzi, Keith J.; MacDonald, Ian C.; Schmidt, Eric E.; Kerkvliet, Nancy; Morris, Vincent L.; Chambers, Ann F.; Groom, Alan C. (1998): Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. In: *The American Journal of Pathology* 153 (3), S. 865–873. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
- Macfarlane, Robyn; Seal, Melanie; Speers, Caroline; Woods, Ryan; Masoudi, Hamad; Aparicio, Samuel; Chia, Stephen K. (2012): Molecular Alterations Between the Primary Breast Cancer and the Subsequent Locoregional/Metastatic Tumor. In: *The oncologist* 17 (2), S. 172–178. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0127.
- Magbanua, Mark Jesus M.; Das, Rishi; Polavarapu, Prithi; Park, John W. (2015): Approaches to isolation and molecular characterization of disseminated tumor cells. In: *Oncotarget* 6 (31), S. 30715–30729. DOI: 10.18632/oncotarget.5568.
- Magbanua, Mark Jesus M.; Park, John W. (2013): Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 64 (2), S. 114–118. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.07.029.

- Magbanua, Mark Jesus M.; Rugo, Hope S.; Hauranieh, Louai; Roy, Ritu; Scott, Janet H.; Lee, Jen Chieh et al. (2018): Genomic and expression profiling reveal molecular heterogeneity of disseminated tumor cells in bone marrow of early breast cancer. In: *NPJ breast cancer* 4, S. 31. DOI: 10.1038/s41523-018-0083-5.
- Maschio, Larissa Bazela; Madallozo, Bruna Bento; Capellasso, Bruno Augusto Mendonça; Jardim, Bruna Victorasso; Moschetta, Marina Gobbe; Jampietro, Juliano et al. (2014): Immunohistochemical investigation of the angiogenic proteins VEGF, HIF-1 α and CD34 in invasive ductal carcinoma of the breast. In: *Acta histochemica* 116 (1), S. 148–157. DOI: 10.1016/j.acthis.2013.06.005.
- Maurer, D.; Holter, W.; Majdic, O.; Fischer, G. F.; Knapp, W. (1990): CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. In: *European journal of immunology* 20 (12), S. 2679–2684. DOI: 10.1002/eji.1830201223.
- McCarthy, Davis J.; Campbell, Kieran R.; Lun, Aaron T. L.; Wills, Quin F. (2017): Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 33 (8), S. 1179–1186. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw777.
- McInnes, Leland; Healy, John; Melville, James (2018): UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. Online verfügbar unter <https://arxiv.org/pdf/1802.03426>.
- Meng, Songdong; Tripathy, Debasish; Frenkel, Eugene P.; Shete, Sanjay; Naftalis, Elizabeth Z.; Huth, James F. et al. (2004): Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (24), S. 8152–8162. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110.
- Nandakumar, Satish K.; Ulirsch, Jacob C.; Sankaran, Vijay G. (2016): Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives. In: *British journal of haematology* 173 (2), S. 206–218. DOI: 10.1111/bjh.13938.
- Naume, Bjørn; Synnestvedt, Marit; Falk, Ragnhild Sørum; Wiedswang, Gro; Weyde, Kjetil; Risberg, Terje et al. (2014): Clinical outcome with correlation to disseminated tumor cell (DTC) status after DTC-guided secondary adjuvant treatment with docetaxel in early breast cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (34), S. 3848–3857. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.9327.
- Ohgami, Robert S.; Chisholm, Karen M.; Ma, Lisa; Arber, Daniel A. (2014): E-cadherin is a specific marker for erythroid differentiation and has utility, in combination with CD117 and CD34, for enumerating myeloblasts in hematopoietic neoplasms. In: *American journal of clinical pathology* 141 (5), S. 656–664. DOI: 10.1309/AJCP8M4QQTAZPGRP.
- O'Shaughnessy, Joyce (2005): Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. In: *The oncologist* 10 Suppl 3, S. 20–29. DOI: 10.1634/theoncologist.10-90003-20.
- Osta, Walid A.; Chen, Yian; Mikhitarian, Kaidi; Mitas, Michael; Salem, Mohamed; Hannun, Yusuf A. et al. (2004): EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. In: *Cancer research* 64 (16), S. 5818–5824. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0754.

