

Aus dem Lehrstuhl
Für experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. Christoph Klein
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Identifizierung und Charakterisierung von disseminierten Krebszellen
im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen
mittels EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Marie Köhler

Aus dem Lehrstuhl
Für experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. Christoph Klein
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Identifizierung und Charakterisierung von disseminierten Krebszellen
im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen
mittels EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Marie Köhler

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christoph Klein

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stephan Seitz

Tag der mündlichen Prüfung:

14.01.2025

Meinen Familien.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
1. Einleitung	14
1.1 Brustkrebs	14
1.1.1 Epidemiologie	14
1.1.2 Risikofaktoren	14
1.1.3 Einteilung und Klassifikation	15
1.1.4 Behandlungsansätze	17
1.2 Metastasierung	18
1.2.1 Prozess der Metastasierung	18
1.2.2 Minimale Resterkrankung und frühe Disseminierung	20
1.2.3 Detektion und klinische Relevanz disseminierter Krebszellen	21
1.3 Zielsetzung	23
2. Materialien	25
2.1 Knochenmarkproben	25
2.1.1 Kooperationspartner	25
2.1.2 Ethik	25
2.2 Reagenzien	26
2.2.1 Chemikalien	26
2.2.2 Selbstangesetzte Puffer und Lösungen	28
2.2.3 Enzyme	29
2.2.4 Antikörper und Beads	30
2.2.5 Primer	31
2.2.6 Kommerzielle Kits	34
2.2.7 Zelllinien und Zellkulturmedien	35
2.2.8 Verbrauchsmaterialien	35
2.2.9 Geräte	37
2.2.10 Software	38

3. Methoden	40
3.1 Aufarbeitung von Knochenmarkproben	40
3.2 Depletion	40
3.3 Immunzytochemie	41
3.3.1 EpCAM-Färbung	41
3.3.2 Färbung mit CD27 und CD319	42
3.3.3 Färbung mit DAPI	42
3.3.4 Färbung mit CD117	42
3.3.5 Quantifizierung mittels ImageJ	42
3.4 Isolierung von positiven Einzelzellen	43
3.5 Amplifikation von Transkriptom und Genom der gleichen Zelle	44
3.5.1 Isolierung und Amplifikation des Transkripts	44
3.5.2 Aufarbeitung der genomischen DNA	46
3.6 Amplifikation des Genoms	47
3.7 Qualitätskontrolle der Amplifikation von Transkriptom und Genom	49
3.8 Reamplifizierung und Qualitätskontrolle des Transkripts	50
3.9 Aufreinigung und Konzentrationsmessung der WTA-Proben	51
3.10 Reamplifizierung und Qualitätskontrolle des Genoms	52
3.11 qPCR und Primeretablierung	53
3.11.1 Primeretablierung	53
3.11.2 qPCR	58
3.12 Agarose Gelelektrophorese	59
3.13 LowPass-Sequenzierung der genomischen DNA	60
3.14 CNA-Profiling der genomischen DNA	62
3.15 Qualitätskontrolle und Konzentrationsmessung der Proben	63
3.15.1 Messung mit Qubit	63
3.15.2 Messung am Bioanalyzer	63
3.16 Verwendete Standardprotokolle	64
3.16.1 Zellkultur	64
3.17 Statistische Tests und Bioinformatik	64
3.17.1 Statistische Test	64
3.17.2 Bioinformatik	65

4.	Ergebnisse	66
4.1	Identifizierung von echten disseminierten Krebszellen mittels EpCAM, CD27/319 Immunfluoreszenzfärbung	68
4.1.1	Anwendung der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung auf Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollpatienten	68
4.1.2	Durchführung der quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion zur Analyse des Einzelzell- Transkriptoms	74
4.1.3	LowPass-Sequenzierung zur Detektion genomischer Aberrationen	87
4.2	Etablierung und Anwendung der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung auf Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen	92
4.2.1	Auswahl eines geeigneten Fluorochroms	92
4.2.2	EpCAM-PE/CD117-AF488-Doppelfärbung auf Knochenmarkproben von Mammakarzinom-Patientinnen	97
5.	Diskussion	99
5.1	Charakterisierung von DCCs und NCCs mittels Immunfluoreszenzfärbung	100
5.1.1	Verwendung von CD27 und CD319 zur Charakterisierung von NCCs	100
5.1.2	Verwendung von cKIT/CD117 zur Charakterisierung von DCCs	101
5.2	Charakterisierung von DCCs und NCCs mittels qPCR	102
5.2.1	Nachweis des EpCAM-Transkriptes in DCCs und NCCs in der qPCR	102
5.2.2	Nachweis des CD45-Transkriptes in DCCs und NCCs in der qPCR	103
5.2.3	Nachweis der DCC- und NCC-Signaturgene in DCCs und NCCs in der qPCR	104
5.3	Charakterisierung von DCCs und NCCs mittels LowPass Genomsequenzierung	105
5.4	Limitationen der Arbeit	108
6.	Zusammenfassung	109
7.	Literaturverzeichnis	111
8.	Anhang	123
8.1	Klassifikation der Brustkrebserkrankung	123
8.2	Überblick über das Studienkollektiv	124
8.3	RNA-Sequenzierung	126
8.4	Workflow der verwendeten Zellen	129
8.5	Ergebnisse der verwendeten Zellen	130
8.6	LowPass-Profil	131

8.6.1 Profile von Überstandszellen	131
8.6.2 Profile von frisch isolierten Zellen	135
8.6.3 Profile der Zellen, welche aus der Studie ausgeschlossen wurden	140
9. Danksagung	144

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
-	negativ
+	positiv
A	Adenin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BET	Brusterhaltene Therapie
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CK	Cytokeratin
CTC	zirkulierende Krebszelle
DCC	Disseminierte Krebszelle
DCIS	Duktales Karzinom In Situ
dd	didesoxy
DEPC	Diethyl pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
eDCC	frühe disseminierte Krebszelle
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Östrogen Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreyccin-isothiocyanat
G	Guanin
g	Beschleunigung
GlyA	Glycophorin A
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HR	Hormonrezeptor
IF	Immunfluoreszenz
KM	Knochenmark
KP	Kontrollpatient

M0	ohne klinisch manifeste Metastasen
M1	mit klinisch manifesten Metastasen
MACS	immunomagnetische Zellseparation
MCF7	menschliche Brustkrebszelllinie, Michigan-Cancer-Foundation 7
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
min	Minute
MNZ	Mononukleare Zelle
MRD	Minimale Resterkrankung
NCC	Nicht-Krebszelle
NGS	Next Generation Sequencing
OPA	One-Phor-All Puffer
PAA	Polyacrylamid
PAP	Poly(A)Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PNA	Poly-T-Peptid-Nukleinsäure
PR	Progesteronrezeptor
PT	Primärtumor
QC	Qualitätskontrolle
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
Reamp	Reamplifikation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
SC	Einzelzelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOP	Standardanleitung
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TdT	Terminal-Desyoxynukleotidyl-Transferase
TNBC	dreifach-negativer Brustkrebs
tRNA	Transfer RNA
U	Uracil
U	Unit
WGA	Amplifikation des Genoms
WTA	Amplifikation des Transkriptoms

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Studienablaufs.	24
Abbildung 2 Isolierung von markerpositiven Einzelzellen mittels Mikromanipulator.	44
Abbildung 3 Änderung der Anzahl von mononukleären Zellen und Erythrozyten bei Krebs- und Kontrollpatienten durch die Depletion.	69
Abbildung 4 Beispielbilder der EpCAM, CD27/319 Immunfluoreszenzfärbung einer M0-Knochenmarkprobe.	71
Abbildung 5 Darstellung der IF-Färbungsintensitäten der der EpCAM, CD27/319 gefärbten Zellen aus M0-Knochenmarkproben.	72
Abbildung 6 Darstellung des Anteils von Patientenproben mit und ohne EpCAM ⁺ , CD27/319 ⁻ Zelle.	73
Abbildung 7 Darstellung des Anteils CD27- und CD319- positiver Zellen in Krebs- und Kontrollproben.	73
Abbildung 8 Anzahl der EpCAM ⁺ Zellen im Knochenmark der Krebspatientinnen in der Immunfluoreszenzmikroskopie.	74
Abbildung 9 Ergebnisse der WTA-QC der Zellen unterschiedlichen Phänotypes aus M0-Knochenmarkproben.	76
Abbildung 10 Darstellung der DAPI-IF-Färbungsergebnisse in M0-Knochenmarkproben.	76
Abbildung 11 Darstellung der qPCR-Ergebnisse zum Vorkommen des CD45-Transkripts.	77
Abbildung 12 Darstellung der Ergebnisse der Gradienten-PCR der final verwendeten Primer für a) CD27 und b) CD319.	79
Abbildung 13 Gelbilder des Restriktionsverdaus der final verwendeten Primer für a) CD319 und b) CD27.	79
Abbildung 14 Schmelzkurven der final verwendeten Primerpaare für a) CD27 und b) CD319.	80
Abbildung 15 Standardkurven der final verwendeten Primerpaare für a) CD27 und b) CD319.	80
Abbildung 16 Darstellung der qPCR-Ergebnisse zum Vorkommen des CD27-Transkripts.	81
Abbildung 17 Darstellung der qPCR-Ergebnisse zum Vorkommen des CD319-Transkripts.	81
Abbildung 18 Genexpression von EpCAM, CD27 und CD319 unterteilt nach Zelltypen.	83
Abbildung 19 Darstellung der Klassifizierung von Zellen anhand der DCC- oder NCC-Signatur (Irlbeck, C., 2019).	84
Abbildung 20 Einteilung der Zellen anhand DCC- und NCC- Signaturgene unterteilt nach ihren Phänotypen.	85
Abbildung 21 Darstellung der Expression ausgewählter Gene aller Zellen.	86
Abbildung 22 Beispielhafte Darstellung von CNV-Profilen mit guter und schlechter Qualität.	88

Abbildung 23 Darstellung der Anteile von Zellen mit balanciertem und aberrantem Genom hinsichtlich ihres Zellphänotypes.	89
Abbildung 24 Darstellung der Anzahl der Profile von M0-Zellen mit guter und schlechter Qualität.	90
Abbildung 25 Darstellung der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung einer undepletierten M0-Knochenmarkprobe.	93
Abbildung 26 Ergebnisse der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung einer M0-Knochenmarkprobe.	94
Abbildung 27 Kontrolle der Überlappung der Immunfluoreszenzkanäle Cy3 und FITC.	95
Abbildung 28 Auswertung der IF-Autofluoreszenz der MCF7-Zellen.	95
Abbildung 29 Kontrolle der Überlappung der Immunfluoreszenzkanäle FITC, Cy3 und APC.	96
Abbildung 30 Kontrolle der Überlappung der Immunfluoreszenzkanäle APC und FITC.	96
Abbildung 31 Auswertung der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung von undepletierten und depletierten M0-Knochenmarkproben hinsichtlich der Intensität der Antikörper- und Isotypfärbungen.	98
Abbildung 32 Differenziell exprimierte Gene zwischen NCCs und DCCs.	127
Abbildung 33 Darstellung der Expression von EpCAM und KIT.	128
Abbildung 34 Darstellung des Workflows aller bearbeiteten Zellen.	129
Abbildung 35 Überblick über alle verwendeten und bearbeiteten Zellen mit zugehörigen Ergebnissen.	130
Abbildung 36 Überblick über alle CNV-Profile von Zellen, welche aus dem WTA-Überstand isoliert wurden.	134
Abbildung 37 Überblick über alle CNV-Profile frisch isolierter Zellen.	139
Abbildung 38 Überblick über alle CNV-Profile von Zellen, welche aus der Studie ausgeschlossen wurden.	143

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2 1 Darstellung von Instituten und verantwortlichen Ärzten zur Probenzustellung.	25
Tabelle 2 2 Verwendete Chemikalien.	26
Tabelle 2 3 Selbstangesetzte Puffer und Lösungen	28
Tabelle 2 4 Verwendete Enzyme.	29
Tabelle 2 5 Verwendete Antikörper und Beads.	30
Tabelle 2 6 Verwendete Primer.	31
Tabelle 2 7 Verwendete Kits.	34
Tabelle 2 8 Verwendete Zelllinien.	35
Tabelle 2 9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.	35
Tabelle 2 10 Verwendete Geräte.	37
Tabelle 2 11 Verwendete Software.	38
Tabelle 3 1 Verwendete Antikörper bei Färbung von Knochenmarkproben.	43
Tabelle 3 2 Zusammensetzung der Master-Mixe für die WTA.	45
Tabelle 3 3 PCR-Programm zur cDNA-Amplifikation.	46
Tabelle 3 4 Zusammensetzung des Master-Mix für den Proteinkinase K-Verdau.	48
Tabelle 3 5 PCR-Programm zum Proteinkinase K-Verdau.	48
Tabelle 3 6 Zusammensetzung des Master-Mix zum MSEI-Verdau.	48
Tabelle 3 7 PCR-Programm zum MSEI-Verdau.	48
Tabelle 3 8 Zusammensetzung der Master-Mixe zum Preannealing und zur Ligation.	48
Tabelle 3 9 PCR-Programme zum Preannealing und zur Ligation.	49
Tabelle 3 10 Zusammensetzung des Master-Mix zur gDNA-Amplifikation.	49
Tabelle 3 11 PCR-Programm zur gDNA-Amplifikation.	49
Tabelle 3 12 Zusammensetzung des Master-Mix zur WTA-QC.	50
Tabelle 3 13 Zusammensetzung des Master-Mix zur WGA-QC.	50
Tabelle 3 14 PCR-Programm zur WTA-QC und WGA-QC.	50
Tabelle 3 15 Zusammensetzung des Master-Mix zur Reamplifikation des Transkriptoms.	51
Tabelle 3 16 PCR-Programm zur Reamplifikation des Transkriptoms.	51
Tabelle 3 17 Zusammensetzung des Master-Mix zur Reamplifikation des Genoms.	52
Tabelle 3 18 PCR-Programm zur Reamplifikation des Genoms.	53
Tabelle 3 19 Ergebnisse der Standardkurven-PCR zur Etablierung der Primer für CD27 und CD319.	55
Tabelle 3 20 Verwendete Primerpaare mit zugehörigen Sequenzen sowie verwendeten Restriktionsenzymen und Reaktionsbedingungen.	56
Tabelle 3 21 Final verwendete Primerpaare mit zugehörigen Cp-Werten und Annealingtemperaturen.	56

Tabelle 3 22 Zusammensetzung des Master-Mix zur Gradienten-PCR.	56
Tabelle 3 23 PCR-Programm zur Gradienten-PCR.	57
Tabelle 3 24 Zusammensetzung des Master-Mix zur Standardkurven-PCR.	57
Tabelle 3 25 Übersicht der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve.	57
Tabelle 3 26 Zusammensetzung der Master-Mixe zum Restriktionsverdau.	57
Tabelle 3 27 PCR-Programm zum Restriktionsverdau.	58
Tabelle 3 28 Zusammensetzung des Master-Mix zur qPCR.	59
Tabelle 3 29 qPCR-Programm im Light Cycler und zur Erstellung der Standardkurve.	59
Tabelle 3 30 Zusammensetzung des Master-Mix zur First Extension.	61
Tabelle 3 31 PCR-Programm zur First Extension und zur Second Extension.	61
Tabelle 3 32 Zusammensetzung des Master-Mix zur Second Extension.	61
Tabelle 3 33 Zusammensetzung des Master-Mix zur Library Amplifikation.	62
Tabelle 3 34 PCR-Programm zur Library Amplifikation.	62
Tabelle 3 35 Überblick über das in der Studie eingeschlossene Kollektiv mit den zugehörigen klinischen Daten.	67
Tabelle 3 36 Gütekriterien der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung im Vergleich mit der qPCR-Klassifizierung.	87
Tabelle 3 37 Darstellung der Gütekriterien der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der LowPass-Ergebnisse.	91
Tabelle 8 1 TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	123
Tabelle 8 2 Darstellung der Mammakarzinom-Patientinnen mit zugehörigen klinischen Daten.	124
Tabelle 8 3 Darstellung der qPCR-Ergebnisse der M0-Knochenmarkzellen mit zugehörigen klinischen Daten.	125

In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Dieses bezieht sich, sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt, auf die weibliche und die männliche Person.

1. Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2018 wurden 2,1 Millionen Brustkrebsfälle weltweit neudiagnostiziert. Damit ist Brustkrebs mit 24,2 % weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Frauen und mit 15 % die häufigste krebsbedingte Todesursache (Bray et al., 2018). Aber auch in Deutschland kam es mit 72.000 Neuerkrankungen 2018 zu einer Zahl, welche sich seit 1980 (circa 35.000) mehr als verdoppelt hat und sich auf diesem Niveau stabilisiert (GCO, 2019; Bertz et al., 2010). Ein deutlicher Anstieg in den Inzidenzraten (standardisierte Inzidenz, 2009: 350) ist in den Jahren zwischen 2005 und 2009 in der Altersgruppe der 50- bis 69-Jährigen zu beobachten. Dies ist auf die Einführung des Screeningprogramms, welches sich an die entsprechenden Patientinnen richtet und (benigne) Tumorstadien in einem frühen Stadium detektieren soll, zurückzuführen. Diese Programme tragen langfristig dazu bei, dass in dieser Altersgruppe 25 % weniger Frauen an fortgeschrittenen Tumoren erkranken (RKI, 2016). Insgesamt erleben die erwähnten Inzidenzraten seit 2009 wieder einen Rückgang und lagen 2016 nur noch leicht über dem Ausgangsniveau (standardisierte Inzidenz, 2016: 260).

Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt 63 Jahre, 40 % der Frauen erhalten vor ihrem 60. Lebensjahr die Diagnose (RKI, 2016; Bertz et al., 2010). Aber nicht nur Frauen, sondern auch Männer kann diese Erkrankung betreffen. Etwa 1 % aller Neuerkrankungen entfallen auf Männer. Im Jahr 2016 verstarben in Deutschland neben 18.570 Frauen auch 166 männliche Patienten an Brustkrebs (RKI, 2016).

Zusammengenommen für beide Geschlechter rangiert Brustkrebs mit 11,7 % aller Krebsneuerkrankungen auf dem ersten Platz hinsichtlich der Inzidenz, bei den häufigsten krebsbedingten Todesursachen unter den ersten fünf (Global cancer observatory, 2020).

1.1.2 Risikofaktoren

Die Entstehung von Brustkrebs ist mit verschiedenen Risikofaktoren assoziiert. Bei bis zu 10 % der Erkrankungsfälle sind nachgewiesene genetische Faktoren ursächlich für die Krebsentwicklung. Träger dieser genetischen Faktoren weisen ein 50- bis 80- prozentiges Lebenszeitrisiko auf, an Brustkrebs zu erkranken (Rojas und Stuckey, 2016), wobei es sich dabei am häufigsten um eine Mutation in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* handelt (Zhang et al., 2011). Träger dieser autosomal-dominant vererbten Keimbahnmutation

erkranken rund 20 Jahre früher als Patienten ohne familiäres Risiko (Leitlinienprogramm Onko, 2018; Mavaddat et al., 2010).

Einen weiteren Risikofaktor stellt die Belastung durch Östrogene dar. Ein früher Beginn der Menarche und eine späte Menopause sind damit assoziiert. In der Postmenopause zählen vor allem Hormonersatztherapien und Adipositas zu den brustkrebsbegünstigenden Faktoren (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2019; Reeves et al., 2007). Da Fettzellen das Enzym Aromatase exprimieren und somit Östrogen produzieren können, stehen beide Risikofaktoren wiederum mit erhöhten Hormonspiegeln in Verbindung.

Prämenopausal korrelieren ausbleibende Schwangerschaften und Stillzeiten mit der Entstehung eines Mammakarzinoms. Während in der Schwangerschaft und in den ersten fünf Jahren danach das Brustkrebs-Risiko aufgrund hoher Hormondynamik anzusteigen scheint, wurde in verschiedenen Studien jedoch herausgefunden, dass Schwangerschaften das prä- sowie postmenopausale Krebsrisiko senken können (Chavel-Chapelon und Gerber, 2002). Ob es dabei einen Zusammenhang zwischen Brustkrebs-Risiko und dem Alter der ersten Schwangerschaft gibt, bleibt weiterhin zu klären. Orale Kontrazeption in der Prämenopause scheint das Krebsrisiko nur gering oder gar nicht zu erhöhen (Rojas und Stuckey, 2016).

Zu den weiteren Risikofaktoren zählen höheres Alter, hohe Brustdichte, Nikotin- und Alkoholkonsum (Rojas und Stuckey, 2016).

Risikoläsionen, die Vorstufen zu invasiven Karzinomen darstellen können, werden in 1.1.3 näher beschrieben.

1.1.3 Einteilung und Klassifikation

Zur Einteilung von Brustkrebs existieren verschiedene Definitionen.

Die Grundlage für die Einteilung in unterschiedliche Krankheitsstadien bildet das TNM-System (Staging), welches vom American Joint Committee of Cancer (AJCC) und der Union for International Cancer Control (UICC) erarbeitet wurde. Mittels Stanz- oder Vakuumbiopsien oder mit Hilfe von Operationspräparaten erfolgt eine histologische Klassifikation (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018) und eine Einteilung des Erkrankungsstadiums in 0-4 (Tabelle 8 1). Dabei wird durch Größe und Wachstumsverhalten (Basalmembran überschreitend oder nicht) der T-Status des Primärtumors bestimmt. T0 steht dabei für das Nicht-Vorhandensein eines Primärtumors (PT), aufsteigende Zahlen T1-T4 für zunehmende Größe und invasiveres Wachstum. Mittels N-Status wird die regionäre Lymphknoteninvasion beurteilt. Dabei werden ipsilaterale axilläre, infraklavikuläre, supraklavikuläre Lymphknoten

(LK) an der A. mammaria interna als regionale LK klassifiziert, die Invasion anderer LK wird als Fernmetastasierung gewertet und im M-Status festgehalten. N0 bedeutet wiederum, dass kein LK-Befall vorliegt. N1-N3 klassifizieren vermehrten LK-Befall. Der M-Status M0 beschreibt das Fehlen von Fernmetastasen und M1 das Vorliegen von Fernmetastasen.

An Stanz- oder Vakuumpräparaten erfolgt ebenfalls das Grading nach Elston und Ellis. Die Beurteilung von Tubulusausbildung, Kernpolymorphie sowie Mitoserate ergibt einen Summenscore, welcher Rückschlüsse auf Differenzierungs- und Malignitätsgrad, beschrieben als G1-3 (Tabelle 8 1), zulässt (Elston und Ellis, 1991). Die histopathologische Einteilung differenziert das Mammakarzinom aufgrund des Feingewebes in nichtinvasive Karzinome und invasive Karzinome.

Bei den nichtinvasiven Karzinomen sind die Krebszellen auf ihren Ursprungsort begrenzt und zeigen (noch) kein invasives Verhalten und Metastasenbildung. Oft handelt es sich hierbei um Vorstufen von invasiven Erkrankungen. Abhängig von ihrem Ursprungsort unterscheidet man dabei zum einen das duktuale Carcinoma In Situ (DCIS), welches eine neoplastische intraduktale Proliferation darstellt, die durch eine intakte Basalmembran und Myoepithelzellen vom Bruststroma getrennt ist. Bis zu 40 % dieser Läsionen entwickeln sich unbehandelt zu invasiven Erkrankungen (Cowell et al., 2013), 2-6 % der Patienten mit dem non-invasiven DCIS entwickeln trotz Behandlung Metastasen (Klein et al., 2003).