- Ovchynnikova, E.; Agliandolo, F.; von, Lindern M.; van, den Akker E. (2018): The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation. In: *Frontiers in physiology* 9. DOI: 10.3389/fphys.2018.00829.
- Pachmann, Katharina; Camara, Oumar; Kavallaris, Andreas; Krauspe, Sabine; Malarski, Nele; Gajda, Mieczyslaw et al. (2008): Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (8), S. 1208–1215. DOI: 10.1200/JCO.2007.13.6523.
- Pantel, K.; Angstwurm, M.; Riethmüller, G.; Passlick, B.; Izbicki, J.; Thetter, O.; Häussinger, K. (1996): Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. In: *The Lancet* 347 (9002), S. 649–653. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)91203-9.
- Pantel, K.; Cote, R. J.; Fodstad, O. (1999): Detection and clinical importance of micrometastatic disease. In: *Journal of the National Cancer Institute* 91 (13), S. 1113–1124. DOI: 10.1093/jnci/91.13.1113.
- Pantel, Klaus; Alix-Panabières, Catherine; Riethdorf, Sabine (2009): Cancer micrometastases. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 6 (6), S. 339–351. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.44.
- Pellat-Deceunynck, C.; Bataille, R. (2004): Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. In: *Blood cells, molecules & diseases* 32 (2), S. 293–301. DOI: 10.1016/j.bcmed.2003.12.001.
- Pontier, Stephanie M.; Muller, William J. (2008a): Integrins in breast cancer dormancy. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 116 (7-8), S. 677–684. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2008.01026.x.
- Pontier, Stephanie M.; Muller, William J. (2008b): Integrins in mammary-stem-cell biology and breast-cancer progression – a role in cancer stem cells? In: *Journal of Cell Science* 122 (2), S. 207–214. DOI: 10.1242/jcs.040394.
- Rao, S. R.; Snaith, A. E.; Marino, D.; Cheng, X.; Lwin, S. T.; Orriss, I. R. et al. (2016): Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer. In: *British Journal of Cancer* 116 (2), S. 227–236. DOI: 10.1038/bjc.2016.402.
- Redig, A. J.; McAllister, S. S. (2013): Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. In: *Journal of internal medicine* 274 (2), S. 113–126. DOI: 10.1111/joim.12084.
- Retz, Margitta; Roterung, Jens; Nawroth, Roman; Buchner, Alexander; Stöckle, Michael; Gschwend, Juergen E.; Lehmann, Jan (2011): Long-term follow-up of bladder cancer patients with disseminated tumour cells in bone marrow. In: *European urology* 60 (2), S. 231–238. DOI: 10.1016/j.eururo.2010.12.014.
- Rheinländer, Andreas; Schraven, Burkhardt; Bommhardt, Ursula (2018): CD45 in human physiology and clinical medicine. In: *Immunology letters* 196, S. 22–32. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.01.009.
- Rhiem, K.; Schmutzler, R. K. (2015): Risikofaktoren und Prävention des Mammakarzinoms. In: *Onkologie* 21 (3), S. 202–210. DOI: 10.1007/s00761-014-2837-5.

Riethdorf, Sabine; Wikman, Harriet; Pantel, Klaus (2008): Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. In: *International journal of cancer* 123 (9), S. 1991–2006. DOI: 10.1002/ijc.23825.

Riethmüller, G.; Gruber, R.; Schneider-Gädicke, E.; Schlimok, G.; Witte, J.; Raab, R. et al. (1994): Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. In: *The Lancet* 343 (8907), S. 1177–1183. DOI: 10.1016/S0140-6736(94)92398-1.

Ritte, Rebecca; Lukanova, Annekatrin; Tjønneland, Anne; Olsen, Anja; Overvad, Kim; Mesrine, Sylvie et al. (2013): Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. In: *International journal of cancer* 132 (11), S. 2619–2629. DOI: 10.1002/ijc.27913.