Zum anderen existieren die lobulären Neoplasien, welche von Brustdrüsenläppchen ausgehen und Präkanzerosen sowohl für die befallene Brust als auch für die Gegenseite darstellen (Jorns et al., 2013; Chuba et al., 2005).

Invasive Karzinome, bei welchen die Krebszellen schon in benachbartes Gewebe eingedrungen sind, kann man als systemische Erkrankung bezeichnen.

Auf das invasive duktuale Karzinom of no special type (NST) entfallen dabei 50-80 %. Die Charakteristika dieser Gruppe reichen nicht aus, um es einem speziellen histopathologischen Tumor zuzuordnen. Die Prognose dieses Karzinoms ist etwas schlechter im Vergleich zur Gesamtgruppe aller Mammakarzinome.

Mit 5-15 % ist das invasive lobuläre Karzinom das zweithäufigste invasive Mammakarzinom. Es ist durch seine Kleinzelligkeit und diffus infiltrierendes Wachstum gekennzeichnet und ist häufig mit lobulären Neoplasien oder DCIS assoziiert. Weitere seltenere invasive Karzinome stellen u.a. tubuläre und muzinöse Formen dar (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Eine weitere mögliche Einteilung besteht in den molekularen Subtypen. In Korrelation mit bestehenden Prognosefaktoren Grading, ER-/PR-Status, HER2-Status, Lymphknotenstatus

sehen Experten der St. Gallen Konferenz mit dieser Klassifikation eine Chance zur besseren Risiko- und Therapiesteuerung (Absatz 1.1.4).

1.1.4 Behandlungsansätze

Grundsätzlich kann man auch beim Mammakarzinom die Behandlungsansätze in kurativ und palliativ unterscheiden. Während bei einem UICC-Stadium bis einschließlich drei der kurative Ansatz gewählt wird, wird ab Stadium vier der palliative Ansatz verfolgt, bei welchem die Prävention und die Linderung des Leidens des Patienten im Vordergrund steht (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Das Leitlinienprogramm Onkologie aus dem Jahr 2021 enthält weiterhin folgende Empfehlungen: Die Basistherapie für alle nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome stellt die R0-Resektion dar, bei welcher die tumorfreie Randresektion einen großen prognostischen Effekt auf die Lokalrezidivrate aufweist. Für die Durchführung der Operation kommen zwei Möglichkeiten in Betracht. Zum einen die Brusterhaltende Therapie (BET), welche, mit nachfolgender Radiotherapie der gesamten Brust, für das DCIS und für invasive Karzinome mit günstiger Tumorgroße-Brustvolumen-Ratio und Resektionsrändern im Gesunden in Betracht kommt. Bei inkompletter Entfernung des Tumors, inflammatorischen Mammakarzinomen oder Kontraindikationen zur Nachbestrahlung bei BET wird eine Mastektomie angestrebt. Dabei wird eine kontralaterale Mastektomie nur bei einer familiären Hochrisikosituation empfohlen. Bei Befall von axillären Lymphknoten, werden diese operativ ausgeräumt. Bei einem klinisch negativen Lymphknotenbefund wird eine Sentinel-Lymphonodektomie durchgeführt, bei welcher Wächterlymphknoten entfernt werden, um eine axilläre Staging anzuschließen. (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021; Prometheus, Schünke et al, 2005).

Ebenfalls wichtig ist die Kombination der Operation mit neoadjuvanten oder adjuvanten Systemtherapien, bei welchen es sich vor allem um endokrine, Chemo- und Antikörpertherapien handelt. Bei der Entscheidung für eine Therapieoption werden Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Her2-Status (St. Gallen Konferenz, 2011), aber auch Menopausenstatus und Alter mitberücksichtigt (Tabelle 8 1).

1.2 Metastasierung

1.2.1 Prozess der Metastasierung

Metastasen sind der Endpunkt eines komplexen Prozesses und stellen mit über 90 % die häufigste krebsbedingte Todesursache dar (Valastyan und Weinberg, 2011). Insbesondere beim Mammakarzinom kommt es erst Jahre oder Jahrzehnte nach Resektion des Primärtumors zur Metastasenbildung (Aguirre-Ghiso et al., 2007). Wie verläuft also der Prozess der Metastasierung? Von Valastyan und Weinberg wurden sieben Schritte identifiziert, die in der Bildung einer Makrometastase enden. Zuerst steht dabei die lokale Invasion (1), bei welcher Krebszellen des Primärtumors in das umliegende Gewebe, die extrazelluläre Matrix und Stromazellschichten eindringen und die Basalmembran durchbrechen. Es folgt die Intravasation (2), wobei Krebszellen in naheliegende Blut- und Lymphgefäße eindringen. Dabei wurde nachgewiesen, dass stimulierende Faktoren, wie TGF- β , EGF und CSF-1 bei Zellen des Mammakarzinoms eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion an Gefäßwänden und Erhöhung der Invasivität spielen (Giampieri et al., 2009; Wyckoff et al., 2007). Einmal im Blutkreislauf angekommen, erfahren die nun sogenannten zirkulierenden Tumorzellen (Circulating Tumor cell, CTC) beim Passieren der Gefäße einen hohen Stress, ausgelöst durch Scherkräfte und Abwehrsysteme (3). Tumorzellen, welche mit Blutplättchen Embolien formen, scheinen sich dabei diesen Störgrößen entziehen zu können (Joyce und Pollard, 2009). Weiterhin kann es durch Größenunterschiede von Zelle und Blutgefäß bei der ersten Durchquerung eines Stromgebietes zu einer Elimination dieser kommen. Tumorzellen halten sich möglicherweise nur eine geringe Zeit in der Strombahn auf, bevor sie erkannt werden. Zellen, welche die Zirkulation überstehen und sich in tumorfernen Geweben ansammeln können, könnten somit durch ihren kurzen Aufenthalt in Lymph- oder Blutgefäßen von körpereigenen Abwehrsystemen übersehen werden.

Bei der folgenden Anheftung der CTCs an entfernten Organstandorten (4) ist weiterhin unklar, ob dafür ein passiver Selektionsvorgang durch Kapillargrößen an Organen verantwortlich ist oder ein aktiver Vorgang stattfindet, den man als „Homing“ bezeichnet. Dabei kommt es zu Ligand-Rezeptor-Interaktionen zwischen CTC und Gefäßwänden an bestimmten Organen, wodurch die Tumorzellen an bevorzugten Orten verbleiben. Beim Mammakarzinom handelt es sich dabei um Knochen, Lunge und Leber. Dabei wird u.a. vermutet, dass das Oberflächenprotein Metadherin für die bevorzugte Metastasierung des Mammakarzinoms in die Lunge verantwortlich ist (Brown und Ruoslahti, 2004).

Am Zielorgan kommt es dann zur sogenannten Extravasation (5), bei welcher CTCs die Gefäßendothelschichten durchdringen und sich im Gewebeparenchym ansiedeln. Während der Zirkulation der Tumorzellen in Blut- oder Lymphgefäßen definiert man diese als zirkulierende Tumorzellen (CTCs, circulating tumor cells). Mit Erreichen des Zielorgans, bezeichnet man sie nun als disseminierte Tumorzellen (DCCs, disseminated cancer cells).

Dort kommt es zu der Formation einer Mikrometastase (6). Aber wie ist es möglich, dass Zellen aus Primärtumoren in einer entfernten Umgebung metastasieren können? Zum einen wurde nachgewiesen, dass die DCCs, wie in 1.2.2 beschrieben, in einem undifferenzierten Zustand den PT verlassen und somit das Potenzial haben sich anzupassen. Zum anderen wird davon gesprochen, dass es zur Ausbildung einer prämetastatischen Nische kommt. Unter anderem vom PT ausgesendete Wachstumssignale, führen zur Bildung einer speziellen Mikroumgebung, welche es Tumorzellen ermöglicht, sich anzusiedeln und von einer Mikro- zur Makrometastase zu wachsen (Psaila und Lyden, 2009). Chambers et al. konnten 2002 zeigen, dass zu dieser organspezifischen Metastasierung sowohl zirkulatorisch-mechanische Gegebenheiten als auch Anpassungen der Mikroumgebung beitragen.

Den Endpunkt des Metastasierungsprozesses stellt somit die Bildung einer Makrometastase dar (7). Ein Zustand, der meistens erst über Jahre erreicht wird und oft erst lange nach PT-Resektion detektierbar ist. DCCs scheinen, in ihrer prämetastatischen Nische angekommen, in einen Ruhezustand (Dormancy) zu verfallen und so über Jahre im Körper unentdeckt zu verbleiben. Dabei wurde nachgewiesen, dass die DCCs ihr Proliferationspotenzial keinesfalls verlieren, sondern die Ruhezeit zur Differenzierung nutzen, um dann nach Reaktivierung eine klinisch detektierbare Metastase zu bilden (Chambers et al., 2002).

Yadav et al. beschreiben dabei 2018 verschiedene Erklärungsansätze der Dormancy-Strategie. Zum einen ist es natürlich möglich, dass DCCs direkt Metastasen bilden. Zum anderen beschreiben die Autoren die Ruhezeit der Einzelzelle, bei der die Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus arretieren und im Gegensatz dazu die Tumormassen-Dormancy, bei welcher von einer Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose ausgegangen wird, sodass es nicht zu einem Wachstum des Tumors kommt. Dies modifiziert die Schritte nach Valastyan und Weinberg insofern, dass Tumorzellen vor der Intravasation eine Epithelial-Mesenchymale Transition (Thiery et al., 2009) durchlaufen und somit mesenchymale Stammzell-Eigenschaften erwerben und am Zielorgan in den Zustand der Dormancy verfallen. Yadav et al. rechnen dem Schritt der Mesenchymal-Epithelialen Transition die Fähigkeit der Reaktivierung zu, sodass es dann zum Wachstum und zur Bildung einer Makrometastase kommt.

Beim Durchlaufen dieser Schritte ist weiterhin festzustellen, dass es sich bei der Metastasierung um einen höchst ineffizienten Prozess handelt. Es wurde beobachtet, dass über 80 % der CTCs bis zur Extravasation überleben, jedoch weniger als 3 % tatsächlich Mikrometastasen bilden (Luzzi et al., 1998). Chambers et al. konnten dazu experimentell herausfinden, dass nur 0,02 % von injizierten Tumorzellen dann noch zu Makrometastasen werden. Wo genau in diesem Prozess ist diese Ineffizienz also begründet?

Eine mögliche Erklärung dafür könnte das beschriebene Phänomen der Dormancy sein. Die hohe Spezifität bei der Bildung der notwendigen prä-metastatischen Nische könnte erklären, warum die Bildung einer Makrometastase, in Relation zur Masse an ausgesendeten Tumorzellen, so selten vorkommt, da das Zusammentreffen einer Vielzahl von Faktoren genau im richtigen Verhältnis sehr unwahrscheinlich ist.

Klar wird dabei, dass die Metastasierung ein hoch selektiver Prozess ist, welcher von Eigenschaften des Zielorgans sowie denen des Originalgewebes der disseminierten Tumorzellen abhängt (Fidler et al., 2003).

1.2.2 Minimale Resterkrankung und frühe Disseminierung

Die minimale Resterkrankung beschreibt einen Zustand, bei dem zirkulierende und/ oder disseminierte Krebszellen (CTC/DCC) in Lymphknoten oder Knochenmark von Patientinnen im M0- Stadium detektierbar sind (Klein, 2003). Schreiber et al. beschrieben im Jahr 1954 zum ersten Mal sogenannte disseminierte Tumorzellen bei Patientinnen im M0- Stadium, von denen man heute weiß, dass sie für die Bildung von Metastasen verantwortlich sind (Sosa et al., 2014). Die disseminierten Tumorzellen kommen mit einer Rate von 1-2 DCC auf 10^6 Zellen (Riethdorf et al., 2008) ausgesprochen selten im Knochenmark vor, was ihre Detektion und Identifikation erschwert.

Derzeit prägen zwei Konzepte das Bild über die molekularen Eigenschaften und die Entwicklung der DCCs. Zum einen das lineare Progressionsmodell, welches beschreibt, dass Zellen bereits im Primärtumor ihre Malignität erwerben und erst später disseminieren. Zum anderen das Modell der parallelen Progression, welches von einer sehr frühen Disseminierung ausgeht und eine parallele und auch unterschiedliche Entwicklung von Primärtumor und Metastasen beschreibt. Ergebnisse, die belegen, dass Primärtumor und DCCs unterschiedlichen Umfang genomischer Aberrationen aufweisen, bestätigen diese Theorie (Schmidt-Kittler et al., 2003). Dies könnte bedeuten, dass sich die Zellen als unreife Vorstufen im Körper verbreiten und sich erst an bevorzugten Metastasierungsorten differenziert entwickeln.

Aus diesem Modell ergibt sich also die Konsequenz, dass Metastasen auf Therapien, welche auf Zielstrukturen des Primärtumors beruhen, häufig nicht ansprechen und sich langfristig Rezidive entwickeln (Klein, 2009). Da Metastasen die häufigste Ursache für den Tod der an Brustkrebs erkrankten Patientinnen sind (Hagemeister et al. 1980) und gezeigt werden konnte, dass sich 80 % der Metastasen aus diesen früh disseminierten DCCs entwickeln (Hosseini et al. 2016), stellt die frühe Detektion dieser Gruppe von Zellen ein wichtiges Ziel dar.

1.2.3 Detektion und klinische Relevanz disseminierter Krebszellen

Die Anwesenheit der disseminierten Krebszellen geht mit einer schlechteren Prognose und einer Rezidiventwicklung einher (Riethdorf et al., 2008). In verschiedenen Studien wurde herausgefunden, dass bei 20-40 % der Brustkrebspatientinnen DCCs im Knochenmark detektierbar sind, obwohl klinisch und histopathologisch keine Anzeichen einer Metastasierung gegeben sind (Pantel, Woelfle, 2004). Braun et al. stellten im Jahr 2005 in diesem Kontext heraus, dass die DCC-Anwesenheit mit einer niedrigeren Überlebensrate, einem höheren Tumorgrad, einer schlechteren Differenzierung, Lymphknoten-Metastasen und negativem Hormonrezeptorstatus korreliert (Braun et al., 2005).

Auf bisherige Therapien, welche auf den Primärtumor abgestimmt sind, sprechen die DCCs aufgrund unterschiedlicher Zielstrukturen im Vergleich zum PT nicht an (Klein, 2009). Somit besteht die klinische Relevanz darin, sich entwickelnde DCCs frühzeitig zu identifizieren und einen therapeutischen Angriffspunkt für sie zu finden.

Im bevorzugten Metastasierungsgebiet von Brustkrebs, einer epithelialen Krebserkrankung, kommen gewöhnlich keine epithelialen Zellen vor, weshalb epitheliale Marker zur Detektion von möglichen Metastasen gewählt werden (Riethdorf et al, 2008; Sloan et al. 1980; Schmidt-Kittler et al., 2003).

Hierbei liegt das Augenmerk zum einen auf den Cytokeratinen, welche die spezifischsten Marker zum Nachweis epithelialer Zellen in mesenchymalen Organen darstellen (Pantel et al., 1999). Mit der Analyse von CK-gefärbten Einzelzellen aus dem Knochenmark hinsichtlich ihrer chromosomalen Aberrationen kann mit 85 % Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden, ob ein Patient Metastasen bildet, ohne das Stadium der Krankheit zu kennen. Ein Rückschluss, welcher mit Hilfe des PT nicht möglich ist (Klein, 2013). Allerdings ist für die intrazelluläre CK-Färbung eine Permeabilisierung der Zellen notwendig, was die mRNA-Qualität dieser negativ beeinflusst (Klein, 2002). Aus diesem Grund liegt der Fokus zudem auf dem Oberflächenprotein EpCAM, welches von Epithelgeweben und den davon ausgehenden

Neoplasien exprimiert wird (Göitlinger et al., 1986). Hierbei kann nach der EpCAM-Oberflächenfärbung die Isolierung des Transkriptoms erfolgen (Klein, 2002).

Jedoch erscheint es im Rahmen des Konzepts der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) möglich, dass DCCs ihren epithelialen Phänotyp herunterreguliert haben und mittels EpCAM nicht mehr detektierbar sind (Thiery et al., 2009). Weiterhin ist der Oberflächenmarker EpCAM in der alleinigen Verwendung nicht völlig spezifisch und völlig sensitiv, da es bei Brustkrebs EpCAM-negative DCCs sowie EpCAM-positive gesunde Zellen im Knochenmark gibt (Klein et al., 2002). In der Vorarbeit des Lehrstuhls kam es daher zu einer näheren Charakterisierung der sogenannten EpCAM-positiven Nicht-Krebszellen (NCC). Dazu wurden 43 EpCAM⁺ Zellen von Patientinnen im M0-, M1- Stadium sowie gesunden Spendern vergleichend betrachtet. Von EpCAM⁺ Zellen von Mammakarzinompatientinnen, welche in genomischen Analysen Aberrationen aufwiesen und Zellen von gesunden Spendern, welche ein balanciertes Genom zeigten, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt und die Expression aller Gene aus dem Gene Ontology term „integral component of membrane“ (GO: 001621; 5899 Gene) auf den eingeschlossenen Zellen untersucht. Da sich hier kein einheitlicher Marker fand, welcher in der gesamten Population der DCCs exprimiert wurde, sollten daher Marker aus der NCC-Population als Negativmarker dienen und somit nur auf der Zellmembran von NCCs vorhanden sein (Abbildung 32). Cackowski et al. fanden weiterhin in diesem Zusammenhang heraus, dass es sich bei Zellen, welche die Population der EpCAM positiven mutmaßlichen DCCs verunreinigen, um Plasmazellen bzw. Zellen der B-Zelllinie handeln könnte (Cackowski et al. 2019). Dazu konnte auch in den Voruntersuchungen des Lehrstuhls gezeigt werden, dass die potenziellen NCCs eine B-Zell-Signatur aufweisen. So sollten für die folgenden Experimente die Oberflächenproteine CD27 und CD319 (= *SLAMF7*) verwendet werden (Damböck, A., 2022). CD27, ein Oberflächenprotein aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, findet sich auf B-, Plasma-, NK- und T-Zellen. Als kostimulatorisches Molekül für Lymphozyten, beeinflusst CD27 die Funktion, das Überleben und die Differenzierung von B-, Plasma-, NK- und T-Zellen (Lens et al., 1995; van Montfrans et al. 2012). CD319, ebenfalls ein Oberflächenprotein, zählt zu den "Signaling lymphocytic activation molecules" (SLAM), die auf Immunzellen exprimiert werden und sowohl zur Aktivierung als auch zur Inhibition von Immunzellen führen können. Es ist auf einer Vielzahl von Immunzellen präsent, darunter aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Plasma-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen (Veillette, 2010; Woo et al., 2013). Neben der Vorgehensweise, EpCAM⁺ Nicht-Krebszellen mittels einer geeigneten Markerkombination auszuschließen, ist es auch

von großer Bedeutung ein entsprechendes Markermolekül zu wählen, mit welchem Krebszellen verlässlich detektiert werden können. Dabei konnte das Gen *c-Kit* identifiziert werden, welches in M0-Zellen gegenüber M1-Zellen und Zellen von gesunden Spendern mit einer hoch regulierten Genexpression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 33, Werner-Klein, M., 2020). *C-Kit* ist eine Tyrosinkinase, welche als Stammzellfaktor an Prozessen wie Fruchtbarkeit, Homöostase und Melanogenese beteiligt ist (Babaei et al., 2016). Neben dem Vorkommen in normalen Geweben, wie im Brust- oder Gefäßendothel (Caruana et al., 1999), wurde eine Überexpression des *c-Kit* Gens auch mit hämatopoetischen Krebsarten in Verbindung gebracht. Unter anderem dadurch vermutet man den *c-Kit* Zielort im Stammzellkompartiment (Yarden et al., 1987). Dahingegen konnten *c-Kit* Funktionsverluste unter anderem im malignen Melanom oder Mammakarzinom beobachtet werden (Ashman et al., 1999). *C-Kit* codiert für das Oberflächenprotein CD117.

1.3 Zielsetzung

Metastasen gründende DCCs stellen eine wichtige Zielstruktur in der Tumorforschung dar. Trotz der Tatsache, dass ihre Anwesenheit im Körper mit einer schlechteren Prognose und erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht, gibt es noch keine spezifischen Therapiekonzepte für ihre Behandlung. Auch mit bestehenden Markerkollektiven, welche die DCCs detektieren sollten, ergaben sich in der Vergangenheit Probleme.

Bezugnehmend auf die in 1.2 erwähnte Auswahl der Oberflächenproteine CD27 und CD319 zur Verwendung als Negativmarker, wurden Zellen mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer EpCAM und CD45 Expression in DCCs und NCCs separiert. Zellen, welche EpCAM^{high}/CD45⁺ und damit vermutlich NCCs waren, exprimierten signifikant häufiger auch die Immunmarker CD27 und CD319 als Zellen, welche EpCAM^{high+}/CD45⁻ und damit DCCs, waren. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde dann in den Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe eine Immunfluoreszenz-Färbung (IF-Färbung) auf EpCAM, CD27 und CD319 etabliert. Es wurde eine kleine Anzahl von Patientenproben gefärbt, bei welcher es sich um drei Blasenproben, zwei Brustkrebsproben und um einen gesunden Spender handelte. Bei allen darin gefundenen neun EpCAM⁺ Zellen, konnte sich eine Färbung auf die Immunmarker CD27 und CD319 aufweisen lassen. Somit war keine Zelle nur EpCAM⁺ und damit eine DCC. Die geringe Probenzahl stellt eine Limitation dieser Vorarbeit dar (Damböck, A., 2022).

Zur Detektion eines möglichen Positivmarkers wurden ebenfalls aus Vorarbeiten des Lehrstuhls bekannte aberrante EpCAM⁺ Zellen von Mammakarzinom-Patientinnen im M0-Stadium und EpCAM⁺ Zellen von gesunden Spendern RNA-sequenziert und wie bereits in

1.2.3 beschrieben, wurde eine erhöhte *cKit*-Expression in M0-Zellen gegenüber M1-Zellen und Zellen von gesunden Spendern festgestellt.

Daraus schlussfolgernd ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzungen:

1. Unterteilung von Zellen aus Mammakarzinom-Patientinnen im M0-Stadium in EpCAM⁺ DCCs oder EpCAM⁺ NCCs anhand unterschiedlicher EpCAM und CD27/CD319 Expression mittels Immunfluoreszenz-Färbung.
2. Isolation und molekulare Charakterisierung der EpCAM⁺ DCCs oder EpCAM⁺ NCCs. Etablierung einer weiteren Markerkombination, um DCCs zuverlässiger zu detektieren als es bisher mit EpCAM und CD27/CD319 möglich ist.

Dazu gibt Abbildung 1 einen schematischen Überblick über den Ablauf des Projektes.