Robert Koch-Institut (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 : eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Berlin: Robert Koch-Institut (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).

Robert Koch-Institut (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.

Roy, Rohini; Chun, Jarin; Powell, Simon N. (2011): BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. In: *Nature reviews. Cancer* 12 (1), S. 68–78. DOI: 10.1038/nrc3181.

Saadatmand, S.; Kruijf, E. M. de; Sajet, A.; Dekker-Ensink, N. G.; van Nes, J. G. H.; Putter, H. et al. (2013): Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer. In: *The British journal of surgery* 100 (2), S. 252–260. DOI: 10.1002/bjs.8980.

Santos, S. C. L.; Cavalli, I. J.; Ribeiro, E. M.; Urban, C. A.; Lima, R. S.; Bleggi-Torres, L. F. et al. (2008): Patterns of DNA copy number changes in sentinel lymph node breast cancer metastases. In: *Cytogenetic and genome research* 122 (1), S. 16–21. DOI: 10.1159/000151311.

Schlimok, G.; Funke, I.; Holzmann, B.; Göttlinger, G.; Schmidt, G.; Häuser, H. et al. (1987): Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (23), S. 8672–8676. DOI: 10.1073/pnas.84.23.8672.

Schmelzer, Eva; Zhang, Lili; Bruce, Andrew; Wauthier, Eliane; Ludlow, John; Yao, Hsin-lei et al. (2007): Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (8), S. 1973–1987. DOI: 10.1084/jem.20061603.

Schmidt-Kittler, Oleg; Ragg, Thomas; Daskalakis, Angela; Granzow, Martin; Ahr, Andre; Blankenstein, Thomas J. F. et al. (2003): From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13), S. 7737–7742. DOI: 10.1073/pnas.1331931100.

Schneck, Helen; Gierke, Berthold; Uppenkamp, Frauke; Behrens, Bianca; Niederacher, Dieter; Stoecklein, Nikolas H. et al. (2015): EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. In: *PloS one* 10 (12), e0144535. DOI: 10.1371/journal.pone.0144535.

Schnell, Ulrike; Cirulli, Vincenzo; Giepmans, Ben N. G. (2013): EpCAM: structure and function in health and disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1828 (8), S. 1989–2001. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.04.018.

Soh, Kah Teong; Tario, Joseph D.; Hahn, Theresa; Hillengass, Jens; McCarthy, Philip L.; Wallace, Paul K. (2021): CD319 (SLAMF7) an alternative marker for detecting plasma cells in the presence of daratumumab or elotuzumab. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 100 (4), S. 497–508. DOI: 10.1002/cyto.b.21961.

Sosa, María Soledad; Bragado, Paloma; Aguirre-Ghiso, Julio A. (2014): Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (9), S. 611–622. DOI: 10.1038/nrc3793.

Statistisches Bundesamt (Hg.) (2019): Zahl der Todesfälle im Jahr 2016 um 1,5 % gesunken. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle-2016.html>, zuletzt geprüft am 12.07.2019.

Statistisches Bundesamt (Hg.) (2022): Datenbank Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht (23211-0002). Online verfügbar unter <https://www-genesis.destatis.de/genesis//online?operation=table&code=23211-0002&bypass=true&levelindex=0&levelid=1641745543231#abreadcrumb>, zuletzt geprüft am 09.01.2022.

Štefková, Kateřina; Procházková, Jiřina; Pacherník, Jiří (2015): Alkaline Phosphatase in Stem Cells. In: *Stem Cells International* 2015. DOI: 10.1155/2015/628368.

Sturm, Gregor; Finotello, Francesca; Petitprez, Florent; Zhang, Jitao David; Baumbach, Jan; Fridman, Wolf H. et al. (2019): Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 35 (14), i436-i445. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz363.

Thiery, Jean Paul (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (6), S. 442–454. DOI: 10.1038/nrc822.