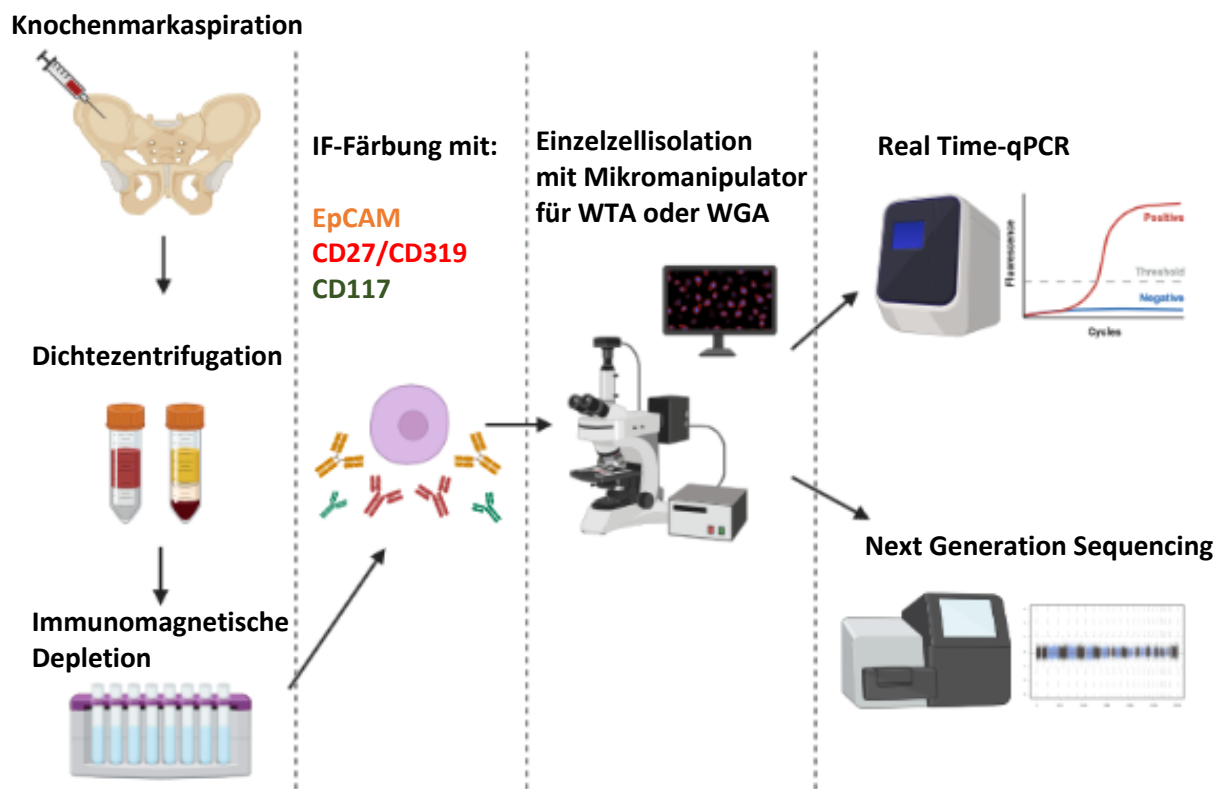


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Studienablaufs. Knochenmarkaspirate werden intraoperativ aus dem Beckenkamm oder der Hüftpfanne entnommen. Es folgt die Aufarbeitung der Probe mittels Dichtezentrifugation und Depletion unerwünschter Zellfraktionen. Im Anschluss werden die Zellen mit dem gewünschten Antikörper gefärbt und in der IF-Mikroskopie betrachtet. Die Zielzellen werden für die Genom- beziehungsweise Transkriptomamplifikation isoliert. Es folgen qPCR und LowPass-Sequenzierung.

2. Materialien

2.1 Knochenmarkproben

2.1.1 Kooperationspartner

Von den in der Tabelle 2 1 dargestellten klinischen Kooperationspartnern wurden die Proben der vorliegenden Arbeit erhalten.

Tabelle 2 1 Darstellung von Instituten und verantwortlichen Ärzten zur Probenzustellung.

Name	Institution
Prof. Dr. Markus Weber	Orthopädische Klinik, Barmherzige Brüder Regensburg
Dr. Peter Ugocsai	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Regensburg
Prof. Dr. Stephan Seitz	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Regensburg
Prof. Dr. Dr. Joachim Grifka	Orthopädische Klinik der Universität Regensburg, Asklepios Klinik Bad Abbach

Die Knochenmarkproben (KMP) der Krebspatientinnen werden vor der Primär-Operation aus dem Beckenkamm entnommen. Um eine Gerinnung zu verhindern, wird das Material mit Heparin gemischt. So erreichen die KMP den Lehrstuhl für Experimentelle Medizin.

Die KMP der Kontrollpatienten werden bei einer Hüftgelenkersatz-Operation aus dem Acetabulum und dem Femur gewonnen. Dabei wird das Material in 15 ml PBS überführt und so an den Lehrstuhl für Experimentelle Medizin transportiert.

2.1.2 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

Tabelle 2 2 Verwendete Chemikalien.

Name	Hersteller	Katalognummer	Verwendung
1kb Plus DNA Ladder+Dye	New England Biolabs	N3200S	Agarose Gelelektrophorese
AB-Serum	Bio-Rad	805135	EpCAM-Färbung
ACK Lyse Puffer	Life Technologies	A10492	Aufarbeitung KM
Agarose	Biozyme	840040	Agarose Gelelektrophorese
Albumin, Rinderserum, Mol.Biol., 20 mg	Roche Diagnostics GmbH	10711454001	WGA, WGA-Reamp., WGA-QC, WTA-QC
Albuminlösung	Sigma Aldrich	B8667-5ml	WGA
ATP Lösung 40 75 100 mM	Roche Diagnostics GmbH	111409655001	WGA
BD CompBeads für antihuman AK	BD Bioscience	552843	Durchflusszytometrie
BSA zum Picken	Sigma Aldrich	B8667-5ml	Zellisolation
DAPI	Sigma Aldrich	10236276001	IF-Färbung
DMEM	PAN Biotech		Zellkultur
DMEM/F12	PAN Biotech	P04-41500	Zellkultur
dNTP Set, 100 mM each A,C,G,T	GE Healthcare Europe	28-4065-51	WGA
dNTP Set, 100 mM each A,C,G,T, 4x24 µM	VWR International GmbH	28-4065-51	WTA, WTA-Reamp
dNTP Set, 10 mM each A,C,G,T	GE Healthcare Europe	28-4065-51	WGA-Reamp
Ethanol absolut Mol. Bio. Grade 250 ml	VWR International GmbH	62490W 3T	Low Pass library preparation
Ethanol absolut p.A., 1l			WTA
Ethidium-Bromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma Aldrich	E1510	Agarose Gelelektrophorese
FastStart DNA Polymerase, dntPack, 5 U/µl	Roche Diagnostics GmbH	.4738420001	WTA-QC, WGA-QC
FastStart dNTP Mix	Roche Diagnostics GmbH		Primeretablierung, WTA-QC
FastStart Puffer (+MgCl₂)	Roche Diagnostics GmbH		Primeretablierung, WTA-QC
fixierbarer Lebend-Tot-Farbstoff	eBioscience	65-0865-14	Durchflusszytometrie
Fluoro-Fix-Puffer	Biolegend	.422101	Durchflusszytometrie
Formamid BioUltra, for molecular biology, > 99,5 % (T), 250 ml	Sigma Aldrich	47671-250ml-F	WTA-Reamp

Hank's Salzlösung	Biochrom AG	L2045	Aufarbeitung KM
Igepal CA-360 viscous liquid, 50 ml	Sigma Aldrich	I3021-50ml	WTA, WGA
Intracellular staining Fixation Puffer	Biolegend	.420801	Durchflusszytometrie
Intracellular staining Permeabilization Puffer	Biolegend	.421002	Durchflusszytometrie
iQ SyBr Green Supermix	Bio-Rad	1708885	qPCR
Kaliumchloridlösung 1M in H2O for molecular biology, 100 ml	Sigma Aldrich	60142-100ml-F	WTA
Kaliumhydrogenphosphat zur Analyse 1 kg	VWR International GmbH	.1048731000	WTA
L-Glutamin	PAN Biotech	P04-80100	Zellkultur
LightCycler 480 SyBr Green I Master für QM	Roche Diagnostics GmbH	4887352001	qPCR
LMW Ladder	New England Biolabs	N0557S	Agarose Gelelektrophorese
Magnesiumchlorid 1 M, 100 ml	Sigma Aldrich	M1028-100ml	WTA
Mineralöl for molecular biology, light oil, 500 ml	Sigma Aldrich	M5904-500ml	WTA
MseI, rekombinant, 2500 U 50000 U/ml	New England Biolabs	R0525M	WGA
mTRAP Lyse Puffer, 100 ml	Active Motif	.29011	WTA
Penicillin 10.000 U/ml Streptomycin 10 mg/ml	PAN Biotech	P06-07100	Zellkultur
Pepton	Becton Dickinson	.2116677	EpCAM-Färbung
Percoll	Thermo Fisher Scientific	.17089101	Aufarbeitung KM
Poly T gripNA Probe (from mTRAP Midi)	Active Motif	.29008	WTA
RPMI 1640	PAN Biotech	P04-17500	Zellkultur
Sera Plus, 500 ml	Pan Biotech	P30-3702	WGA
SPRI Select	Beckman Coulter	B23317	LowPass library preparation
Streptavidin Beads (from mTRAP Midi), 1,6 ml	Active Motif	.29010	WTA
TE Puffer 1x pH 8.0 low EDTA	AppliChem	A8569,0500	LowPass library preparation
Tris-Puffer pH8.0	AppliChem	A4577,0500	WTA
tRNA from E.coli 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, 50 ml	Sigma Aldrich	P9416-50ml	WTA, WGA

Wasser für Chromatographie	VWR International GmbH	.1.153.331.000	WGA
Wasser UltraPure DEPC-Treated, 1l	Invitrogen GmbH	.750023	WTA
Wasser, PCR-H2O	VWR International GmbH	1.15333.1000	WTA-QC, WGA-QC, WTA-Reamp, WGA-Reamp

2.2.2 Selbstangesezte Puffer und Lösungen

Tabelle 2 3 Selbstangesezte Puffer und Lösungen

Name	Zutaten	Verwendung
AB-Serum 10 % / Pepton 2 %	5 ml AB-Serum 40 ml 20 % Peptonlösung 1xPBS pH7.4	EpCAM-Färbung
cDNA-Igepal Waschpuffer	500 µl Tris-HCL 1 M, pH 8,0 750 µl KCl 1 M 1000 µl DTT 0.1 M 25 µl 100 % Igepal CA-630 7725 µl DEPC-Wasser	WTA
cDNA-Tween Waschpuffer	500 µl Tris-HCL 1 M, pH 8,0 750 µl KCl 1 M 1000 µl DTT 0.1 M 50 µl 100 % Tween20 7700 µl DEPC-Wasser	WTA
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 vom 5 M EDTA-Ansatz) 10 ml FCS 0,01 % NaN ₃ (500 µl vom 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 1xPBS 2.5 g BSA Fraktion V 2 ml 0.5 mM EDTA	Aufarbeitung KM
MgCl₂ 40 mM	40 µl MgCl ₂ 100 µl DEPC-Wasser	WTA
Peptonlösung 20 %	100 g Bacto Pepton 500 ml 1xPBS pH 7,4	EpCAM-Färbung

	Sterilfiltration über 0,45 µl Filter	
Percoll 100 %	100 ml Percoll-Stammlösung 9 ml Hanks balanced salt solution Sterilfiltration Dichtemessung mittels Pyknometer, Sollwert bei 1,124 g/ml	Aufarbeitung KM
Phosphat buffered saline (PBS) pH7.4 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 2h, dann 25ml Ethanol 100 % hinzufügen Mischen und zentrifugieren, Überstand verwerfen, dann Pellet lösen in 45 ml PCR-H ₂ O	WTA/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
Tween 10 %	2 ml 100 % TWEEN 20 18 ml DEPC-Wasser	WTA

2.2.3 Enzyme

Tabelle 2 4 Verwendete Enzyme.

Name	Hersteller	Katalognummer	Verwendung
BbVI	New England Biolabs	R0173S	Restriktionsverdau
FastStart DNA Polymerase, dntPack, 5 U/µl	Roche Diagnostics GmbH	4738420001	WTA-QC, WGA-QC, Primeretablierung

HaeIII	New England Biolabs	R0108S	Restriktionsverdau
Hpy188I	New England Biolabs	R0617S	Restriktionsverdau
Hpy188III	New England Biolabs	R0622S	Restriktionsverdau
HpyCH4V	New England Biolabs	R0620S	Restriktionsverdau
Invitrogen SuperScript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	11553117	WTA
MnII	New England Biolabs	R0163S	Restriktionsverdau
NlaIII	New England Biolabs	R0125S	Restriktionsverdau
Pol Mix 5 U/μl (Expand long Template enzyme mix)	Roche Diagnostics GmbH	11759060001	WTA-Reamp
Protease	Active Motif	29012	WTA
Proteinkinase K	Roche Diagnostics GmbH	3115828001	WGA
T4-DNA-Ligase. 500 U, 5 U/μl	Roche Diagnostics GmbH	10799009001	WGA
Terminal Desoxynucleotidyl Transferase, Rekombinant	Affymetrix	72003	WTA

2.2.4 Antikörper und Beads

Tabelle 2 5 Verwendete Antikörper und Beads.

Name	Antigen	Fluorochrom	Klon	Katalog-nummer	Hersteller	Verwendung
CD11b-APC, human	CD11b	APC	M1/70.1 5.11.5	130-091-241	Miltenyi Biotec	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
CD235a (Glycophorin A) MicroBeads, human	CD235a	-	-	130-050-501	Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM
Anti-APC-MicroBeads	APC	-	-	130-090-855	Miltenyi Biotec	Aufarbeitung KM

CD326 (EpCAM) antibodies, human	EpCAM	PE	HEA-125	130-113-264	Miltenyi	Durchflusszytometrie, Aufarbeitung KM
Mouse IgG1, k, Isotyp Ctrl Antibody	Iso für Maus IgG1,k	PE	-		biolegend	Durchflusszytometrie
AMPure XP beads					Beckman Coulter	LowPass library preparation
Alexa Fluor 647 anti-human CD27 Recombinant Antibody	CD27	AF647	QA17A 18	393205	biolegend	Aufarbeitung KM
Alexa Fluor 647 anti-human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	AF648	162.1	331819	biolegend	Aufarbeitung KM
Alexa Fluor 488 anti-human CD117 Antibody	CD117	AF488	104D2	313233	biolegend	Aufarbeitung KM
Mouse IgG1, k, Isotyp Ctrl Antibody	Iso für Maus IgG1,k	AF647	-		biolegend	Aufarbeitung KM
Mouse IgG1, k, Isotyp Ctrl Antibody	Iso für Maus IgG1,k	AF488	-		BD Science	Aufarbeitung KM

2.2.5 Primer

Tabelle 2 6 Verwendete Primer.

Name	Sequenz 5'—> 3' (N=A/T/C/G; V=A/C/G)	Amplifikations- temperatur (°C)	Amplikon- Größe (bp)	Verwen- dung
CFL15CN8	CC C CCC CCC CCC CCC GTC TAG ANN NNN NNN	RT	-	WTA
CFL15CT24BpuEI	CCC CCC CCC CCC CCC GTC TAG ACT TGA GTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	RT	-	WTA

CP2	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC	65	-	WTA
ACTB_for	GCG TGA CAT TAA GGA GGA GCT G	58	378	WTA-QC
ACTB_rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG AT	58	378	WTA-QC
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
CP2_9C	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC	55	-	WTA- Reamp
Lib1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT	65	-	WGA, WTA
Lib2	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT	60	-	WGA- Reamp
ddMSE11	TAA CTG ACAG CCC	65	-	WGA, WTA
KRAS_91bp_5'	ATA AGG CCT GCT GAA AAT GAC	58	-	WGA-QC
KRAS_91bp_3'	CTG AAT TAG CTG TAT CGT CAA GG	58	-	WGA-QC
D5S2117_5'	CCA GGT GAG AAC CTA GTC AG	58	-	WGA-QC
D5S2117_3'	ACT GTG TCC TCC AAC CAT GG	58	-	WGA-QC
CK19 3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG	58	-	WGA-QC
CK19 5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C	58	-	WGA-QC
TP53 Exon2/3 3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA	58	-	WGA-QC
TP53 Exon2/3 5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC	58	-	WGA-QC
CD45	Fwd: TTAGGGACACGGCTGACT TC Rev: TATTTGTGACAGGGCAAA GC	58	106	qPCR
hEpCAM	Fwd: AAAGTTTGCGGACTGCAC TT Rev: TGGACATAGCTGATGTGG CT	58	161	qPCR
AHNAK	Fwd: AGTGTGTCTGGGCCTCAA G Rev:	58	117	qPCR

	TGGTTGGCAGAGAAATGG GG			
AHSP	Fwd: TCAACTATTACAGGCAGC AGG Rev: CTGGCCAAGTACAGGGAC TT	56	118	qPCR
CD27	Fwd: TCAGCAACTGGGCACAGA A Rev: TTCCTGGCTCACACATCT GG	58	180	qPCR
CD319	Fwd: GCTCACAGAGCACCTGTC AA Rev: ACATCCTCTTCCCCATGTT CC	58	111	qPCR
CD45	Fwd: TTAGGGACACGGCTGACT TC Rev: TATTTGTGACAGGGCAAA GC	58	106	qPCR
hEpCAM	Fwd: AAAGTTTGCGGACTGCAC TT Rev: TGGACATAGCTGATGTGG CT	58	161	qPCR
AHNAK	Fwd: AGTGTGTCTGGGCCTCAA G Rev: TGGTTGGCAGAGAAATGG GG	58	117	qPCR
AHSP	Fwd: TCAACTATTACAGGCAGC AGG Rev: CTGGCCAAGTACAGGGAC TT	56	118	qPCR
Ca1	Fwd: GTGATAACGCTGTCCCCA TG Rev: TTCCTCAAGAACACAGCC CT	58	123	qPCR
Jun	Fwd: GGTGGCACAGCTTAAACA GAA Rev:	58	101	qPCR

	TTTGAAGAGAGACCGTCG GGG			
--	---------------------------	--	--	--

2.2.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 2 7 Verwendete Kits.

Name	Hersteller	Katalognummer	Verwendung
Agilent dsDNA HS Kit	Agilent	5067-4626	LowPass library preparation
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626	LowPass library preparation
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, nicht-heparinisiert Länge 75 mm x 1.1/1.2 mm	Brand	749321	Zellisolation
Nitril BestGen® Powderfree gloves	Meditrade	1286	Feuchtarbeiten
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides; 8 Felder	Thermo Fisher Scientific	11367764	Picken
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides; 8 fields	Thermo Fisher Scientific	11367764	Aufarbeitung KM, Fluoreszenzmikroskopie
PCR SingleCap 8er-Soft Strips 0.2 ml, clear	Biozym	710970	PCR, qPCR, WTA, WTA-Reamp, LowPass library preparation
PCR tube 0.2 ml, single tube	4titude Deutschland	4ti-0795	PCR, qPCR, WTA, WTA-Reamp, LowPass library preparation
PCR tube 1.5 ml, graduated, non-sterile	Greiner Bio-One	616201	PCR, qPCR, WTA, WTA-Reamp. LowPass library preparation
PCR tube 2 ml, graduated, non-sterile	Greiner Bio-One	623201	PCR, qPCR, WTA, WTA-Reamp, LowPass library preparation
PCR-Siegelfolie	Biozym	600208	PCR, qPCR
PCR-Siegelfolie	Thermo Fisher Scientific	AB0558	PCR, qPCR
Ampli1 Low Pass kit	Menarini Silicon Biosystems	WGLPAB	LowPass library preparation
Bioanalyzer DNA 1000 Kit	Agilent Technologies	5067-1504	LowPass library preparation
Bioanalyzer DNA High Sensitivity Kit	Agilent Technologies	5067-4626	LowPass library preparation
Expand long Template PCR System	Roche Diagnostics	11759060001	WTA-Reamp., WTA, WGA, WGA-Reamp

FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPPack	Roche Diagnostics	4738420001	WTA-QC, WGA-QC, Primeretablierung
Invitrogen SuperScript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific	11553117	WTA
KAPA Library Quantification Kit	Roche Diagnostics	7960298001	LowPass library preparation
MiSeq reagent Kit v3	Illumina	MS-102-3001	LowPass library preparation
QiaQuick PCR purification kit	Qiagen	28106	WTA-Reamp-Aufreinigung
Qubit dsDNA BR Assay	Thermo Fisher Scientific	Q32853	LowPass library preparation
Qubit dsDNA HS Assay	Thermo Fisher Scientific	Q32854	LowPass library preparation

2.2.7 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 2 8 Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Verwendung
MCF7	menschliche Brustkrebszelllinie	Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie
Name	Zusammensetzung	Zelllinie
RPMI-Medium	500 ml RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin	MCF7

2.2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller	Katalognummer
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, with Cell- Strainer Cap	BD Falcon	352235
Cell Strainer 40 µm	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
MAXYMum Recovery™ PCR Tubes 0.2 ml	Axygen Scientific	11370145
MicroAmp EnduraPlate Optical 96-well Full-skirted Plates	Thermo Fisher Scientific	A31728
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
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One	188271
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One	227261

2.2.9 Geräte

Tabelle 2 10 Verwendete Geräte.

Name	Hersteller	Verwendung
Autoklav 3150 RL	Systec	Zellkultur
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies	LowPass-Sequenzierung
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
Hybridization oven PerfectBlot	Peqlab	WTA
Inkubator Heraeus BB15	Thermo Fisher Scientific	Zellkultur
Laminar flow bench Her Safe KS18	Thermo Fisher Scientific	Aufarbeitung KM, WTA, WGA, Zellkultur, Durchflusszytometrie
LightCycler 480	Roche Diagnostics	qPCR
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
Microscope IX81, invertiert	Olympus	DCC Isolation
Mikrowelle	Micromaxx	Agarose Gelelektrophorese
MiSeq	Illumina	LowPass Sequenzierung
Mörser und Stößel	KPM	Aufarbeitung KM
Multipette Stream	Eppendorf	PCR
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, LowPass library preperation
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	LowPass library preparation
Research Pro 8-channel pipette	Eppendorf	PCR, LowPass library preparation
Roller Mixer SRT1	Stuart Scientific	WTA, Färbung KM
UV Illuminator	Intas	Agarose Gelelektrophorese Bildaufnahme
Vacusaft Comfort Absaugsystem	Integra Biosciences	Zellkultur
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

2.2.10 Software

Tabelle 2 11 Verwendete Software.

Name	Hersteller	Verwendung
Autoklav 3150 RL	Systec	Zellkultur
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies	LowPass-Sequenzierung
BioRender	https://biorender.com	Erstellung von Abbildungen
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
Draw.io	https://aps.diagrams.net	Erstellung eines Workflows
ImageJ (v 1.53g)	https://imagej.nih.gov/ij/	Auswertung und Bearbeitung der Fluoreszenzmikroskopie
LightCycler480 Software 1.5	Roche	qPCR
NCBI Nucleotide Database	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleoti	Primerdesign
NCBI Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Primeretablierung
NEBcutter v2.0	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/	Primeretablierung

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
Webcutter 2.0	http://heimanlab.com/cut2.html	Primeretablierung

3. Methoden

3.1 Aufarbeitung von Knochenmarkproben

Nach dem Erhalt der Proben von Knochenmarkspendern werden diese noch taggleich aufgearbeitet. Dabei müssen die Proben von gesunden Spendern nach Hüftoperation zuerst mit einer Schere zerkleinert und mit einem Mörser gemahlen werden. Nach diesem Schritt können Proben von gesunden und von kranken Spendern nach dem gleichen Protokoll aufgearbeitet werden. Dazu wird die Knochenmarkprobe zunächst in ein 50 ml Tube überführt und mit Hanks Salzlösung auf 50 ml aufgefüllt. Die Probe wird dann zehn Minuten bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Bei diesem Schritt gehen Fett und Thrombozyten in den Überstand über, welcher danach verworfen wird. Der Waschschrift wird ein zweites Mal wiederholt. In ein Zentrifugenröhrchen werden 6 ml Percoll 65 % der Dichte 1,077 g/cm³ vorgelegt und mit 9 ml Zellsuspension überschichtet. Nach der 20-minütigen Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C gehen Granulozyten und Erythrozyten aufgrund höherer Dichte in das Sediment über. Die entstehende Interphase, welche die mononuklearen Zellen (MNZ) enthält, wird vorsichtig entnommen und mit PBS auf 50 ml in einem Zentrifugenröhrchen aufgefüllt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C wird der Überstand erneut abgegossen und das Pellet mit 2-5 ml PBS resuspendiert. Es folgt die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer. Dabei werden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau unter dem Mikroskop betrachtet und MNZ und Erythrozyten ausgezählt. Dabei dient der Farbstoff Trypanblau dazu tote Zellen anzufärben und auszuschließen.

3.2 Depletion

Erhält man bei der Zellzählung mindestens 10⁶ Zellen, wird vor der Markerfärbung die Depletion angeschlossen. Dabei werden mittels negativer immunomagnetischer Selektion zielgerichtet spezifische Zellpopulationen aus einer heterogenen Suspension abgetrennt. Dazu erfolgt zunächst die erste Antikörperzugabe. Dabei werden MACS Puffer (90 µl auf 10⁷ MNZ) sowie APC-konjugierte Antikörper gegen CD11b (welche von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert werden, 2 µl auf 10⁷ MNZ), CD33 (welche von myeloischen Zellen exprimiert werden, 2 µl auf 10⁷ MNZ) und CD45 (Antigen von Leukozyten, 5 µl auf 10⁷ MNZ) hinzugegeben und 15 Minuten bei 4 °C stehend inkubiert. Überschüssige Antikörper werden anschließend durch Waschen mit dem zehnfachen Volumen an MACS-Puffer entfernt.

Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 500 x g wird der Überstand abgegossen und die zweite Antikörperzugabe erfolgt. Dazu werden MACS-Puffer (60 µl auf 10^7 Erythrozyten), Anti-APC-Beads (20 µl auf 10^7 MNZ) und anti-glycophorin-Beads (von erythroiden Zellen exprimiert, 20 µl auf 10^7 Erythrozyten) hinzugegeben und erneut für 15 Minuten bei 4 °C stehend inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (500 x g, 5 Minuten), wird das Pellet in 1 ml MACS Puffer aufgenommen und durch einen 40 µl Filter in ein 50 ml Tube überführt. Dieser Schritt dient dazu Zellaggregate, welche die MACS-Säule verstopfen könnten, zu isolieren. Es wird mit 1 ml MACS-Puffer nachgespült.

Für den eigentlichen Depletionsvorgang wird eine Magnetsäule in eine Halterung eingespannt und zunächst mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend werden 2 ml der Zellsuspension auf die Säule pipettiert und drei Mal mit 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Somit wird verhindert, dass die Säule trocken läuft, sodass alle Zellen die Depletion durchlaufen. Das erhaltene Eluat wird auf Eis gelagert und enthält die unmarkierten Zellen. Die mit Antikörper konjugierten Zellen werden in der Säule gehalten. Das Eluat wird erneut abzentrifugiert (500 x g, 5 Minuten) und in 1 ml PBS resuspendiert und erneut ausgezählt.

Für die Depletion dürfen maximal 100×10^6 Zellen auf eine Depletionssäule geladen werden.

3.3 Immunzytochemie

3.3.1 EpCAM-Färbung

Wenn möglich werden $1-2 \times 10^6$ Zellen gefärbt.

Zuerst wird die Zellsuspension mit 1 ml PBS für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand muss danach sehr vorsichtig abgenommen werden, um das Pellet nicht zu berühren. Das Pellet wird in 100 µl 10 %AB/2 %/Pepton/PBS aufgenommen.

Danach werden 0,5 µl EpCAM-Antikörper hinzugefügt, welcher mit dem Fluorochrom PE (Phycoerythrin) gekoppelt ist. Die Zellen müssen nun für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert werden. Weil Phycoerythrin schnell ausbleicht, muss ab diesem Punkt jeder Schritt geschützt vor Licht stattfinden.

Nun erfolgt eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 x g und die Aufnahme des Pellets in 1 ml PBS. Dieser Schritt wird ein zweites Mal wiederholt. Nach der Zentrifugation wird das Pellet für die Weiterverarbeitung in 200 µl PBS resuspendiert.

3.3.2 Färbung mit CD27 und CD319

Um mit den Negativmarkern CD27 und CD319 zwischen EpCAM-positiven DCC und NCC unterscheiden zu können, wird bei den Knochenmarkproben eine Färbung für die Immunfluoreszenzmikroskopie vorgenommen. Dabei erfolgt die Färbung, wie in Absatz 3.3.1 beschrieben, nur mit zusätzlicher Hinzugabe der beiden Marker. Verwendete Konzentrationen und Mengen sind Tabelle 3 1 zu entnehmen.

3.3.3 Färbung mit DAPI

Um zu überprüfen, ob die zu isolierenden Zellen bereits ihre Membranintegrität verloren haben, wird nach der CD27/CD319-Färbung noch eine DAPI-Färbung angeschlossen. Dafür wird zunächst eine 5 mg/ml konzentrierte DAPI-Lösung mit Methanol 1:50 verdünnt und davon 0,5 µl zu der 200 µl Zellsuspension im Mikroskopierfeld gegeben, sodass am Ende eine 1 µg/ml DAPI-Lösung verwendet wird. Die Lösung wird nach dem üblichen Screenen und Isolieren der Zellen eingesetzt.

3.3.4 Färbung mit CD117

Um mit dem Positivmarker CD117 zwischen EpCAM-positiven DCC und NCC unterscheiden zu können, wird bei den Knochenmarkproben eine Doppelfärbung für die Immunfluoreszenzmikroskopie vorgenommen. Dabei erfolgt die Färbung, wie in Absatz 3.3.1 beschrieben, nur mit zusätzlicher Hinzugabe des CD117-Antikörpers. Verwendete Konzentrationen und Mengen sind Tabelle 3 1 zu entnehmen.

3.3.5 Quantifizierung mittels ImageJ

Die Zellfärbung sollte quantifiziert werden, wozu die Software ImageJ verwendet wurde. Dabei wird eine „Region of Interest“ festgelegt, bei welcher es sich um die gefärbten Zellen handelt. Die Software misst in der Region die Pixelintensität und ermittelt einen minimalen und maximalen Grau-Wert.

Tabelle 3 1 Verwendete Antikörper bei Färbung von Knochenmarkproben.

Name	Antigen	Fluorochrom	Konzentration [µg/ml]	verwendete Menge [µl]
CD326 (EpCAM) antibodies, human	EpCAM	PE	50	0,5
Alexa Fluor 647 anti- human CD27 Recombinant Antibody	CD27	AF647	6	1,25
Alexa Fluor 647 anti- human CD319 (CRACC) Antibody	CD319	AF647	200	1,25
Alexa Fluor 488 anti- human CD117 Antibody	CD117	AF488	200	5,0

3.4 Isolierung von positiven Einzelzellen

Die gefärbten Zellen werden mit einem Mikromanipulator von einem Acht-Feld-Objektträger isoliert. Dazu werden die verwendeten Felder des Objektträgers mit einer BSA-Lösung (20 mg/ml) gespült, damit die Zellen nicht an der Oberfläche des Objektträgers haften bleiben. Ein Feld wird als sogenanntes Pick-Feld vorbereitet, in dem nach der BSA-Spülung 200 µl PBS hinzugegeben wird. Die Zellsuspension wird mit PBS so verdünnt, dass man circa 300.000 Zellen in 200 µl in ein Feld geben kann. EpCAM⁺ Zellen werden mit einer FCS benetzten Glaskapillare (verhindert die Adhäsion der Zellen am Glas) eingesaugt und in das Pickfeld transferiert (Abbildung 2). Unter mikroskopisch gestützter visueller Kontrolle wird jede Einzelzelle mit einer 2 µl-Pipette eingesaugt und in 4,4 µl Lyse Mix (10 ng tRNA in Lysispuffer) aufgenommen. Als Negativkontrolle wird bei jedem Patienten eine Probe des Puffers auf dem Pickfeld (Pickkontrolle) genommen, um Kontaminationen des Puffers bzw. Verunreinigungen des Pickfeldes auszuschließen. Dies wird nach dem Picken der Zellen vom Pickfeld durchgeführt, in welchem die mit der Kapillare aufgesaugten Zellen in die Pipette überführt wurden sind. Bis zur weiteren Bearbeitung werden die Zellen bei -80 °C gelagert. Die Negativkontrolle wird analog den Patientenzellen behandelt und bis zur Qualitätskontrolle von WTA-Produkt und WGA-Produkt mitgeführt. Nur bei negativem PCR-Ergebnis der Negativkontrolle werden die isolierten Zellen für die weiteren Analysen verwendet.

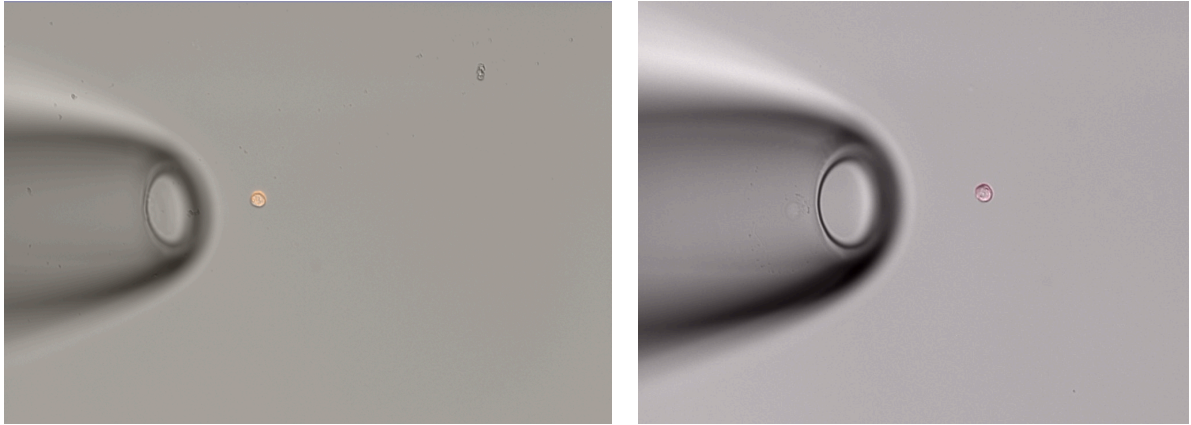


Abbildung 2 Isolierung von markerpositiven Einzelzellen mittels Mikromanipulator. Zu sehen ist links die mikroskopische Darstellung einer EpCAM⁺ Zelle im Cy3-Kanal und rechts einer CD27/CD319⁺ Zelle im APC-Kanal. Die Vergrößerung beträgt 40x. Skala 50 µm.

3.5 Amplifikation von Transkriptom und Genom der gleichen Zelle

3.5.1 Isolierung und Amplifikation des Transkriptoms

Mit Hilfe der Methode der „Whole transcriptome Amplifikation“ (WTA) wird die mRNA der lysierten Zellen von anderen Zellbestandteilen, u.a. der gDNA getrennt und revers in cDNA transkribiert. Im Anschluss erfolgt die Amplifikation. Die Methode beruht auf publizierten Verfahren (Hartmann et al., Klein et al.).

Die zu verarbeitenden Zellen liegen nach der Zellisolation in 4 µl TRAP Lysispuffer und 0,4 µl tRNA vor und wurden bei -80 °C gelagert. Vor dem Auftauen der Probe wird ein Poly-T-Peptid-Nukleinsäure-(PNA)-Mix vorbereitet, welcher 1 µl eines Lysispuffer/Protease 1:20 Mixes und 1 µl der PNA enthält. Zu jeder Probe werden 2 µl dieses Mastermixes hinzugegeben und in der PCR-Maschine einem Temperaturprogramm (zehnminütiger 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 Poly-A-Abschnitte der mRNA bei 22 °C für zehn Minuten) unterworfen. Anschließend werden der Probe 4 µl Streptavidin-konjugierte mTRAP-Beads hinzugefügt, welche bei Raumtemperatur rollend 45 Minuten inkubiert werden und dabei an die PNA binden. Dadurch können im Anschluss die mRNA-PNA-Komplexe von den anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Dafür werden die Proben dreimal gewaschen und die mRNA-PNA-Komplexe am Magneten immobilisiert. Der erste Waschschrift erfolgt mit 10 µl cDNA-Waschpuffer-Igepal, der zweite mit 20 µl cDNA-Waschpuffer-Tween und der dritte mit 20 µl cDNA-Waschpuffer-Igepal. Die verbleibenden Überstände (welche u.a. DNA enthalten) werden in einem Tube, in welchem 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier vorgelegt wurde, gesammelt, mit 120 µl Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt und für die WGA bereitgestellt.

Es erfolgt nun die Transkription der mRNA in cDNA. Dazu werden die Beads vom Magneten entfernt und in 10 µl des cDNA-Synthese-Mix-1 resuspendiert. Während der zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt das Annealing der Primer (zum einen ein zufälliger Oktamer-Primer, welcher mit seiner Sequenz an komplementäre Stellen der mRNA bindet, zum anderen ein Poly-T-Primer, welcher die Transkription am Poly-A-Abschnitt beginnt.). Danach erfolgt die Zugabe des cDNA-Synthese Mix II, der die Reverse Transkriptase enthält, und Rotation des Röhrchens für 45 Minuten bei 44 °C im Hybridisierungssofen. Die Beads mit den mRNA-cDNA-Komplexen werden abermals an der Röhrchenwand immobilisiert und die Überstände verworfen. Nun wird mit 20 µl Tailing-Waschpuffer gewaschen und die Probe in 10 µl resuspendiert. Um ein Verdampfen der Probe zu verhindern, erfolgt eine Übersichtung mit 40 µl PCR-Öl. Bei der anschließenden vierminütigen Inkubation bei 94 °C wird der mRNA-cDNA-Hybrid denaturiert, sodass die cDNA nicht mehr an mRNA und die Beads gekoppelt vorliegt. Auf Eis erfolgt nun die Zugabe von 0,8 µl terminaler Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) zur Probe durch das Öl hindurch. Die Tailing-Reaktion, bei welcher der Poly-G-Schwanz an die cDNA addiert wird, schließt sich bei 37 °C für eine Stunde an. An den addierten Poly-G-Schwanz kann nun ein Poly-C-Primer binden und der komplementäre cDNA-Strang kann synthetisiert werden. Die TdT wird dann für fünf Minuten bei 70 °C inaktiviert. Abschließend wird eine PCR durchgeführt. Dafür werden 35 µl des PCR-Mix I durch das Öl zur Probe hinzugefügt. Nach Erwärmung auf 78 °C werden 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	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
cDNA-Synthese-Mix I	2,0 µl 5x RT Puffer 1,0 µl DTT 0.1 M 0,5 µl Igepal 10 % 0,5 µl DEPC-Wasser 3,0 µl CFL15CT24BpuEI 100 µM 3,0 µl CFL15CN8 200 µM
cDNA-Synthese-Mix II	2,0 µl 5x RT Puffer 1,0 µl DTT 0.1 M 0,5 µl dNTP 10 mM 0,5 µl DEPC-Wasser

	3,0 µl Reverse Transkriptase Super Script II
Primäre WTA Mix I	4,0 µl Expand Long Template Buffer 1 7,5 µl Formamid 20 % 24,0 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	1,0 µl MgCl ₂ 40 mM 1,0 µl DTT 1 mM 1,0 µl dGTP 2 mM 0,5 µl KH ₂ PO ₄ 200 mM 6,5 µl DEPC-Wasser

Tabelle 3 3 PCR-Programm zur cDNA-Amplifikation.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:s)	Zyklen
1	78	00:00:30	1
2	94	00:00:15	20
3	65	00:00:30	
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	
9	4	Unendlich	1

3.5.2 Aufarbeitung der genomischen DNA

Die Aufarbeitung der genomischen DNA erfolgt auf Grundlage eines publizierten Verfahrens (Klein et al., 2002). Das Ziel ist es den DNA-Gehalt einer Zelle (7-8 pg) auf einige Mikrogramm zu vervielfältigen. Dazu wird die genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen fragmentiert und an die entstehenden Sticky ends Oligonukleotid-Adapter ligiert. Somit entstehen Primer-Bindungsstellen für die Amplifikation. Die genomische DNA, welche bei der WTA in den Überständen isoliert wurde, wird mindestens über Nacht bei -20 °C in 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier (0,25 %) und 120 µl 100-prozentigem Ethanol gefällt.

Für die weitere Verarbeitung werden 60 µl dieses Puffer-Mix in ein 0,2 ml Tube gegeben und 45 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 10 µl entfernt und mit 180 µl 70-prozentigem Ethanol ersetzt. Es erfolgt eine zehnminütige Inkubation bei 350 rpm und 19 °C. Eine weitere zehnminütige Zentrifugation bei 14000 rpm erfolgt bei

Raumtemperatur. Die beschriebenen Schritte werden weitere zweimal wiederholt, sodass beim dritten Mal der Überstand abgenommen wird und das Pellet trocknen gelassen wird. 3,84 µl vom PCR-Wasser werden hinzugegeben und über Nacht bei 19 °C und 350 rpm inkubiert. Diese verschiedenen Waschschrte dienen zur Aufreinigung der gDNA von restlicher RNA.

Danach erfolgt der Proteinkinase K Verdau. Dabei werden Proteine und DNAsen verdaut, welche fälschlicherweise in den Überstand gelangt sind. Die DNA wird bei diesem Schritt freigesetzt. Dazu werden 0,5 µl OnePhorAll-Puffer (OPA 10x), je 0,13 µl Tween 10 % und Igepal 10 % sowie 2,6 µg Proteinase K zugegeben und der Verdau für 15 Stunden bei 42 °C in der PCR-Maschine durchgeführt. Anschließend wird die Proteinase K zehn Minuten bei 80 °C inaktiviert. Die freigesetzte DNA wird mit 0,25 µl *MseI* (50.000 U/µl), welches die gDNA fragmentiert und 0,25 µl Wasser bei 37 °C für drei Stunden in der PCR-Maschine verdaut, anschließend das Enzym bei 65 °C in fünf Minuten inaktiviert. Während des Verdaus wird der Ligationsansatz, bestehend aus 0,5 µl OPA-Puffer (10x), jeweils 0,5 µl LIB1- und ddMse11-Oligonukleotid (beide 100 µM) und 1,5 µl Wasser, in der PCR-Maschine einem Temperaturgradienten zur Basenpaarung unterworfen (65 °C bis 15 °C für je eine Minute pro Temperaturschritt, Tabelle 3 9), wobei der doppelsträngige Oligonukleotid-Komplex (Adapter) gebildet wird. Der Ansatz wird zusammen mit 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) und 1 µl ATP (10 mM) zum Produkt des *MseI*-Verdaus gegeben (Endvolumen 10 µl) und über Nacht bei 15 °C ligiert. Bei diesem Schritt werden die hybridisierten Adapter an die gDNA-Fragmente ligiert. Nach der Ligation wird der Ansatz zur Primäramplifikation mit 3 µl Expand Long Template Puffer1, 2 µl dNTPs (10 mM), 34 µl Wasser und 1 µl Expand LongTemplate PolMix (5 U/µl) aufgefüllt. Das PCR-Produkt ist bei -20 °C stabil und dient als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen.

3.6 Amplifikation des Genoms

Das Genom wird bei dieser Methode der Genom-Amplifikation nach Klein et al. (1999) und Stoecklein et al. (2002) durch das Restriktionsenzym *MseI* in 150-1500 bp große Stücke geschnitten. An diese Fragmente werden Adapter ligiert, mit deren Hilfe alle Fragmente mit einem Primer amplifiziert werden können. Einzelzellen werden in 1 µl PBS isoliert und direkt zu dem Proteinase K Mix in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es folgt der enzymatische Verdau von Proteinen für zehn Stunden bei 42 °C gefolgt von zehn Minuten Inaktivierung bei 80 °C. Anschließend werden 0,2 µl One-Phor-All Puffer; 0,2 µl *MseI* und 1,6 µl PCR- Wasser zu der Probe. Nach drei Stunden Inkubationszeit bei 37 °C erfolgt die Inaktivierung für fünf Minuten bei 65 °C. Der Preannealing Mix wird in einem PCR Cyclyer von 65 °C in Schritten

von 1 °C/min auf 15 °C gekühlt, bei dem sich die beiden Primer Lib1 und ddMse11 zu dem doppelsträngigen Adapter zusammenfügen. 3 µl des Preannealing-Mixes werden mit 1 µl ATP und 1 µl T4- Ligase zu der verdauten Probe gegeben und über Nacht bei 15 °C inkubiert. Nach Zugabe des PCR Mix erfolgt die Amplifikation der MseI Fragmente.

Tabelle 3 4 Zusammensetzung des Master-Mix für den Proteinkinase K-Verdau.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 10 Proben [µl], Überstände	Reaktionsmenge für 10 Proben [µl], Einzelzelle
OPA plus Puffer	5,0	2,0
Tween 10 %	1,3	1,3
Igepal 10 %	1,3	1,3
Proteinkinase K (10 mg/ml)	2,6	2,6
PCR-Wasser	-	12,8
	1 µl/Tube	2 µl/Tube

Tabelle 3 5 PCR-Programm zum Proteinkinase K-Verdau.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:s)
1	42	15:00:00/10:00:00
2	80	00:10:00
3	4	Unendlich

Tabelle 3 6 Zusammensetzung des Master-Mix zum MseI-Verdau.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl], Überstände	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl], Einzelzelle
OPA Plus Puffer	-	0,2
MSE I (50.000 U/ml)	0,25	0,2
PCR-Wasser	0,25	1,6

Tabelle 3 7 PCR-Programm zum MseI-Verdau.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:s)
1	37	03:00:00
2	65	00:05:00
3	4	Unendlich

Tabelle 3 8 Zusammensetzung der Master-Mixe zum Preannealing und zur Ligation.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]	
OPA Plus Puffer	0,5	Preannealing
Lib1 100 µM	0,5	
ddMse11 100 µM	0,5	
PCR-Wasser	1,5	
ATP (10 mM)	1,0	Ligation
T4-Ligase	1,0	

Tabelle 3 9 PCR-Programme zum Preannealing und zur Ligation.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:s)	
1	65 bis 15	00:01:00	Preannealing
2	15	Unendlich	
3	15	16:00:00	Ligation

Tabelle 3 10 Zusammensetzung des Master-Mix zur gDNA-Amplifikation.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
BM Puffer 1	3,0
dNTPs (10 mM)	2,0
PolMix	1,0
PCR-Wasser	34,0

Tabelle 3 11 PCR-Programm zur gDNA-Amplifikation.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:s)	Zyklen
1	68	00:03:00	1
2	94	00:00:40	15
3	57	00:00:30	
4	68	00:01:30 + 00:00:01/Zyklus	
5	94	00:00:40	9
6	57 + 1/Zyklus	00:00:30	
7	68	00:01:45 + 00:00:01/Zyklus	
8	94	00:00:40	23
9	65	00:00:30	
10	68	00:01:53 + 00:00:01/Zyklus	
11	68	00:03:40	1
12	4	unendlich	

3.7 Qualitätskontrolle der Amplifikation von Transkriptom und Genom

Der Amplifikation von Transkript und Genom schließt sich eine Qualitätskontrolle in Form einer Endpunkt-PCR an. Es soll die Vollständigkeit der primären PCR und die Qualität der WTA- und WGA-Produkte geprüft werden, um zu entscheiden, welche Zellen sich für die weitere Verarbeitung eignen. Für die Qualitätskontrolle des Transkriptoms wird die Expression von verschiedenen „Housekeeping“-Genen (β -Actin (*ACTB*), EF1 α (*EEF1A1*), *GAPDH*) untersucht. Zur Qualitätssicherung des Genoms werden spezifische *MseI* Fragmente in den Loci von p53 (*TP53*), Pseudogen CK19 (*KRT19P1*), KRAS_91_bp und D5S2117, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden, überprüft. Zusätzlich werden eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Pro Ansatz wird 1 µl der Probe zu 9 µl des angesetzten Master-Mix (Tabelle 3 12, Tabelle 3 13) hinzugefügt und die Amplifikation entsprechend dem Programm in Tabelle 3 14 gestartet. In der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese

(Absatz 3.12) erfolgt die Auswertung so, dass eine weitere Analyse nur stattfindet, wenn in der WTA-QC spezifische Banden für mindestens einen Marker sichtbar sind, wenn in der WGA-QC spezifische Banden für mindestens drei Marker sichtbar sind sowie sich die Kontrollen des Pickfeldes, der WTA beziehungsweise WGA und der Kontroll-PCR als negativ erweisen.