Tin Tin, Sandar; Reeves, Gillian K.; Key, Timothy J. (2021): Endogenous hormones and risk of invasive breast cancer in pre- and post-menopausal women: findings from the UK Biobank. In: *British Journal of Cancer* 125 (1), S. 126–134. DOI: 10.1038/s41416-021-01392-z.

Treize, Stephanie; Karnowski, Alexander; Fedele, Pasquale L.; Mithraprabhu, Sridurga; Liao, Yang; D'Costa, Kathy et al. (2018): Mining the Plasma Cell Transcriptome for Novel Cell Surface Proteins. In: *International journal of molecular sciences* 19 (8). DOI: 10.3390/ijms19082161.

Uhlen, Mathias; Karlsson, Max J.; Zhong, Wen; Tebani, Abdellah; Pou, Christian; Mikes, Jaromir et al. (2019): A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 366 (6472). DOI: 10.1126/science.aax9198.

Valastyan, Scott; Weinberg, Robert A. (2011): Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. In: *Cell* 147 (2), S. 275–292. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024.

van der Gun, Bernardina T. F.; Melchers, Lieuwe J.; Ruiters, Marcel H. J.; Leij, Lou F. M. H. de; McLaughlin, Pamela M. J.; Rots, Marianne G. (2010): EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. In: *Carcinogenesis* 31 (11), S. 1913–1921. DOI: 10.1093/carcin/bgq187.

van Montfrans, Joris M.; Hoepelman, Andy I. M.; Otto, Sigrid; van Gijn, Marielle; van de Corput, Lisette; Weger, Roel A. de et al. (2012): CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 129 (3), 787-793.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.11.013.

Veillette, André (2010): SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (3), a002469. DOI: 10.1101/cshperspect.a002469.

Waldmann, Annika; Hübner, Joachim; Katalinic, Alexander (2021): Trends Over Time in Breast-Cancer-Specific Mortality in Germany. In: *Deutsches Arzteblatt international* 118 (31-32), S. 538–539. DOI: 10.3238/arztebl.m2021.0182.

Wang, Gui-Ying; Li, Yong; Yu, Yue-Ming; Yu, Bin; Zhang, Zhen-Ya; Liu, Yu; Wang, Shi-Jie (2009): Detection of disseminated tumor cells in bone marrow of gastric cancer using magnetic activated cell sorting and fluorescent activated cell sorting. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 24 (2), S. 299–306. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05633.x.

Weiss, L. (1992): Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. In: *Clinical & experimental metastasis* 10 (3), S. 191–199. DOI: 10.1007/bf00132751.

Werner-Klein, Melanie; Grujovic, Ana; Irlbeck, Christoph; Obradović, Milan; Hoffmann, Martin; Koerkel-Qu, Huiqin et al. (2020): Interleukin-6 trans-signaling is a candidate mechanism to drive progression of human DCCs during clinical latency. In: *Nature communications* 11 (1), S. 4977. DOI: 10.1038/s41467-020-18701-4.

Woo, Jacky; Vierboom, Michel P. M.; Kwon, Hakju; Chao, Debra; Ye, Shiming; Li, Jianmin et al. (2013): PDL241, a novel humanized monoclonal antibody, reveals CD319 as a therapeutic target for rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 15 (6), R207. DOI: 10.1186/ar4400.

Yang, Yanping; McCloskey, Jaclyn E.; Yang, Huan; Puc, Janusz; Alcaina, Yago; Vedvyas, Yogindra et al. (2021): Bispecific CAR T Cells against EpCAM and Inducible ICAM-1 Overcome Antigen Heterogeneity and Generate Superior Antitumor Responses. In: *Cancer immunology research* 9 (10), S. 1158–1174. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0062.

Zhao, Xiaohui; Li, Junlai (2018): Research on the correlation between ultrasonographic features of breast cancer and expressions of ER, CD34 and p53. In: *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 23 (2), S. 372–377.

Zhu, Minghua; Janssen, Erin; Leung, Kin; Zhang, Weiguo (2002): Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (48), S. 46151–46158. DOI: 10.1074/jbc.M208946200.

8 Anhang

8.1 Klassifikation der Brustkrebserkrankung

Tabelle 8-1 TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms modifiziert aus Leitlinienprogramm Onkologie 2021.

T-Wert	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a–T4d beschrieben
N-Wert	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z. B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II
N1mi	Mikrometastase(n) (> 0,2 mm und/oder mehr als 200 Tumorzellen, aber nicht größer als 0,2 cm)
N2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
N3	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (Level III) mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten des Level I und II oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen des Level I und II oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
M-Wert	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 8-2 Stadieneinteilung nach UICC in Anlehnung an Brierley et al. 2017.

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1	N1mi	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Alle T	N3	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1

8.2 RNA-Sequenzierung

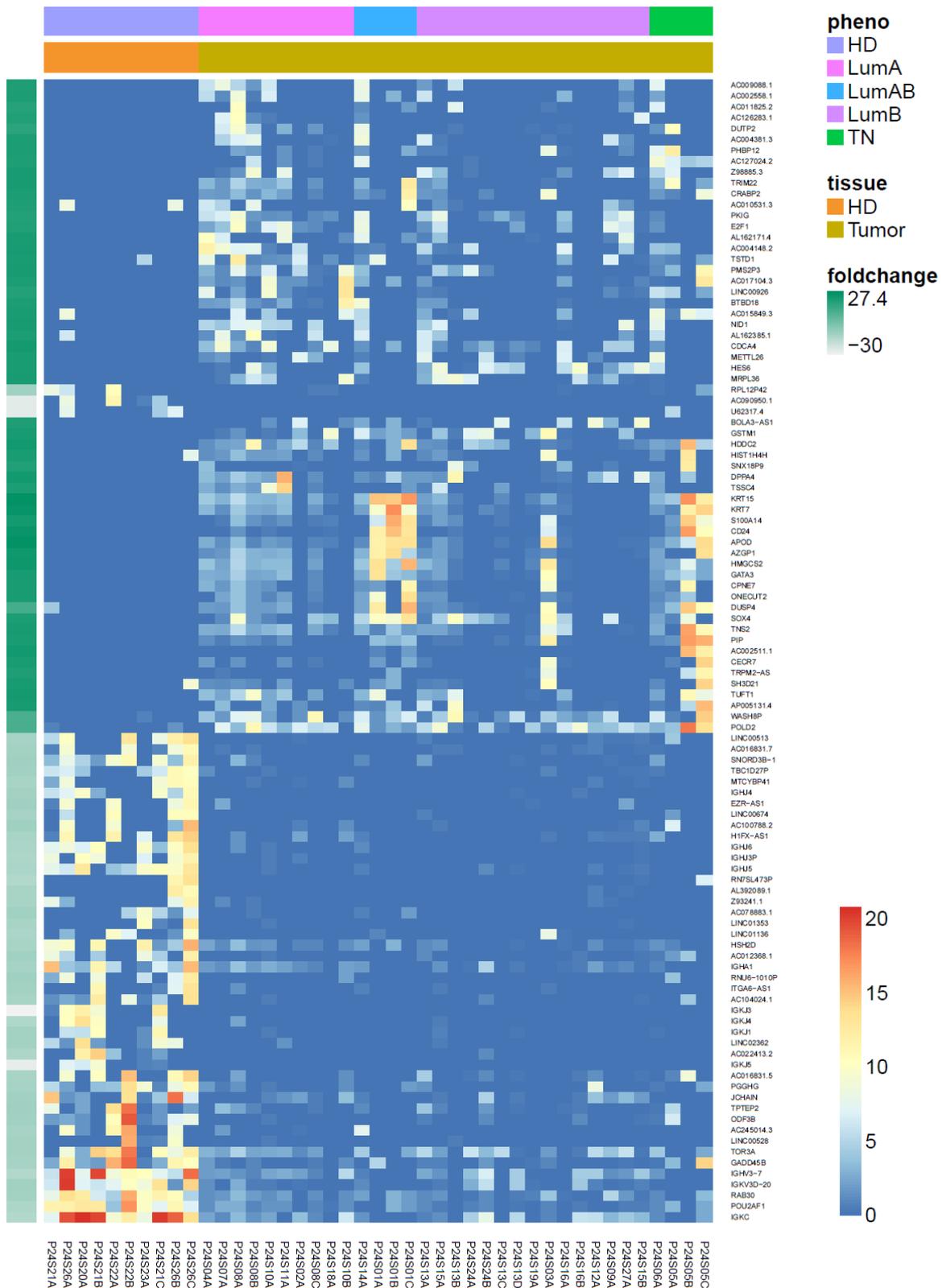


Abbildung 34 Differenziell exprimierte Gene zwischen NCCs und DCCs. In der Heatmap sind die normalisierten log counts der Expression der jeweiligen Gene zu sehen, wobei jede Reihe die Expression des jeweiligen Gens angibt. Den farbigen Balken oben ist die Herkunft der Zelle (Kontroll- oder KrebspatientIn mit Subtypen; HD = Healthy Donor, LumA/B = Luminal A/B, TN = Triple-negativ) zu entnehmen, die von je einer Spalte repräsentiert wird.