Tabelle 3 12 Zusammensetzung des Master-Mix zur WTA-QC.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
10x FastStart PCR Puffer (mit 20 mM MgCl ₂)	1,0
Primer-Mix (8 µM pro Primer)	1,0
dNTPs (aus dem FastStart kit)	0,2
BSA (20 mg/ml)	0,2
FastStart Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1
PCR-Wasser	7,0

Tabelle 3 13 Zusammensetzung des Master-Mix zur WGA-QC.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
10x FastStart PCR Puffer (mit 20 mM MgCl ₂)	1,0
Primer-Mix (8 µM pro Primer)	1,0
dNTPs (aus dem FastStart kit)	0,2
BSA (20 mg/ml)	0,2
FastStart Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1
PCR-Wasser	6,5

Tabelle 3 14 PCR-Programm zur WTA-QC und WGA-QC.

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

3.8 Reamplifizierung und Qualitätskontrolle des Transkriptoms

Für die weitere Bearbeitung der Proben wird zunächst eine Reamplifizierung der primären WTA-Produkte angeschlossen. Dazu werden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß 49 µl des Mastermixes, entsprechend Tabelle 3 15 vorgelegt und 1 µl des Templates dazu gegeben. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren werden die Proben in den Thermocycler überführt und entsprechend dem Programm in Tabelle 3 16 reamplifiziert.

Das Produkt dieses Amplifizierungsschrittes wird erneut einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dazu werden erneut 9 µl des in der Tabelle 3 15 zu entnehmenden Mastermixes in ein

Reaktionsgefäß vorgelegt und 1 µl der mit PCR-Wasser 1:5 verdünnten Probe dazu gegeben. Ebenfalls werden eine Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt, wobei es sich bei der Negativkontrolle um 1 µl PCR-Wasser und bei der Positivkontrolle um 1 µl einer 1:100 verdünnten WTA-Mischung verschiedener Krebsentitäten handelte. Das verwendete PCR-Programm ist Tabelle 3 16 zu entnehmen.

Die Auswertung erfolgt durch die Agarose-Gelelektrophorese (Absatz 3.12). Eine weitere Verwendung der Proben erfolgt nur, wenn diese mindestens eine Bande aufweisen sowie bei gleichzeitiger Negativität der Pick-, Reagenzien- und Negativkontrolle.

Tabelle 3 15 Zusammensetzung des Master-Mix zur Reamplifikation des Transkriptoms.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Expand long Template Buffer 1	5,0
CP2 9 (24 µM)	6,0
dNTPs (10 mM)	1,75
Formamid (20 %)	7,5
Pol Mix (5 U/µl)	1,5
PCR-H2O	27,25

Tabelle 3 16 PCR-Programm zur Reamplifikation des Transkriptoms.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:sec)	Zyklen
1	95	00:01:00	1
2	94	00:00:15	5
3	55	00:01:00	
4	65	00:03:30	
5	94	00:00:15	3
6	55	00:01:00	
7	65	00:03:30 + 00:00:10/Zyklus	
8	65	00:07:00	1
9	4	Unendlich	

3.9 Aufreinigung und Konzentrationsmessung der WTA-Proben

Für weitere Down-stream-Anwendungen werden die Proben nach erfolgreicher Reamplifizierung und angemessener Qualitätskontrolle aufgereinigt. Dabei wird das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Änderungen am Herstellerprotokoll werden wie folgt vorgenommen: Zum verwendeten PV-Puffer wird kein pH-Indikator hinzugefügt. Des Weiteren wird die gereinigte cDNA anstelle des EB-Puffers mit PCR-Wasser vom Auffangröhrchen eluiert. Dabei werden 20 µl direkt auf den Filter der Säule pipettiert und nach fünfminütiger Inkubationszeit zwei Zentrifugationen mit 500 x g für 30 Sekunden und

17.900 x g für 60 Sekunden angeschlossen. Eine anschließende Konzentrationsmessung findet mit Hilfe des NanoDrop 2000c statt. Jeweils 1 µl der aufgereinigten Proben wird nacheinander auf das Gerät aufgetragen.

In Abhängigkeit von weiteren Bearbeitungsschritten werden die Proben hinsichtlich ihrer Konzentrationen mit PCR-Wasser verdünnt oder bei ihrer ursprünglichen Konzentration belassen.

3.10 Reamplifizierung und Qualitätskontrolle des Genoms

Für die weitere Bearbeitung der Proben wird zunächst eine Reamplifizierung der primären WGA-Produkte angeschlossen. Dazu werden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß 49 µl des Mastermixes entsprechend Tabelle 3 17 vorgelegt und 1 µl des Templates dazu gegeben. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren werden die Proben in den Thermocycler überführt und entsprechend dem Programm in Tabelle 3 18 reamplifiziert.

Das Produkt dieses Amplifizierungsschrittes wird erneut einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dazu werden erneut 9 µl des in der Tabelle 3 17 zu entnehmenden Mastermixes in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 1 µl der Probe dazu gegeben. Zusätzlich werden eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt und die Amplifikation entsprechend dem Programm in Tabelle 3 18 gestartet. In der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (Absatz 3.12) erfolgt die Auswertung so, dass eine weitere Analyse nur stattfindet, wenn spezifische Banden für mindesten drei Marker sichtbar sind und sich die Kontrollen des Pickfeldes, der WGA und der Kontroll-PCR als negativ erweisen.

Tabelle 3 17 Zusammensetzung des Master-Mix zur Reamplifikation des Genoms.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Expand long template Buffer 1	5,0
Lib1 (10 µM)	5,0
dNTP (10 mM)	1,75
BSA	1,25
Pol Mix (5 U/µl)	0,5
PCR-H2O	35,5

Tabelle 3 18 PCR-Programm zur Reamplifikation des Genoms.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (h:min:sec)	Zyklus
1	94	00:01:00	1
2	60	00:00:30	1
3	68	00:02:00	1
4	94	00:00:30	11
5	60	00:00:30	
6	68	00:02:00 + 00:00:20/Zyklus	
7	4	Unendlich	

3.11 qPCR und Primeretablierung

Die quantitative-Echtzeit-PCR dient zur Vervielfältigung der Nukleinsäuren und gleichzeitig zur quantitativen Messung der gewonnenen DNA. Dabei wird ein Fluoreszenz-Farbstoff eingesetzt, der in Echtzeit gemessen wird und proportional zur Menge der DNA ansteigt. Dabei gibt der sogenannte Ct- oder Cp-Wert an, ab welchem Zyklus das Farbstoff-Signal erstmals über das Signal des Hintergrundrauschens ansteigt und damit verlässlich der gewünschte DNA-Abschnitt detektiert wird. Um die gewünschte DNA zu messen, muss zunächst der passende Primer dafür entworfen werden.

3.11.1 Primeretablierung

Vor der Primeretablierung steht zunächst das Primerdesign. Passende Primersequenzen werden mittels des NCBI PrimerBlast online tools ausgewählt und über Eurofins German bestellt. Die gewünschte Sequenz ID für das Transkript kann in der Nucleotid-Database gefunden werden und im Primer-Blast tool verwendet werden. Es muss darauf geachtet werden die Produktlänge auf 80 bp bis 200 bp festzulegen. Des Weiteren sollte das Primerpaar wenn möglich eine Exon-Exon Grenze umfassen, um das Amplifizieren von kontaminierender DNA möglichst gering zu halten. Das Primerpaar sollte weiterhin nah an einem polyadenylierten 3'Ende der mRNA binden, da dort die WTA bevorzugt amplifiziert. Möglichst viele Isoformen sollten detektiert werden. Um die Selbstkomplementarität möglichst gering zu halten, werden nur Paare mit Werten unter fünf ausgewählt.

Die gelieferten Primer werden zunächst für die Lagerung auf 100 µM und für die Anwendung auf 8 µM verdünnt.

Die Primeretablierung umfasst drei Schritte. Im ersten Schritt soll für ein geeignetes Primerpaar die optimale Annealingtemperatur bestimmt werden. Dafür wird mit einer 96-well-Platte eine Gradienten-PCR durchgeführt und für jedes Primerpaar ein Mastermix angesetzt und

zusammen mit einem 1:100 verdünnten DNA-Template bei 55 °C - 66 °C eine PCR durchgeführt. Das Template ist eine Mischung aus WTA-Produkten verschiedener Zelllinien verschiedener Krebs-Entitäten, weshalb das Beinhalt der gewünschten Zielsequenzen sehr wahrscheinlich ist. Es werden auf 9,5 µl Mastermix 0,5 µl DNA-Template hinzugefügt und das PCR-Programm gestartet. Die Auswertung erfolgt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 % Agarose Gel. Das Primerpaar mit der stärksten Bande bei entsprechender Temperatur wird gewählt, Primer mit keinen oder Doppelbanden (unspezifische Produkte amplifiziert) ausgeschlossen. In der Gradienten-PCR konnten bei allen getesteten Primerpaaren positive Ergebnisse verzeichnet werden. Die Auswahl der optimalen Annealingtemperatur pro Primerpaar erfolgte durch die Beurteilung der Bandenintensitäten auf dem Gelbild. Für alle Primer wurde eine Temperatur von 58 °C als optimal angesehen. Im zweiten Schritt folgt die Standardkurven-PCR, in welcher die Effizienz und Sensitivität des Primerpaars bei gefundener Annealingtemperatur bestimmt werden sollte. Dazu wird wieder von der Referenz-DNA eine Verdünnungsreihe angesetzt, welche Konzentrationen von 50 ng bis 0,00005 ng in $\log_{10}$ Schritten beinhaltet und zu 2,5 µl der jeweiligen Verdünnungen 7,5 µl Mastermix hinzugegeben. Dabei sollte das Licht unter der PCR-Bench ausgeschaltet sein, weil der verwendete Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist. Im Lightcycler 480 wird die Messung vorgenommen und mittels der erhaltenen Cp-Werte Mittelwerte, Standardabweichung und Varianz berechnet. Bei der Auswertung werden die Mittelwerte der Cp-Werte der Triplikate berechnet (bei groben Ausreißern kann einer der drei Werte ausgelassen werden) und gegen $\log_{10}$ (Verdünnungsfaktor) in einem Diagramm aufgetragen. Es wird im Folgenden darauf geachtet, dass die Gerade eine Steigung von 3,3 und eine Korrelation von $R^2 > 0,99$ aufweist. Die Effizienz: $\text{Effizienz (\%)} = (1/(10 \times \text{Steigung}) - 1) \times 100$ des Primerpaares sollte bei 90-110 % über mindestens 4 log-Stufen liegen. Der Cp-Wert der Negativkontrolle sollte >30 sein und in der Schmelzkurve keine unspezifischen Peaks vorkommen. Es wurden für den letzten Etablierungsschritt jeweils zwei Primerpaare für jedes Gen ausgewählt, welche mit ihren zugehörigen Werten in Tabelle 3 19 dargestellt sind.

Tabelle 3 19 Ergebnisse der Standardkurven-PCR zur Etablierung der Primer für CD27 und CD319.

CD27	Effizienz	Korrelation	Steigung	Cp-Wert
Primerpaar 1	0,89	0,99	3,2	23,6
Primerpaar 2	0,99	0,98	3,1	23,8
CD319	Effizienz	Korrelation	Steigung	Cp-Wert
Primerpaar 1	0,94	0,88	3,5	24,9
Primerpaar 2	0,89	0,99	3,2	25,0

Im letzten Schritt erfolgt der Restriktionsverdau, um zu sehen, ob Primerpaare auch die gewünschte Sequenz binden. Dazu wird das PCR-Produkt mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Enzyme werden durch Überprüfung der bekannten Amplikonsequenz mit NEBcutter2, Webcutter 2.0 und Restriction Mapper Version 3 ausgewählt. Für jedes Primerpaar werden drei separate Reaktionen vorbereitet, eine ohne Enzym als Kontrolle, ein Verdau und eine Negativkontrolle. Nach Verteilung des Mastermixes auf die Reaktionsgefäße werden dem Mastermix, der das PCR-Amplikon enthält, 2 µl PCR-Wasser oder das jeweilige Enzym zugesetzt. Der Verdau erfolgt durch Inkubation der Reaktion bei der jeweils optimalen Temperatur jedes Enzyms (37 °C in den meisten Fällen) für drei Stunden, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C oder 80 °C für 20 Minuten, je nach Enzym. Danach wird die verdaute DNA durch Gelelektrophorese analysiert, mit dem Unterschied, dass die Leiter mit niedrigem Molekulargewicht (LMW) anstelle der 1 kb-DNA-Leiter geladen wurde, um eine bessere Auflösung zu erzielen. Wenn die verdauten Fragmente den erwarteten Größen für beide Enzyme entsprechen, werden die Primer als gültig betrachtet und für weitere Experimente verwendet. Zugehörige Restriktionsenzyme und Fragmentlängen sind in Tabelle 3 20 zu finden.

Tabelle 3 20 Verwendete Primerpaare mit zugehörigen Sequenzen sowie verwendeten Restriktionsenzymen und Reaktionsbedingungen.

Gen	Primersequenz 5'→3'	Amplikongröße	Enzym	Restriktionsstellen	Puffer	Verdau-Variablen
CD27, PP1	TCAGCAACT GGGCACAGA AA	180 bp	HaeIII	50 bp	Cut Smart	37°C Inkubation 80°C Inaktivierung
CD27, PP2	ATCAGCAAC TGGGCACAG AA	191 bp	HaeIII	51 bp	Cut Smart	37°C Inkubation 80°C Inaktivierung
CD319, PP1	GCTCACAGA GCACCTGTCA A	134 bp	StyI	33 bp	NEB Buffer	37°C Inkubation 65°C Inaktivierung
CD319, PP2	GCTCACAGA GCACCTGTCA A	111 bp	Hpy188I	78 bp	NEB Buffer	37°C Inkubation 65°C Inaktivierung

Basierend auf den Gelbildern, wurde für jedes Gen ein finales Primerpaar gewählt, welches zukünftig bei 58 °C Annealingtemperatur arbeiten würde. In Tabelle 3 21 sind die final verwendeten Primerpaare mit ihren zugehörigen Cp-Werten und Annealingtemperaturen dargestellt.

Tabelle 3 21 Final verwendete Primerpaare mit zugehörigen Cp-Werten und Annealingtemperaturen.

CD27	Effizienz	Korrelation	Cp-Wert	Annealingtemp. in °C
Primerpaar CD27	0,89	0,99	23,6	58
CD319	Effizienz	Korrelation	Cp-Wert	Annealingtemp. in °C
Primerpaar CD319	0,89	0,99	25,0	58

Tabelle 3 22 Zusammensetzung des Master-Mix zur Gradienten-PCR.

Reagenz	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
FastStart PCR Puffer (+MgCl₂)	1,0
Fwd Primer	0,5
Rev Primer	0,5
FastStart dNTP Mix	0,2
BSA	0,2
PCR Wasser	7,0
FastStart Tag Polymerase	0,1

Tabelle 3 23 PCR-Programm zur Gradienten-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (h:min:sec)	Zyklen
1	94	00:02:00	1
2	55-66	00:00:30	
3	72	00:02:00	
4	94	00:00:40	11
5	55-66	00:00:30	
6	72	00:00:20	
7	94	00:00:40	28
8	55-66	00:00:30	
9	72	00:00:30	
10	94	00:00:40	1
11	55-66	00:00:30	
12	72	07:00:00	
13	4	Unendlich	1

Tabelle 3 24 Zusammensetzung des Master-Mix zur Standardkurven-PCR.

Reagenz	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Sybr Green Mix	5,0
Fwd Primer	0,5
Rev Primer	0,5
PCR Wasser	1,5

Tabelle 3 25 Übersicht der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve.

	Verdünnungsreihe
A	20 ng/µl = 50 ng
B	2 ng/µl = 5 ng
C	0,2 ng/µl = 0,5 ng
D	0,02 ng/µl = 0,05 ng
E	0,002 ng/µl = 0,005 ng
F	0,0002 ng/µl = 0,0005 ng
G	0,00002 ng/µl = 0,00005 ng
H	Negativkontrolle

Tabelle 3 26 Zusammensetzung der Master-Mixe zum Restriktionsverdau.

Reagenzien	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl] - verdaut	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl] - nicht verdaut
Buffer	3,0	3,0
BSA	0,3	0,3
H2O	10,0	12,0
PCR-Produkt	15,0	15,0
Restriktionsenzym	2,0	0,0

Tabelle 3 27 PCR-Programm zum Restriktionsverdau.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (h:min:sec)	Zyklen
1	95	00:06:00	1
2	95	00:00:30	45
3	58	00:00:30	
4	72	00:00:30	1
5	72	00:02:00	1

3.11.2 qPCR

Mit Hilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) können bestimmte Transkripte der cDNA amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert werden. Verwendet wird hierfür der LightCycler 480. Die reamplifizierten Proben werden zunächst mit PCR-Wasser verdünnt, sodass sich eine Konzentration von 1 ng/µl ergab. Da der SYBR Green Farbstoff lichtempfindlich ist, finden die folgenden Schritte bei abgeschalteter PCR-Bench-Beleuchtung statt. Ein Master-Mix entsprechend der Tabelle 3 28 wird angesetzt, wobei berücksichtigt werden muss, dass jede Probe in Triplikaten angesetzt werden sollte. Anschließend werden 7,5 µl des Master-Mixes in jedes Well der Platte gegeben, gefolgt von je 2,5 µl der Proben in Triplikaten. Auch von der Positivkontrolle (eine pro Master-Mix und Platte) und Negativkontrolle (eine pro Master-Mix und Platte) werden 2,5 µl in Triplikaten hinzugefügt. Die verschlossene Platte wird dann im LightCycler dem Programm der Tabelle 3 29 unterzogen.

In der LightCycler Software werden im Folgenden die Schmelzkurven und Cp-Werte der Proben mit denen der Positiv- und Negativkontrolle verglichen. Proben, deren Cp-Wert kleiner oder gleich der Negativkontrolle sind, werden als negativ gewertet. Bei Proben, deren Cp-Wert über der Negativkontrolle liegt, werden die Schmelzkurven betrachtet. Weicht die Kurve der Probe von der der Positivkontrolle ab, wird sie als negativ erachtet und ihr der Schnittpunkt-Wert (Crossing point, Cp) von 35 zugeteilt, um weitere Downstream-Analysen zu ermöglichen. Folgt die Schmelzkurve bei entsprechendem Cp-Wert der Positivkontrolle, wird die Probe als positiv gewertet. Die Cp-Werte werden anhand der second-derivative-maximum-Methode der LightCycler Software ermittelt und anschließend in Microsoft Excel ausgewertet. Bei uneindeutigen Kurven wird ein Restriktionsverdau für das jeweilige qPCR -Produkt mit dem jeweiligen Enzym durchgeführt. Findet eine Messung des gleichen Gens auf mehreren Platten statt, werden zunächst die Cp-Werte normalisiert, weshalb in diesem Fall auf jeder Platte das gleiche Aliquot einer Positivkontrolle verwendet werden sollte. Die sich anschließenden Analysen werden mit den normalisierten Cp-Werten durchgeführt.

Tabelle 3 28 Zusammensetzung des Master-Mix zur qPCR.

Reagenz	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Sybr Green Mix (BioRad)	5,0
Fwd Primer (8 µM)	0,5
Rev Primer (8 µM)	0,5
PCR-H2O	1,5

Tabelle 3 29 qPCR-Programm im Light Cycler und zur Erstellung der Standardkurve.

Schritt qPCR	Temp. (°C)	Dauer (h:min:sec)	Heizgeschwindigkeit (°C/s)	Erfassungsmodus	Messungen (pro °C)	Zyklen
Prä-Inkubation	95	00:05:00	4.4	Keiner	0	1
Amplifikation	95	00:00:20	4.4	Keiner	0	40
	58/56	00:00:15	2.2	Keiner	0	
	72	00:00:15	4.4	Single	0	
Schmelzkurve	95	00:00:05	4.4	Keiner	0	1
	55	00:01:00	2.2	Keiner	0	
	95	00:00:00	0.11	laufend	5	
Kühlen	40	00:00:30	2.2	Keiner	0	1

3.12 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese dient der Größen-Auftrennung der Nukleinsäuren im PCR-Produkt und dem Vergleich zu Nukleinsäuren bekannter Größe, um den Erfolg einer Amplifikation zu validieren. Zur Herstellung des Gels werden 1,5 g 1,5-prozentiger Agarose bzw. für 3-prozentiges Gel 3 g mit 100 ml 1xTBE-Puffer aufgefüllt und unter Erhitzen aufgelöst. Die Gellösung wird anschließend in einen entsprechenden Erlenmeyerkolben umgefüllt und mit 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in den Gelträger gegossen. Der Träger wird anschließend so in die Elektrophoresekammer gelegt, dass das Gel vollständig mit einem 1xTBE-Puffer bedeckt ist. Die Kammern können nun gefüllt werden. In die erste und die letzte Kammer werden 8 µl des 1 kb Längenstandards pipettiert. 10 µl der Probe werden mit 3 µl des Gelladepuffers vermischt und 11 µl des Gemisches in die Ladetasche aufgetragen. Das PCR-Produkt wird nun bei 160 Volt und 400 mA aufgetrennt, WGA-Produkte 45 Minuten, WTA-Produkte 60 Minuten. Die Visualisierung erfolgt am UV-Schirm, digitale Aufnahmen werden angefertigt.