8.3 Zusammensetzung der EpCAM^{dim} Population

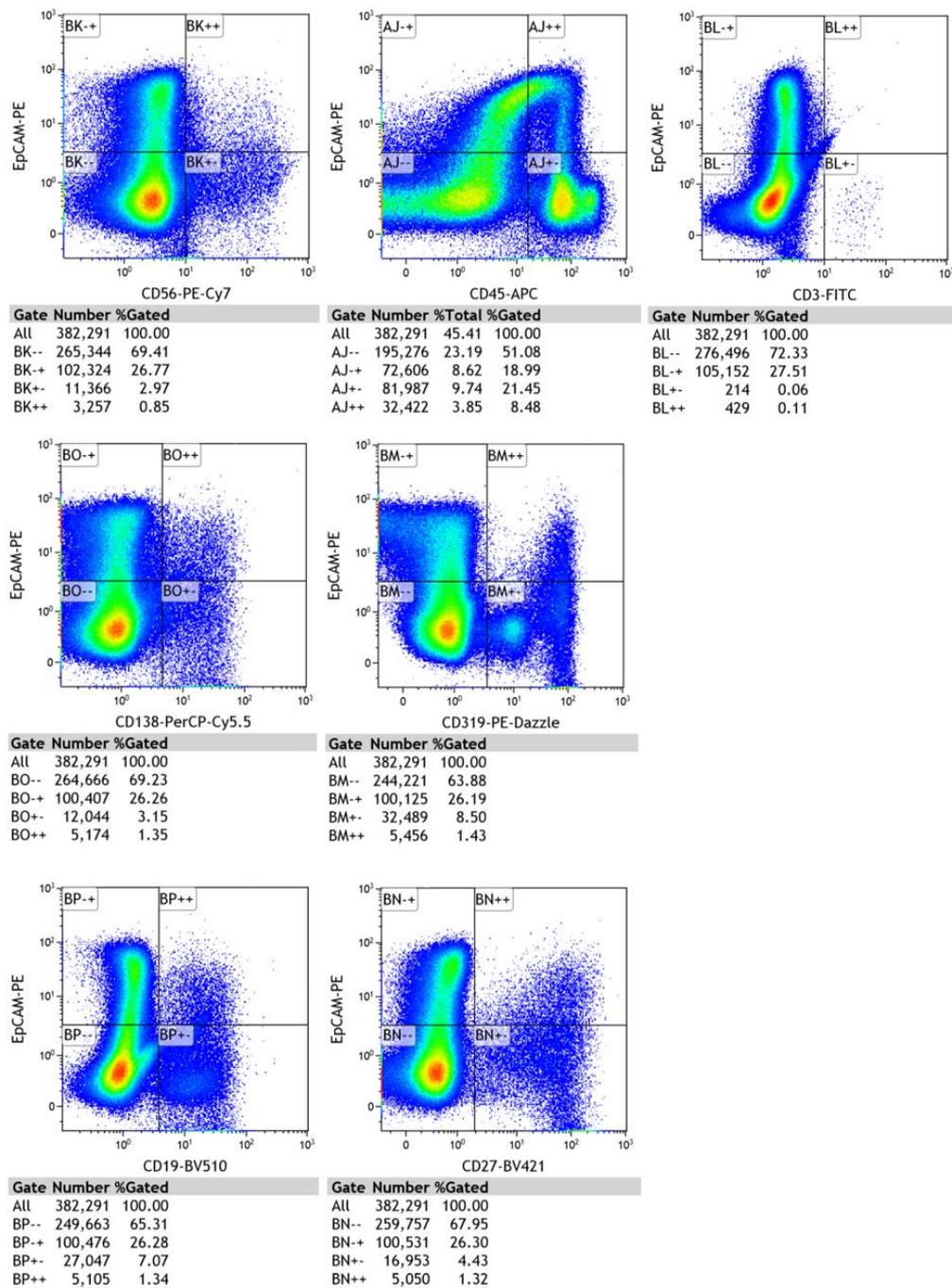


Abbildung 35 EpCAM^{dim} Population und Koexpression mit Immunmarkern. Dargestellt sind die Dotplots zur selben Probe eines Kontrollpatienten nach Depletion, in welchen jeweils EpCAM gegen CD45 oder einen Lymphozytenmarker aufgetragen ist. Die EpCAM^{dim} Population findet sich in den Gates -+ und ++, das Gate der doppelt positiven Zellen ist dabei in ++.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Menschen danken, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht und unterstützt haben.

Als Erstes ist mein Doktorvater Prof. Christoph Klein zu nennen, der mich stets gefördert und mir früh viel Verantwortung übertragen hat. Dadurch war es mir möglich, selbstständig wissenschaftlich arbeiten zu können.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Christoph Irlbeck, der mir über Jahre hinweg jede Frage beantwortet, mich hervorragend eingearbeitet und meine Arbeit sehr hilfreich Korrektur gelesen hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Eine große Unterstützung für mich war Dr. Melanie Werner-Klein, die ebenfalls viel Zeit und Mühe aufgebracht hat, um mich in die Geheimnisse der FACS-Analysen einzuweihen. Große Teile der Arbeit wären nicht möglich gewesen ohne die bioinformatischen Analysen von Dr. Huiqin Koerkele-Qu und ihren unermüdlichen