3.13 LowPass-Sequenzierung der genomischen DNA

Zu Beginn steht die Aufreinigung des WGA-Produktes. 5 µl des WGA-Produktes werden in ein neues 0,2 ml Tube gegeben und mit 5 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. 18 µl der resuspendierten SPRI beads werden hinzugefügt und fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Auf einer magnetischen Platte werden die Beads mit dem WGA-Produkt selektiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach Waschen mit 200 µl 80-prozentigem Ethanol wird dieser Schritt drei Mal wiederholt. Das restliche Ethanol wird anschließend abgenommen und das Pellet getrocknet. Mit 22 µl Nuklease freiem Wasser wird das WGA-Produkt von den Beads getrennt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Erneut wird die Probe in eine magnetische Säule gelegt und nach fünf Minuten 20 µl des Überstandes, welcher das WGA-Produkt enthält, in ein neues PCR-Tube überführt. Für eine längere Lagerung werden diese bei -15 °C bis -25 °C eingefroren.

Im nächsten Schritt folgt die First Extension (FE). Dazu werden alle Komponenten des Ampli1Kits, wie in Tabelle 3 30 angegeben, zu einem Master-Mix zusammengeführt. 9 µl des FE-Mastermix werden in ein neues Tube gegeben. Dazu kommen 3 µl vom Ampli1 D7xx und 3 µl des gereinigten WGA-Produktes. Es folgt das FE-Programm im Thermocycler (Tabelle 3 31).

Es folgt die Second Extension (SE). Dazu wird wieder ein Master-Mix erstellt (Tabelle 3 32). 22,5 µl der resuspendierten SPRI beads werden zum FE-Produkt gegeben und bei RT fünf Minuten inkubiert. Danach werden die Proben in eine magnetische Platte gegeben und nach fünf Minuten der Überstand vorsichtig entnommen und verworfen. Dieser Schritt wird nach dem Waschen mit 200 µl 80-prozentigem Ethanol drei Mal wiederholt. Das Ethanol wird vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Mit der anschließenden Zugabe von 12 µl des vorbereiteten SE-Master-Mix wird das FE-Produkt von den Beads getrennt. Zusätzlich werden 3 µl vom Ampli1 D5xx hinzugefügt und bei RT fünf Minuten inkubiert. Im Thermocycler wird das SE-Programm gestartet (Tabelle 3 31).

Für den folgenden Library Amplifikation (LA) Schritt wird wieder ein Master-Mix gemäß Tabelle 3 33 vorbereitet.

22,5 µl der PEG NaCL-Lösung werden zu den SE-Produkten gegeben und bei RT fünf Minuten inkubiert. Nach magnetischer Separation wird der Überstand entnommen. Das Produkt wird mit 200 µl 80-prozentigem Ethanol gewaschen und erneut separiert. Dieser Schritt wird noch zwei Mal wiederholt. Der letzte Rest Ethanol wird entnommen und das Pellet getrocknet. Mit

15 µl des LA-Mastermix werden die SE-Produkte von den Beads getrennt und das Produkt durchläuft im Thermocycler das LA-Programm (Tabelle 3 34).

Der nächste Schritt beinhaltet das Waschen des Library Produktes. Der vorher beschriebene Wasch- und Separationsschritt wird wiederholt, bis das Pellet trocknet. Mit 17 µl LowTE wird das Library-Produkt von den Beads getrennt und bei RT zwei Minuten inkubiert. Nach erneuten fünf Minuten an der Magnetsäule werden die Beads selektiert und 15 µl des Überstandes mit dem Library Produkt in ein neues PCR- Tube überführt.

2 µl des Produktes werden nun mittels Qubit Fluorometer und Qubit dsDNA HS Essay Kit analysiert. Zur Überprüfung der Library Qualität werden 1 µl des Produktes auf den Agilent DNA-Chip gegeben und die Analyse nach den Angaben des Herstellers gestartet. Durch die Messung mit Hilfe des Bioanalyzer 2100 kann anhand des resultierenden Fragmentlängenprofils die Qualität der Sequenzier-Library eruiert werden (Absatz 3.14).

Tabelle 3 30 Zusammensetzung des Master-Mix zur First Extension.

Reagenz	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Ampli1 PCR Wasser	9,5
Ampli1 PCR Puffer	1,5
Ampli1 PCR dNTPs	0,51
Ampli1 PCR BSA	0,37
Ampli1 PCR Taq Polymerase	0,12

Tabelle 3 31 PCR-Programm zur First Extension und zur Second Extension.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (h:min:sec)	Zyklus
1	95	00:04:00	1
2	95	00:00:30	1
3	62	00:00:30	
4	72	00:03:00	
5	10	Unendlich	1

Tabelle 3 32 Zusammensetzung des Master-Mix zur Second Extension.

Reagenz	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Ampli1 PCR Wasser	6,5
Ampli1 PCR Puffer	1,5
Ampli1 PCR dNTPs	0,51
Ampli1 PCR BSA	0,37
Ampli1 PCR Taq Polymerase	0,12

Tabelle 3 33 Zusammensetzung des Master-Mix zur Library Amplifikation.

Reagenz	Reaktionsmenge für 1 Reaktion [µl]
Ampli 1 PCR Wasser	10,5
Ampli 1 PCR Puffer	1,5
Ampli 1 P5 primer	1,0
Ampli 1 P7 primer	1,0
Ampli 1 PCR dNTPs	0,51
Ampli 1 PCR BSA	0,37
Ampli 1 PCR Taq Polymerase	0,12

Tabelle 3 34 PCR-Programm zur Library Amplifikation.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (h:min:sec)	Zyklus
1	95	00:04:00	1
2	95	00:00:30	1
3	60	00:00:30	
4	72	00:02:00	
5	95	00:00:30	12
6	60	00:00:30	
7	72	00:02:00 + 00:00:20/Zyklus	
8	72	00:07:00	1
9	10	Unendlich	1

3.14 CNA-Profilung der genomischen DNA

Die Libraries werden in äquimolaren Konzentrationen gepoolt, um einen 4-nM-Pool zu erhalten. Vor der Sequenzierung werden 5 µl des Pools durch Zugabe von 5 µl 0,2 M Natriumhydroxid und Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für fünf Minuten denaturiert. Anschließend werden die 10 µl der denaturierten Bibliothek zu 990 µl kaltem HT1-Puffer hinzugefügt. Das MiSeq-Gerät wird gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet. Die Ampli1™ LowPass-Bibliotheken werden im Single-End-Modus auf einem MiSeq-Gerät unter Verwendung des MiSeq Reagent Kit v3 (150 Zyklen) und des mit dem Ampli1™ LowPass-Kit für Illumina®-Plattformen gelieferten benutzerdefinierten Sequenzierungsprimers sequenziert, der in kaltem HT1-Puffer verdünnt wird (5 µl Primer und 595 µl Puffer). Schließlich werden 600 µl des Probenpools und 600 µl des verdünnten Primers auf die MiSeq-Reagenzienkartusche geladen.

Die Open-Source-Software Control-FREEC (Control-Free Copy number caller) wird verwendet, um Copy-Number-Calls zu erhalten. Die in der Analyse erhaltenen CNA-Profile werden als Streudiagramme dargestellt, in denen rot genomische Gewinne und blau genomische Verluste dargestellt sind. Die Qualitätskontrolle der erhaltenen CNV-Profile

erfolgte mittels Beurteilung der Standardabweichung $\sigma\Delta^*$. Ein Wert von $\sigma\Delta^* < 0,2$ wurde als gute Qualität gewertet, ein Wert $\sigma\Delta^* > 0,2$ als ungenügende Qualität.

Weiterhin konnten nur Zellen in weiteren Auswertungen berücksichtigt werden, welche mindestens 100.000 Reads aufwiesen. Des Weiteren beruhte die bioinformatische Auswertung darauf, das Genom in sogenannte *bins* von 500 Kilobasen (kb) zu unterteilen. Eine Aberration musste dabei mindestens 25 *bins* umfassen, um die Probe als aberrant zu werten. Die beiden gonosomalen Chromosomen X und Y wurden aufgrund von meist schlechterer Qualität und Coverage und den unterschiedlichen Geschlechtern der Patienten teilweise ausgeschlossen.

3.15 Qualitätskontrolle und Konzentrationsmessung der Proben

3.15.1 Messung mit Qubit

Die Konzentrationsmessung der Proben am Qubit 3.0 Fluorometer erfolgt nach der Herstelleranleitung. Das passende Kit wird dafür anhand der erwarteten Konzentrationsmengen ausgewählt. Zur Verfügung stehen das High Sensitivity Kit mit Mengenbereichen von 2-100 ng/μl sowie das Broad Range Kit 2-1000 ng/μl. Die Komponenten des Kits werden auf Raumtemperatur erwärmt und das Licht ausgeschaltet, da der verwendete Farbstoff lichtempfindlich ist. Zunächst wird aus den Komponenten des Kits eine Arbeitslösung hergestellt, wofür pro Probe 1 μl Qubit Reagens DMSO und 199 μl Qubit Puffer gemischt wird. 198 μl dieser Arbeitslösung werden dann in ein 0,5 ml Tube vorgelegt und 2 μl der Probe hinzugegeben. Zur Kalibrierung am Fluorometer dienen die zwei Standards eines Kits, wobei 10 μl dieser beiden Standards mit 190 μl Arbeitslösung gemischt werden. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit werden die Proben am Fluorometer gemessen.

3.15.2 Messung am Bioanalyzer

Für die Messung mit dem Bioanalyzer 2100 kann das Bioanalyzer DNA High Sensitivity Kit verwendet werden. Anhand der erhaltenen Fragmentlängen kann die Qualität einer Sequenzier-Library beurteilt werden. Die bereits auf 1,8 ng/μl verdünnten Proben werden wie in der Herstelleranleitung beschrieben verarbeitet. Die Analyse erfolgt durch eine Schmier-Analyse der 2100 Expert Software, wobei die untere Grenze bei 200 bp und die obere bei 2000 bp festgelegt wird.

3.16 Verwendete Standardprotokolle

3.16.1 Zellkultur

Die Brustkrebs-Zelllinien werden in einer T75-Kulturflasche mit 13 ml Medium im Inkubator bei 37 °C und 5,5 % CO₂ aufbewahrt. Zwei- bis dreimal die Woche werden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet und bei einer Konfluenz von 90-95 % gesplittet. Dazu wird das alte Medium mit einer serologischen Pipette abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS kurz gewaschen. Nach einer Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA folgt eine Inkubation von drei Minuten bei 37 °C. Nach dieser Zeit wird das Trypsin mit 10 ml Medium inkubiert und die Zellsuspension in ein 50 ml Tube überführt und abzentrifugiert (fünf Minuten, 500 x g). Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in 10 ml Medium resuspendiert. Die gewünschte Verdünnung wird in eine neue T75-Kulturflasche überführt und mit Medium auf 13 ml aufgefüllt.

Die verwendeten Zellkulturen und Medien enthält Tabelle 2 8.

3.17 Statistische Tests und Bioinformatik

3.17.1 Statistische Test

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

1. Bei der Testung zweier binärer Variablen mit kleinem Stichprobenumfang wurde der zweiseitig Fisher's exact test mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. Dieser fand bei der Auswertung der qPCR-Ergebnisse Anwendung.
2. Bei dem Vergleich von gepaarten Daten einer Probe desselben Patienten vor und nach der Depletion wurde der nicht-parametrische Wilcoxon matched pairs signed rank Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt.
3. Bei der Testung einer kontinuierlichen und einer binären Variable wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. Dies fand bei der Auswertung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse und dem Vergleich zwischen Krebspatientinnen und Kontrollpatienten Anwendung.

3.17.2 Bioinformatik

Die folgenden bioinformatischen Analysen wurden durch Dr. Huiqin Koerke-Qu durchgeführt. Es erfolgten bioinformatische Analysen der RNA-Sequenzierungsdaten von NCCs und DCCs, um diese zum einen mit Hilfe von Markern unterscheiden zu können. Weiterhin wurden Kluster von Zellgruppen entsprechend ihrer Expressionsdaten detektiert und analysiert.

Für die Analysen in Absatz 8.3 sind die technischen Daten sowie Qualitätsanalyse dieser RNA-Sequenzierung der Arbeit von C. Irlbeck zu entnehmen (Irlbeck 2019).

Die Auswertung der Sequenzierung sowie Auswahl der Marker Kandidaten CD27 und CD319 sind der Arbeit von A. Damböck zu entnehmen (Damböck, A., 2022).

Für die Analysen in Absatz 8.3 sind die technischen Daten sowie Auswertungen der Arbeit von M. Werner-Klein zu entnehmen (Werner-Klein, M., 2020).

4. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, wie in 1.3 beschrieben, EpCAM⁺ Nicht-Krebszellen (Non Cancer Cells, NCC) von EpCAM⁺ disseminierte Krebszellen (Disseminated Cancer Cells, DCC) zu unterscheiden. Dazu wurden über einen Zeitraum von Juni 2020 bis April 2021 insgesamt 39 Knochenmarkproben (KMP) verwendet. Bei den KMP handelte es sich bei sechs Patienten um gesunde Spender, bei welchen Knochenmark bei einer Hüft-Tep-OP gewonnen wurde, zwei davon weiblich, vier Patienten männlich. Als gesunder Spender und damit Kontrollpatient (KP) in der vorliegenden Arbeit wurden Patienten gewertet, welche kein Krebsleiden in der Vorgeschichte sowie aktuell aufwiesen. Bei den Brustkrebsproben handelte es sich um 33 Patientinnen im M0-Stadium (M0-Spenderinnen). Diese Proben wurden aufgearbeitet, depletiert und zunächst mit EpCAM-PE und CD27/CD319-AF647 für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt. In der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 1) EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen, 2) EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und 3) EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen isoliert. Anschließend wurden diese Zellen mittels quantitativer Polymerasenkettenreaktion (qPCR) auf das Vorkommen der Gene *EpCAM*, *CD27* und *CD319* Gene auf Transkriptomebene untersucht. Im weiteren Verlauf sollte zudem das Vorhandensein der in Vorarbeiten des Lehrstuhls etablierten DCC-Signaturgene *AHSP* und *CAI* sowie der NCC-Gene *AHNAK* und *JUN* geprüft werden (Irlbeck, C., 2019, Patwary, N., in Bearbeitung). Ob eine Unterscheidung zwischen EpCAM⁺ DCCs und EpCAM⁺ NCCs auf Proteinebene mittels CD27/319 gelingen kann, sollte abschließend anhand einer Kopiezahlanalyse mittels LowPass Genomsequenzierung untersucht werden. Tumorzellen sollten demnach Mutationen und Genomaberrationen tragen, während gesunde Zellen eher ein balanciertes Genom aufweisen sollten. Einen Überblick über das gesamte Kollektiv zeigt Tabelle 3 35.

Tabelle 3 35 Überblick über das in der Studie eingeschlossene Kollektiv mit den zugehörigen klinischen Daten.

		Patientinnen M0-Stadium	gesunde Spender
Geschlecht	weiblich	33 (100,0 %)	2 (25,0 %)
	männlich	0 (0,0 %)	4 (75,0 %)
Durchschnittsalter (Jahre)		48,7	70,5
Ausdehnung Primärtumor	T1	5 (15,1 %)	NA
	T2	18 (54,5 %)	NA
	T3	6 (18,2 %)	NA
	T4	1 (3,0 %)	NA
	nicht bekannt	3 (9,1 %)	NA
Nodalstatus	N0	10 (30,3 %)	NA
	N1-3	20 (60,6 %)	NA
	nicht bekannt	3 (9,1 %)	NA
Fernmetastasen	M0	33 (100,0 %)	NA
	M1	0 (0,0 %)	NA
	nicht bekannt	0 (0,0 %)	NA
Differenzierungsgrad	G1	0 (0,0 %)	NA
	G2	14 (42,4 %)	NA
	G3	12 (36,4 %)	NA
	nicht bekannt	7 (21,2 %)	NA
Zeitpunkt der Punktion	vor Therapie	25 (75,8 %)	NA
	nach begonnener Therapie	8 (24,2 %)	NA

4.1 Identifizierung von echten disseminierten Krebszellen mittels EpCAM, CD27/319 Immunfluoreszenzfärbung

4.1.1 Anwendung der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung auf Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollpatienten

Wie in 3.2 und 3.3 beschrieben, wurden die Patientenproben nach einer Depletion mit Antikörpern gegen CD33 (myeloische Zellen), CD11b (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen), Glycophorin A (Erythrozyten) und CD45 (Leukozyten) mit EpCAM-PE und CD27/CD319-AF647 gefärbt. Dabei wurden die Knochenmarkproben (KMP) hinsichtlich EpCAM⁺ Zellen gescreent und ihr Phänotyp dann unter Hinzunahme der Immunmarker beurteilt. Dabei ergaben sich drei mögliche Gruppen:

1) EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen, 2) EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und 3) EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen.

4.1.1.1 Einfluss der Depletion auf die Zusammensetzung der Knochenmarkproben

Vor der Immunfluoreszenzfärbung sollten spezifische Zellpopulationen aus einer heterogenen Suspension mittels immunmagnetischer Depletion abgetrennt und so der Anteil der DCCs erhöht werden. In vorliegender Arbeit sollte der Einfluss dieses Depletionsvorgangs auf die Zusammensetzung der Knochenmarkproben untersucht werden. Dazu erfolgte die Auswertung der Depletion hinsichtlich Erythrozyten und mononuklearer Zellen (MNZ) in den 33 M0- und sechs depletierten Kontrollpatienten (Abbildung 3). Dabei wurden die Werte mit der manuellen Zellzählung ermittelt. Bei M0- sowie Kontrollpatienten konnten Erythrozyten und MNZ signifikant durch die Depletion reduziert werden (M0: $p < 0,0001$, KP: $p = 0,03$). Die Gesamtzahl der MNZ bei Krebspatienten sank um durchschnittlich 93 % und bei Kontrollpatienten um 94 %. Die Anzahl der Erythrozyten wurden bei Krebspatienten signifikant im Durchschnitt um 97 % verringert, bei Kontrollpatienten um 99 %. Diese Ergebnisse konnten bereits in Vorarbeiten des Labors gezeigt werden (Damböck, A., 2022). Somit konnten ungewünschte Zellpopulationen signifikant depletiert und die Zellen anschließenden für die Immunfluoreszenzfärbung bereitgestellt werden.

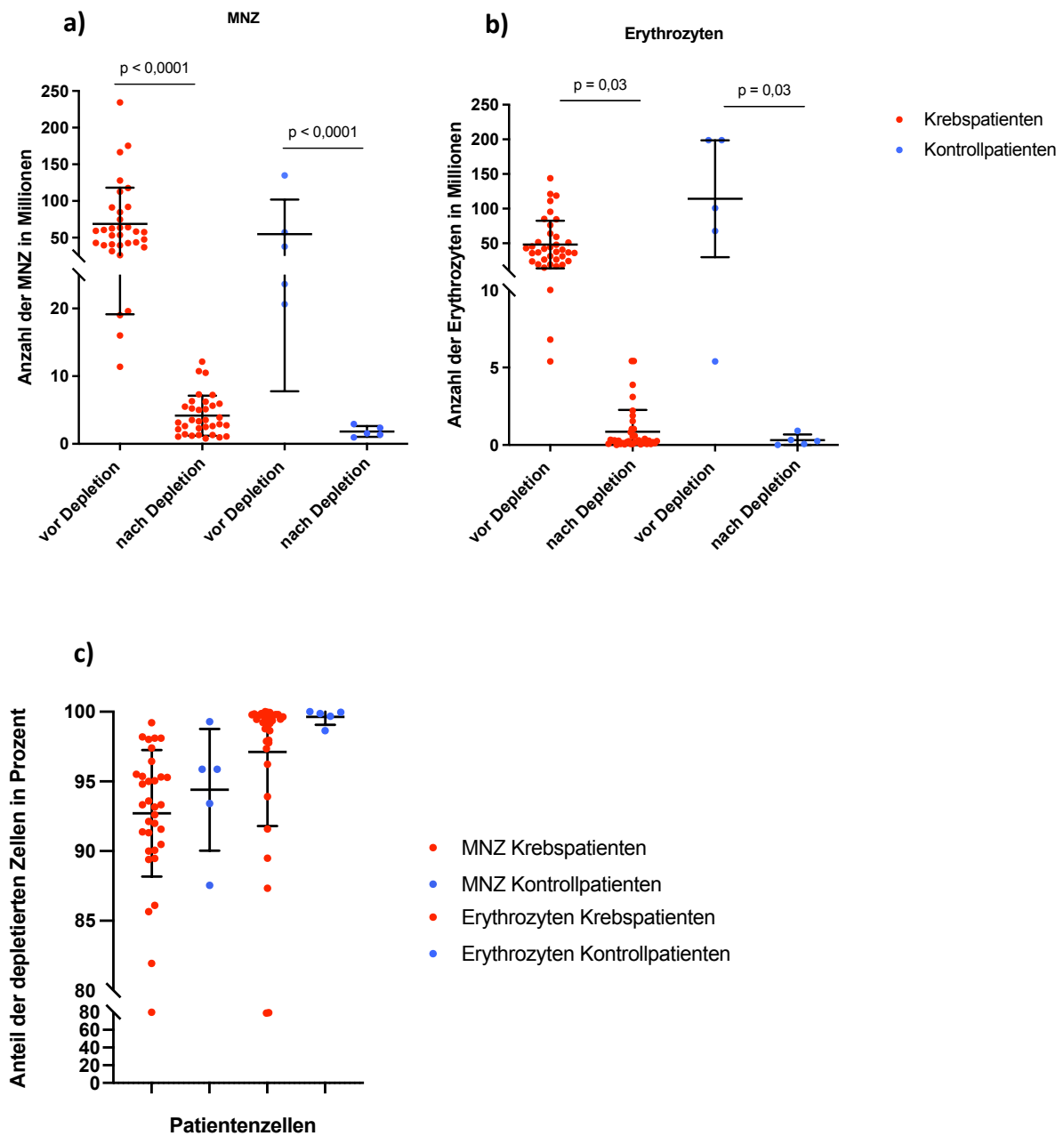


Abbildung 3 Änderung der Anzahl von mononukleären Zellen und Erythrozyten bei Krebs- und Kontrollpatienten durch die Depletion. In (a) ist die Anzahl der mononukleären Zellen pro Millionen (MNZ) abgebildet, in (b) die Anzahl der Erythrozyten pro Millionen jeweils bei Krebs- und Kontrollpatienten, vor und nach der Depletion. In (c) ist der Anteil der depletierten MNZ und Erythrozyten in Prozent bei Krebs- und Kontrollpatienten zu sehen. Die Werte wurden mittels manueller Zellzählung ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aufgetragen. Die statistischen Berechnungen wurden mit den Zellzahlen und dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

4.1.1.2 Ergebnisse der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung auf Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollpatienten

In Voruntersuchungen wurde die beschriebene Immunfluoreszenzfärbung etabliert und bereits angewendet (Damböck, A., 2022). Beide Immunmarker wurden an das gleiche Fluorochrom AF647 gekoppelt und konnten dann im APC-Kanal betrachtet werden. Bei einigen Zellen erhielten wir ein Signal im APC-Kanal, welches nicht so stark war, wie das der Immunzellen, aber dennoch sichtbar. So wurde dieses Zellkollektiv zunächst als EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen klassifiziert. Ein Leak des PE-Fluorochroms in den APC-Kanal konnte bereits in Vorarbeiten ausgeschlossen werden (Damböck, A., 2022). Da auch bei einer ungefärbten Probe und der Isotypkontrolle eine APC-Positivität auffiel, wurde vermutet, dass Zellen, welche bei der Depletion an APC-gebundene Antikörper gekoppelt werden, nicht zu 100 % depletiert werden und daher die APC-Positivität zustande kommt. Im Verlauf konnte auch mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass eine kleine CD45⁺/APC⁺ Fraktion auch nach Depletion noch in der Zellsuspension vorhanden ist. Da es sich aber bei allen APC⁺ Zellen um Immunzellen handelte, welche mittels Ausschlussmarkern in der Depletion nicht entfernt werden konnten, wurden die Negativmarker CD27 und CD319 trotzdem weiter mit dem Alexa Fluor 647 Fluorochrom, welches im APC-Kanal sichtbar wird, verwendet. Unter anderem durch diese Erkenntnisse wurden die Marker CD27 und CD319 an das gleiche Fluorochrom Alexa Fluor 647 gekoppelt, um eine möglichst hohe Färbungsintensität und damit eine deutliche Abgrenzung vom Färbungshintergrund zu erreichen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden nur Zellen als EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen gewertet, welche keine Färbung im APC-Kanal aufwiesen, wie in Abbildung 4 (Zeile a) zu entnehmen. Zellen, welche eine ähnliche Färbung, wie in Abbildung 4 (Zeile b) hatten, wurden als EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen gewertet, da sie mindestens einen Immunmarker auf ihrer Zelloberfläche exprimierten und damit EpCAM⁺ Nicht-Krebszellen darstellen.

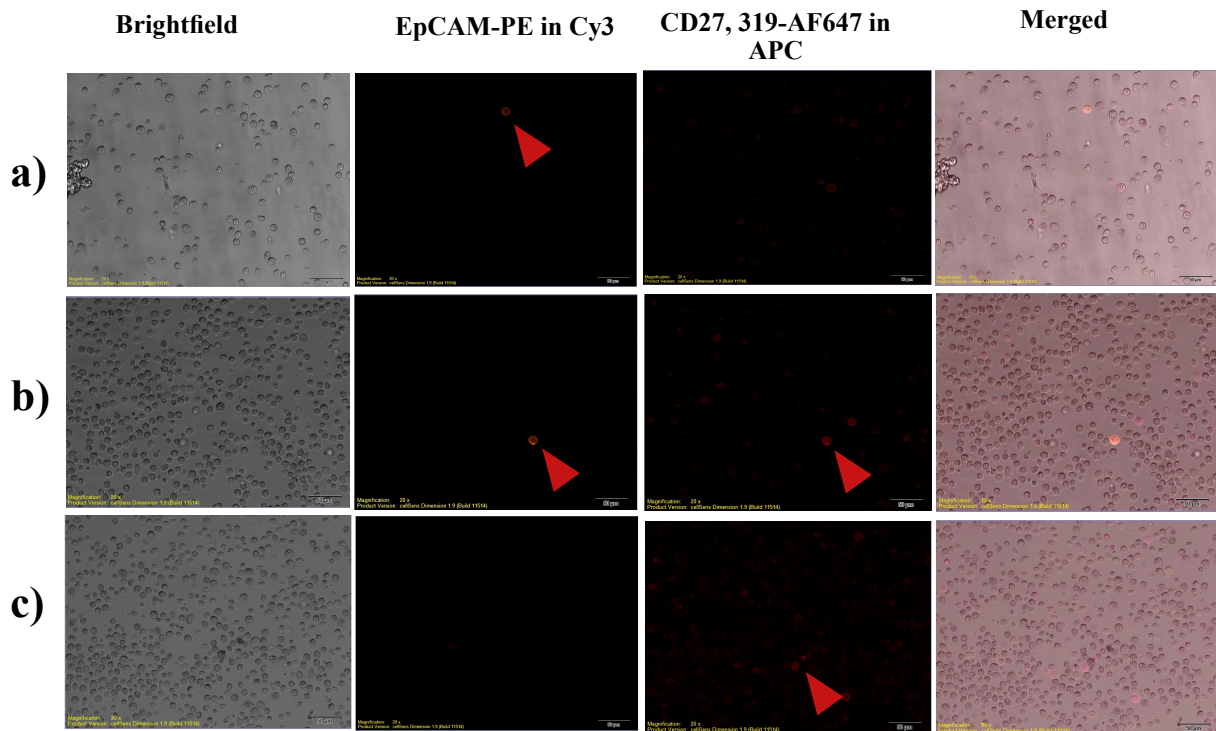


Abbildung 4 Beispielbilder der EpCAM, CD27/319 Immunfluoreszenzfärbung einer M0-Knochenmarkprobe. Zu sehen sind die Ergebnisse der EpCAM, CD27/319 Färbung in Suspension im Hellfeld, Cy3-Kanal, APC-Kanal und die Überlagerung der drei Kanäle. In a) eine EpCAM⁺, CD27/319⁻ Zelle, welche nur ein Signal im Cy3-Kanal aufweist. In b) eine EpCAM⁺, CD27/319⁺ Zelle, welche sowohl in Cy3 als auch in APC ein positives Signal zeigt. In c) sind EpCAM⁻, CD27/319⁺ Zellen zu sehen, diese weisen nur eine Färbung im APC-Kanal auf. Die Vergrößerung liegt bei 20x. Im Cy3-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 0 gearbeitet (Helligkeit 65, Kontrast 62), im APC-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 18 (Helligkeit 50, Kontrast 50). Skala 50 µm.

Um diese Klassifikation der Zellen zu quantifizieren, wurde eine Auswertung der Färbungsintensität mittels der Software ImageJ durchgeführt (Abschnitt 3.3.5). Die bereits isolierten EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen und EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen wurden somit nachträglich vergleichend betrachtet und hinsichtlich ihrer EpCAM und CD27/CD319 Intensität ausgewertet (Abbildung 5). Es fiel auf, dass sich die EpCAM-Intensität zwischen EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen und EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen nicht unterscheidet ($p = 0,66$). Dagegen gab es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der CD27/CD319-Intensität ($p < 0,0001$). Damit konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den isolierten EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen und EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen um verschiedene Zellphänotypen handelte.

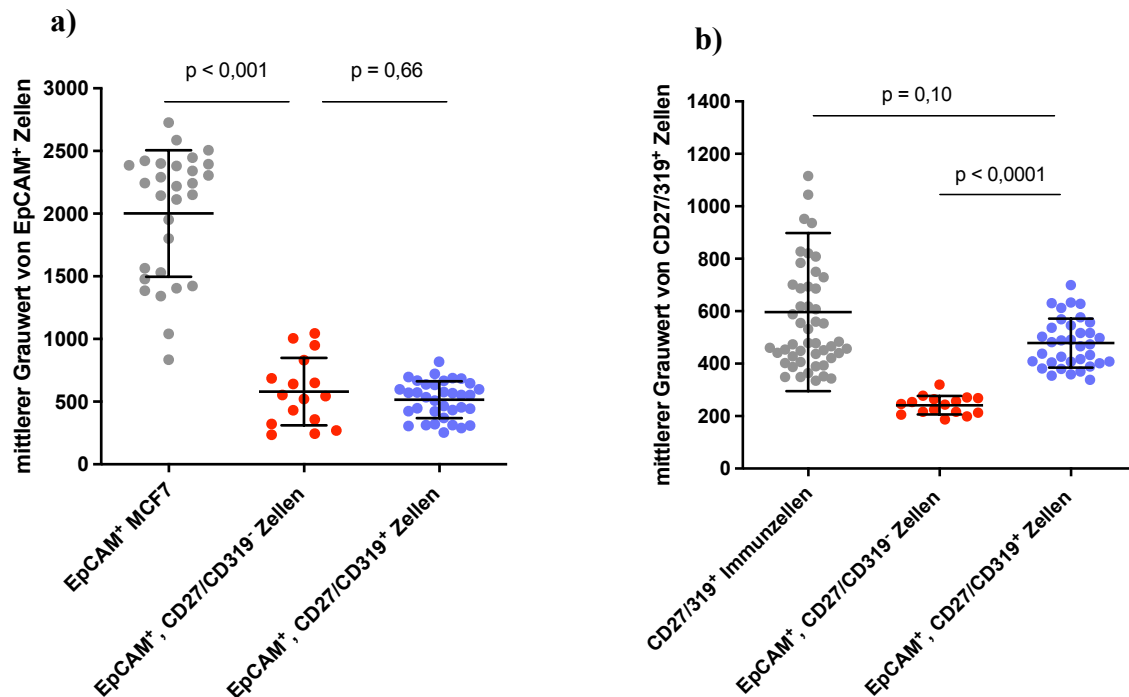


Abbildung 5 Darstellung der IF-Färbungsintensitäten der EpCAM, CD27/319 gefärbten Zellen aus M0-Knochenmarkproben. Zu sehen ist die Auswertung der IF-Färbungsintensitäten der isolierten Einzelzellen mittels der Software ImageJ. Dabei sind die mittleren Grauwerte der Einzelzellen hinsichtlich ihrer EpCAM Färbung (a) und ihrer CD27/CD319 Färbung (b) dargestellt. Zusätzlich ist vergleichend eine Positivkontrolle dargestellt. In a) entspricht diese EpCAM⁺ MCF7-Zellen, in b) CD27/CD319⁺ Immunzellen aus dem Knochenmark. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

Es ergibt sich also ein Kollektiv aus 33 KMP von Patientinnen im M0-Stadium, welches aus 37 EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen und 50 EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen bestand, die nach dem Screeningvorgang isoliert wurden. Das Kollektiv aus KP bestand aus fünf isolierten EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen. Zusätzlich wurden bei jedem Patienten die EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen isoliert (n(M0) = 59, n(KP) = 10), welche für diese Arbeit als interne Kontrolle dienen sollten, da sie keinen EpCAM⁺ Phänotyp aufwiesen. Bei 45,4 % der M0-KMP konnte dabei mindestens eine EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zelle gefunden werden, während bei 54,6 % das Auffinden einer EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zelle erfolglos verblieb. Dahingegen konnte bei keiner der sechs gesunden KMP eine EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zelle gescreent werden. Somit wurden in Proben von M0-Spenderinnen tendenziell häufiger EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen gefunden als in Proben von gesunden Spendern (p = 0,06), (Abbildung 6).

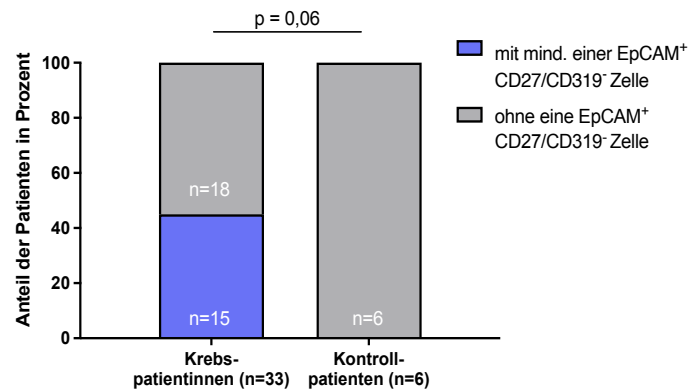


Abbildung 6 Darstellung des Anteils von Patientenproben mit und ohne EpCAM⁺, CD27/319⁺ Zelle. Zu sehen ist der Anteil, der in der IF-Mikroskopie gescreeenten Patientenproben in Prozent, welche mindestens eine EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zelle aufwiesen. Es wurde in Krebs- und Kontrollpatienten unterschieden. Der p-Wert wurde mit dem Fisher's exact Test berechnet.

Daraus ergab sich, dass 100 % der Zellen der Kontrollproben die Marker CD27 und CD319 exprimierten, während nur 57,5 % der Zellen der Krebspatienten diese Marker trugen (Abbildung 7). Diese Erkenntnisse konnten auch schon in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden (Damböck, A., 2022).

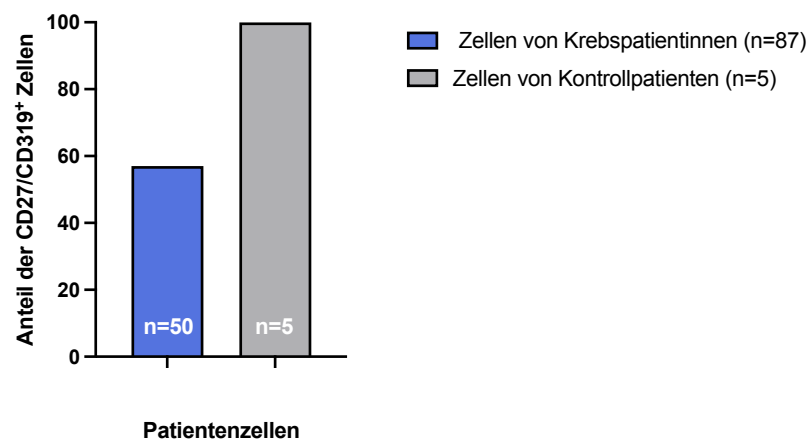


Abbildung 7 Darstellung des Anteils CD27/CD319 positiver Zellen in Krebs- und Kontrollproben. Zu sehen ist der Anteil, der mittels IF-Mikroskopie isolierten CD27/CD319⁺-Einzelzellen in Prozent, in Krebs- und Kontrollpatienten.

Weiterhin ließen sich in Krebspatienten tendenziell mehr EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen pro Million MNZ finden als EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen (Abbildung 8).

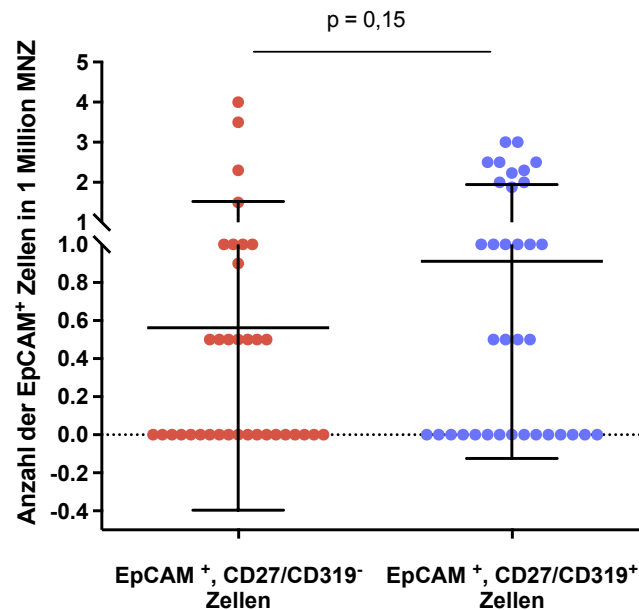


Abbildung 8 Anzahl der EpCAM⁺ Zellen im Knochenmark der Krebspatientinnen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Zu sehen ist die Anzahl der EpCAM⁺ Zellen in einer Million mononukleärer Zellen (MNZ) pro Knochenmark einer Mammakarzinom-Patientin (dargestellt durch einen Punkt). Dabei wurde unterteilt in EpCAM⁺,CD27/319⁻ Zellen und EpCAM⁺,CD27/319⁺ Zellen. Die Abbildung zeigt die jeweiligen Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Der p-Wert wurde mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

4.1.2 Durchführung der quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion zur Analyse des Einzelzell-Transkriptoms

Nachdem isolierte Zellen bereits anhand ihrer exprimierten Proteine (Absatz 4.1.1.2) eingeteilt werden konnten, sollte nun eine nähere Charakterisierung dieser Zellen auf Transkriptebene stattfinden.

Nach bereits beschriebenen Aufarbeitungs- und Kontrollverfahren (Abschnitt 3.7) wurden 47 Einzelzellen von 13 M0-Patientinnen zur Transkriptanalyse verwendet. Die Zellen der Kontrollpatienten (KP) wurden für die Auswertung ausgeschlossen, da es sich dabei nur um drei verbliebene Zellen mit ausreichend guter Qualität handelte. Eine vergleichende Betrachtung der Färbe- und qPCR-Ergebnisse zwischen den Zellen der M0-Brustkrebspatientinnen und den Zellen der gesunden Knochenmarkspender kann nicht erfolgen. So ergaben sich zehn analysierbare EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen, 18 EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und 19 verwendbare EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen. Zunächst wurden dazu in die Untersuchung die Gene *EpCAM*, *CD27* und *CD319*

eingeschlossen, um ihr Vorkommen in den Zellen auf Transkriptomebene zu validieren (Absatz 4.1.2.4). Dazu mussten die Primer für *CD27* und *CD319* noch etabliert werden (Absatz 4.1.2.3). Weiterhin wurde die Untersuchung um *CD45* ergänzt (Absatz 4.1.2.2).

Im weiteren Verlauf (Absatz 4.1.2.5) sollte zudem das Vorhandensein der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eingeführten DCC-Signaturgene *AHSP* und *CA1* sowie der NCC-Gene *AHNAK* und *JUN* geprüft werden (Irlbeck, C., 2019, Patwary, N., in Bearbeitung).

4.1.2.1 Qualitätskontrollen isolierter Einzelzellen nach EpCAM, CD27/CD319

Immunfluoreszenzfärbung

Um auszuschließen, dass Zellen gepickt werden, die eine schlechtere Qualität haben oder schon auf dem Weg zum Zelltod sind, wurde zusätzlich zur EpCAM, CD27/319 Färbung ein DAPI-Farbstoff verwendet. DAPI ist zwar kein spezifischer Apoptose-Marker, kann aber zeigen, ob eine Zelle ihre Membranintegrität bereits verloren hat, indem es sich im Zellkern entsprechender Zellen anreichert, was bei einer intakten Zellmembran nicht möglich ist. Beobachtbar war, dass die zur Isolierung in Frage kommenden Zellen DAPI⁻ verblieben (Abbildung 10). Im Anschluss wurden die isolierten Marker⁺ und DAPI⁻ Zellen im Rahmen der Vorbereitung für folgende quantitative Polymerasenkettenreaktion (qPCR) einer Whole Transcriptome Amplification (WTA) mit Qualitätskontrolle (Quality Control, QC) unterzogen (Abschnitt 3.12). Dabei konnte beobachtet werden, dass EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen überwiegend drei Banden aufwiesen, EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen ($p = 0,0003$) und EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen ($p = 0,0003$) zeigten signifikant häufiger zwei oder weniger Banden. Zwischen allen CD27/CD319⁺ Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl der Banden in den Qualitätskontrollen ($p = 0,7$). Wir konnten somit zeigen, dass diese Verteilung auch für Zellen gilt, deren Membranintegrität und somit indirekt Vitalität nachgewiesen wurde und die Zellen für die qPCR verwendet werden konnten.

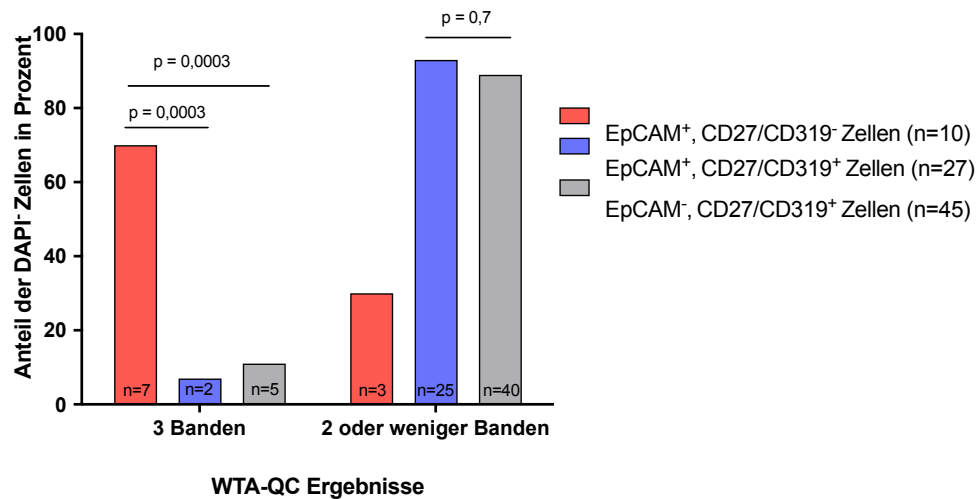


Abbildung 9 Ergebnisse der WTA-QC der Zellen unterschiedlichen Phänotypes aus M0-Knochenmarkproben. Zu sehen sind die Ergebnisse der WTA-QC, aufgliedert in Zellen mit 3 Banden und Zellen mit ≤ 2 Banden. Die Ergebnisse sind in Prozent dargestellt. Die p-Werte wurden mit dem Fischers Exact- Test berechnet.

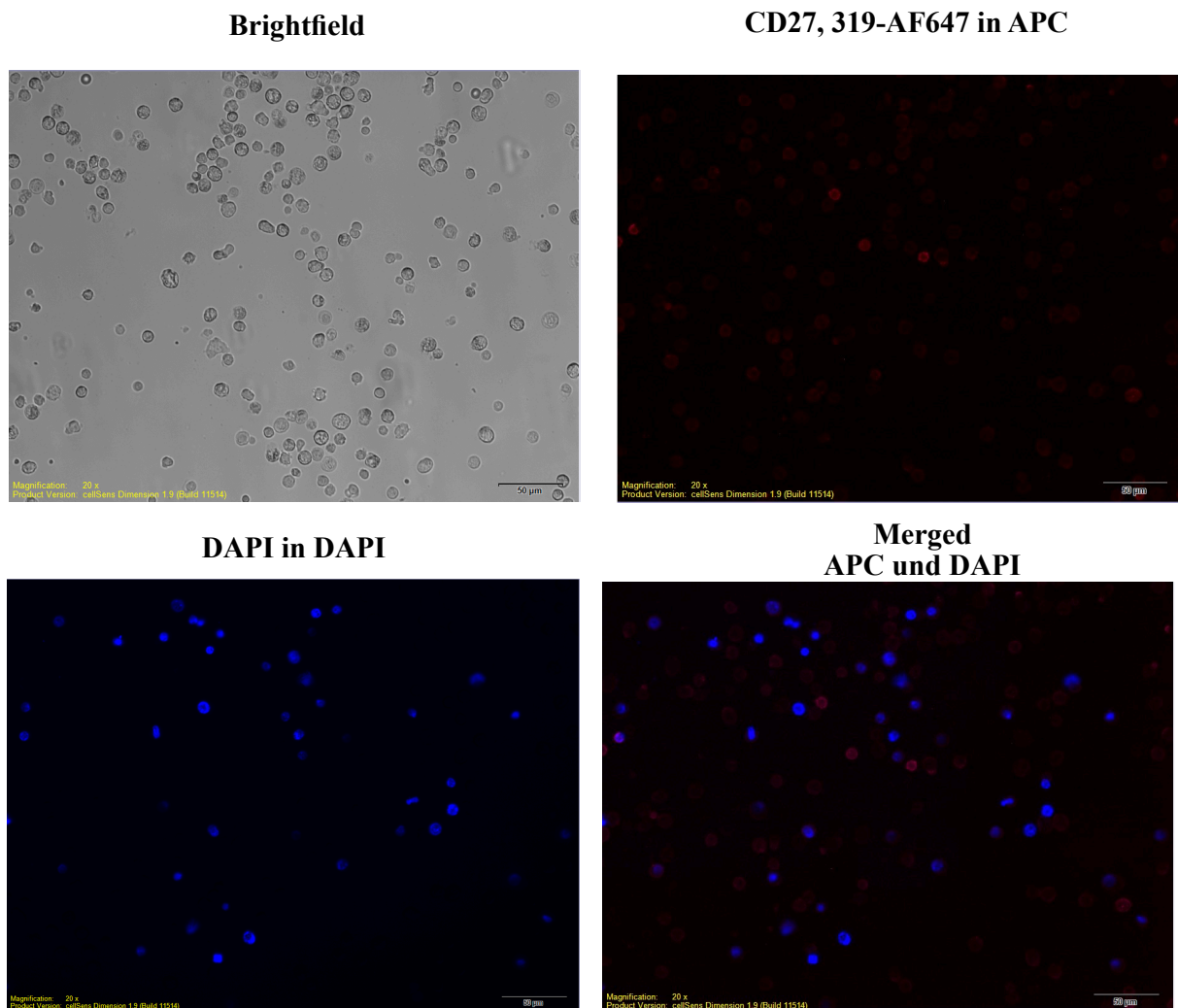


Abbildung 10 Darstellung der DAPI-IF-Färbungsergebnisse in M0-Knochenmarkproben. Zu sehen sind die Ergebnisse der DAPI Färbung nach der EpCAM, CD27/CD319 IF-Färbung in Suspension im Hellfeld, im APC-Kanal, im DAPI-Kanal und die Überlagerung des APC- und DAPI-Kanals. Die Vergrößerung liegt bei 20x. Im APC-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 18 gearbeitet (Helligkeit 50, Kontrast 50), im DAPI-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 10 (Helligkeit 50, Kontrast 50). Skala 50 μm .