Einsatz, mir diese zu erklären. Den wissenschaftlichen Austausch mit Dr. Miodrag Gužvić, Dr. Hedayatollah Hosseini und Catherine Botteron habe ich sehr geschätzt. Danken möchte ich auch Anthea Povall, Thomas Schamberger, Sandra Grunwald, Isabell Blochberger und Stefanie Pausch.

Auch meinen beiden Mentoren der Graduiertenschule, Prof. Braess und PD Seitz möchte ich danken. Letzterer war als klinischer Kooperationspartner essenziell für die Organisation der Proben der Spenderinnen. Dies stellte einen erheblichen Aufwand für die Abläufe in der Gynäkologie dar, was ich sehr zu schätzen weiß. Auch Prof. Dr. Weber war als Kooperationspartner für die KontrollpatientInnen immerzu engagiert und hilfsbereit.

Ein großer Dank geht auch an die SpenderInnen, die sich bereit erklärt haben, ihr Knochenmark für wissenschaftliche Zwecke zu spenden. Ohne ihnen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei der Deutschen Krebshilfe, die mich mit dem Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm großzügig gefördert hat, sowie der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die die Verlängerung meines Studiums um die Zeit ermöglicht hat, in welcher ich im Labor für diese Arbeit tätig war.

Ein großer Dank geht auch an meine Eltern Susanne und Hermann, die die Arbeit unzählige Male Korrektur gelesen haben, sowie meinen Freund Amoon, der mich immer unterstützt.