4.1.2.2 Untersuchung der isolierten Zellen auf das Vorkommen des CD45-Transkripts

Wie in 4.1.1.2 bereits erwähnt, wurden bei der Depletion unerwünschte Zellfraktionen mit APC-gebundenen Antikörpern gefärbt und anschließend mittels Beads und einem Magneten negativ selektiert. Aufgrund der potenziellen Ineffizienz dieses Prozesses kann es vorkommen, dass auch nach Durchfluss durch das Depletionsröhrchen APC-gefärbte Zellen im Mikroskop sichtbar sind und diese Positivität somit nicht oder nicht allein durch die Expression der Immunmarker CD27 und CD319 zustande kommt. In Voruntersuchungen des Lehrstuhls konnte mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass nach Depletion vor allem schwach CD45⁺ Zellen in der Probe verbleiben, weshalb zur Überprüfung des APC-Signals CD45 für die Genexpressionsanalyse ausgewählt wurde.

Dabei wurden die *CD45* Primer auf alle isolierten Zellen angewendet, ungeachtet ihres Phänotypes. Weder in EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen noch in Zellen, welche nur CD27/CD319 exprimierten, konnte in der qPCR das *CD45*-Transkript nachgewiesen werden, sodass eine Kontamination der Proben mit APC-gefärbten Zellen nach Depletion für die weiteren Analysen nicht angenommen wurde (Abbildung 11).

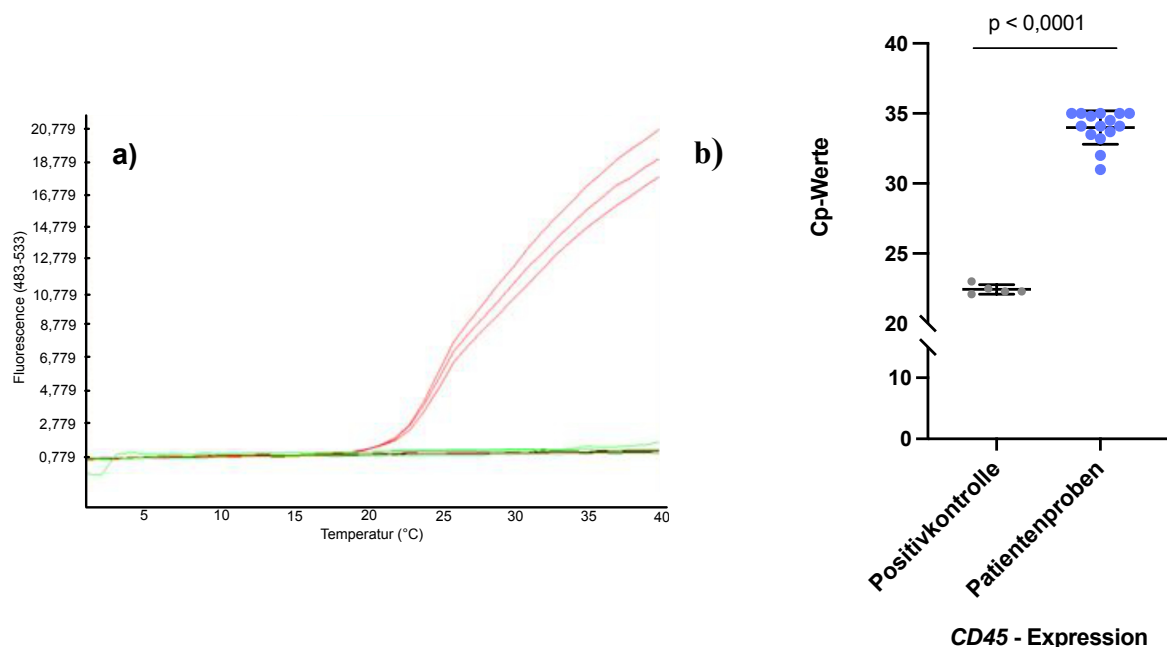


Abbildung 11 Darstellung der qPCR-Ergebnisse zum Vorkommen des CD45-Transkripts. Zu sehen ist in a) die beispielhafte Darstellung der Anzahl der qPCR-Zyklen aufgetragen gegen die detektierte Fluoreszenz. Dabei zeigen die roten Linien die Positivkontrolle. Die grünen Linien zeigen die Negativkontrolle und negative Proben. In b) sind vergleichend die Cp-Werte von beispielhaften CD45-negativen Patientenproben und der Positivkontrollen ($C_p = 22,3$) dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

4.1.2.3 Etablierung der CD27/CD319- Primer zur Analyse des Zelltranskriptoms mittels qPCR

Zur Untersuchung der *CD27* und *CD319* Genexpression, mussten die dafür benötigten Primer erst etabliert werden.

Nachdem, wie in 3.11.1 beschrieben, jeweils vier in Frage kommende Primerpaare für die Zielgene designiert wurden, durchliefen diese die Etablierungsschritte. Für alle Primer wurde eine Temperatur von 58 °C als optimal angesehen. Im weiteren Verlauf wurde mit den je vier Primerpaaren eine Standardkurven-PCR bei den ermittelten 58 °C durchgeführt und im Anschluss an die Standardkurven-PCR ein Restriktionsverdau. In Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Gradienten-PCR und des Restriktionsverdaus für die final ausgewählten Primerpaare zu sehen. In Abbildung 14 sind die Schmelzkurven und in Abbildung 15 die Ergebnisse der Standardkurven-PCR der final ausgewählten Primerpaare dargestellt.

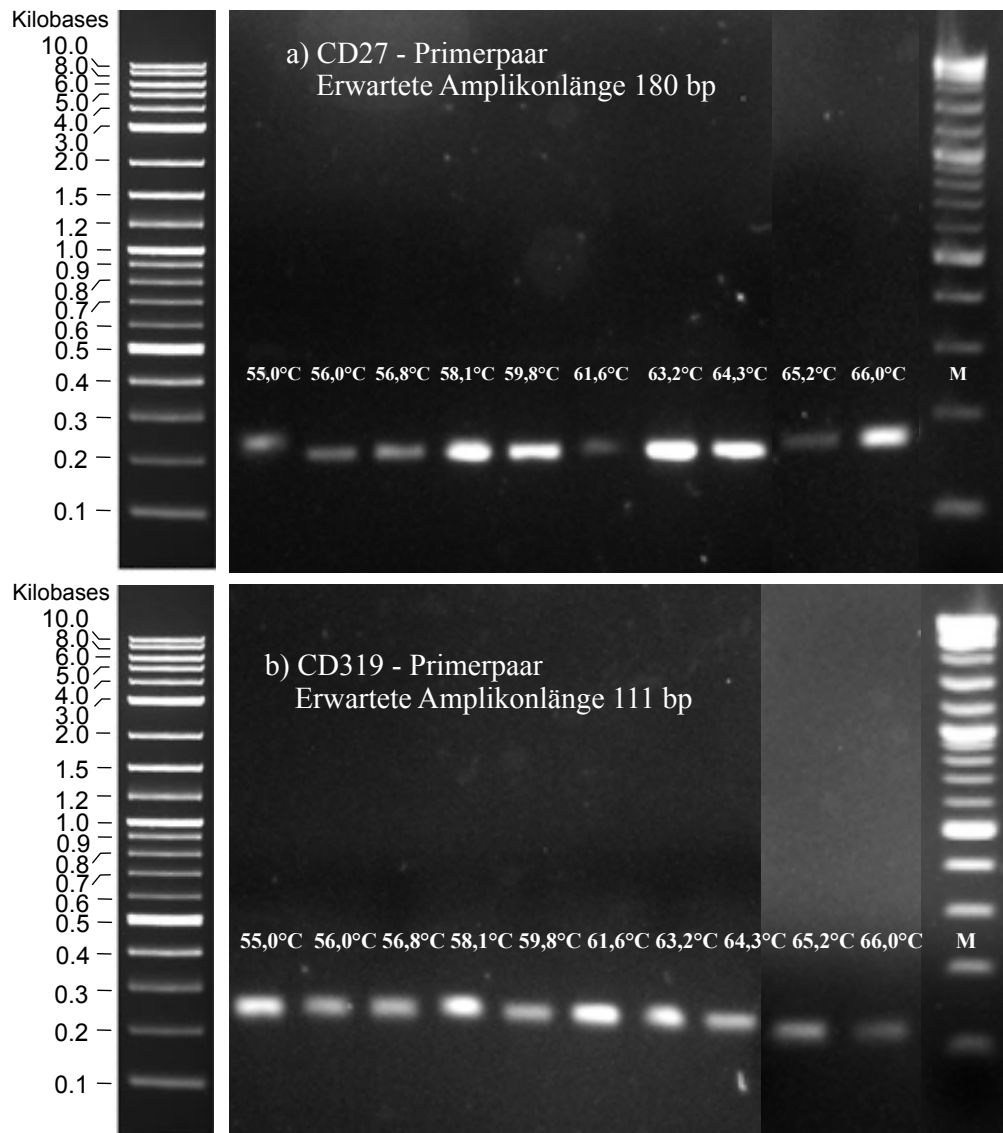


Abbildung 12 Darstellung der Ergebnisse der Gradienten-PCR der final verwendeten Primer für a) CD27 und b) CD319. Es wird deutlich, dass bei 58,1°C die stärkste Bande zu sehen ist. Die weiteren Experimente wurden bei dieser Annealingtemperatur durchgeführt.

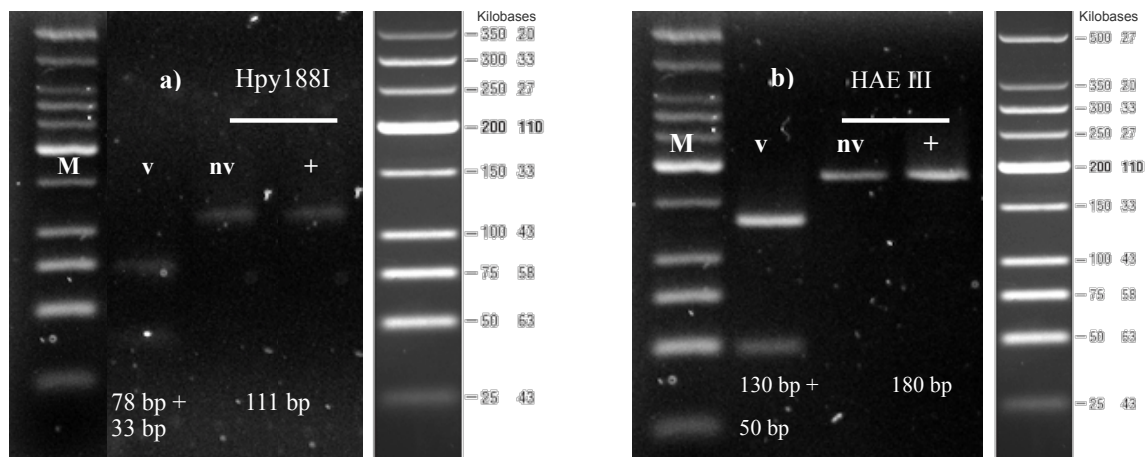


Abbildung 13 Gelbilder des Restriktionsverdaus der final verwendeten Primer für a) CD319 und b) CD27.

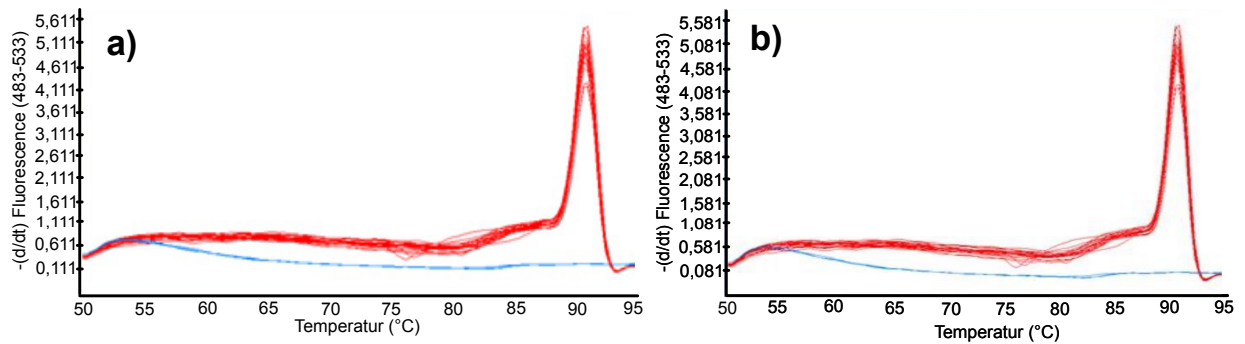
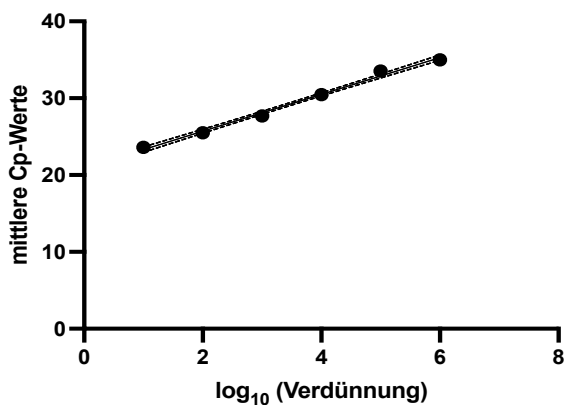


Abbildung 14 Schmelzkurven der final verwendeten Primerpaare für a) CD27 und b) CD319.

a) Standardkurve CD27 Primer



b) Standardkurve CD319 Primer

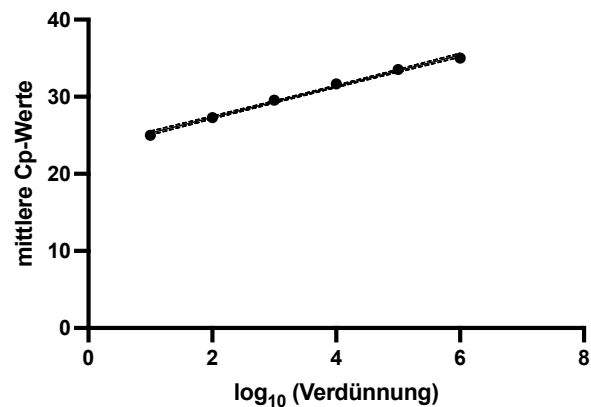


Abbildung 15 Standardkurven der final verwendeten Primerpaare für a) CD27 und b) CD319.

4.1.2.4 Vorkommen der Immunmarker CD27 und CD319 auf Transkriptebene

Die in 4.1.2 beschriebenen Zellen wurden in der qPCR untersucht. Dabei wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Phänotypen und der in der qPCR nachgewiesenen Transkripte in vier Gruppen eingeteilt: 1) In Zellen, die jeweils nur das *EpCAM*- oder 2) nur die *CD27/319*-Transkripte zeigten sowie 3) Zellen, die alle Transkripte oder 4) keines der Transkripte exprimierten. Da die Expression der Immunmarker *CD27* und *CD319* mit zwei separaten Primerpaaren gemessen wurde, wurde bei der Auswertung zur Vereinfachung jede Zelle positiv gewertet, sobald sie positiv auf mindestens einen Marker (entweder *CD27* oder *CD319*) war. Anhand der Kurven und der Cp-Werte ($p < 0,0001$) konnten die Zellen deutlich in Marker-positive und Marker-negative Zellen eingeteilt werden (Abbildung 16 und Abbildung 17).

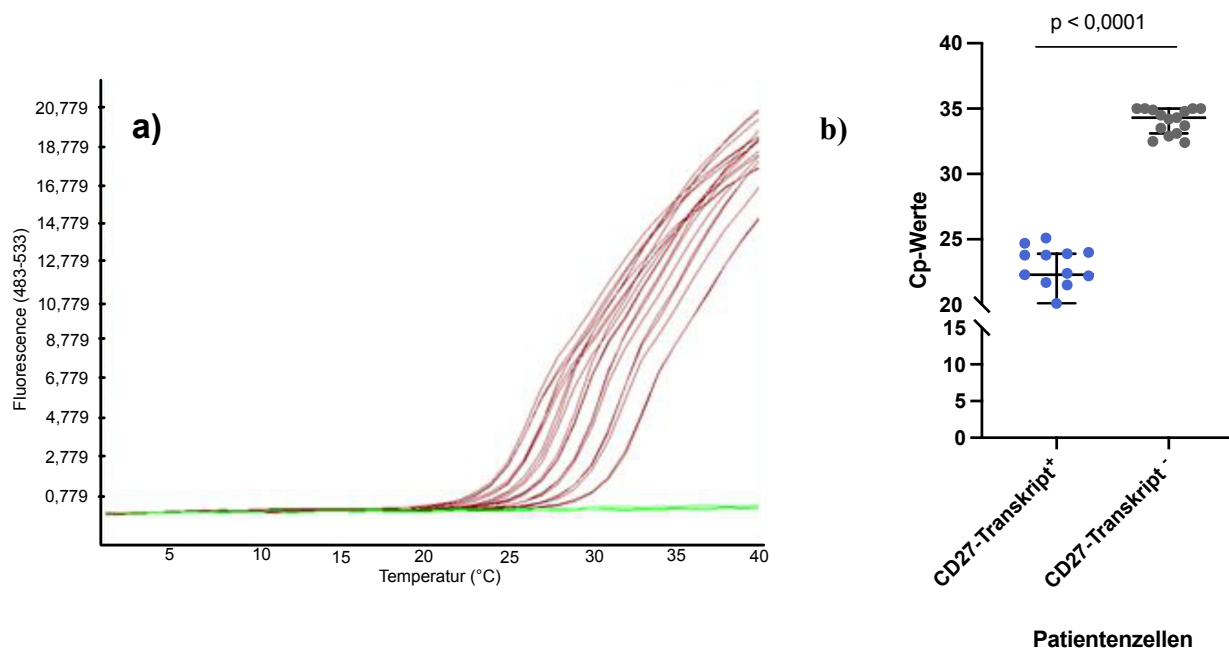


Abbildung 16 Darstellung der qPCR-Ergebnisse zum Vorkommen des CD27-Transkripts. Zu sehen ist in a) die beispielhafte Darstellung der Anzahl der qPCR-Zyklen aufgetragen gegen die detektierte Fluoreszenz. Dabei zeigen die roten Linien die Positivkontrolle und positive Proben. Die grünen Linien zeigen die Negativkontrolle und negative Proben. In b) sind vergleichend die Cp-Werte von beispielhaften CD27-positiven und CD27-negativen Patientenproben dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

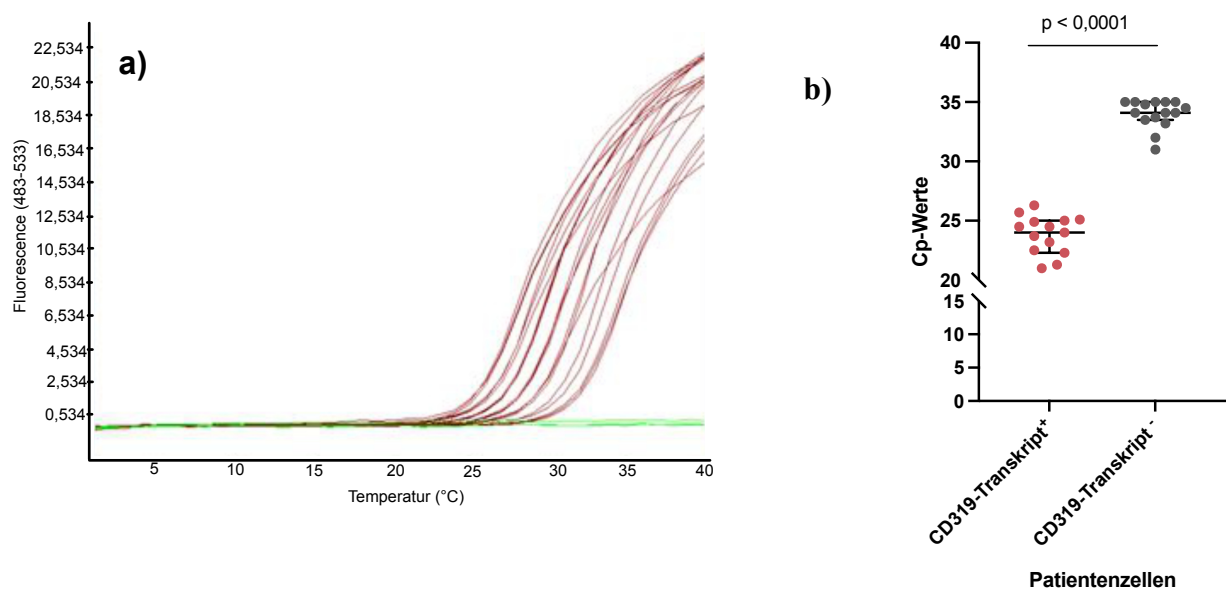


Abbildung 17 Darstellung der qPCR-Ergebnisse zum Vorkommen des CD319-Transkripts. Zu sehen ist in a) die beispielhafte Darstellung der Anzahl der qPCR-Zyklen aufgetragen gegen die detektierte Fluoreszenz. Dabei zeigen die roten Linien die Positivkontrolle und positive Proben. Die grünen Linien zeigen die Negativkontrolle und negative Proben. In b) sind vergleichend die Cp-Werte von beispielhaften CD319-positiven und CD319-negativen Patientenproben dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

Weiterhin wurde deutlich, dass acht der zehn EpCAM^+ , CD27/CD319^- Zellen auch das *EpCAM*-Transkript exprimierten (80 %). Eine Zelle zeigte sowohl das *EpCAM*- als auch die *CD27* bzw. *CD319*-Transkripte (10 %) und bei einer Zelle konnten nur die *CD27*- oder *CD319*-Transkripte nachgewiesen werden (10 %). Dahingegen exprimierte nur eine der 18 EpCAM^+ , CD27/CD319^+ Zellen das *EpCAM*-Transkript (5 %), obwohl das Protein in der IF-Färbung noch deutlich detektierbar war. Der Hauptanteil dieser Zellen exprimierte nur die Transkripte von *CD27* oder *CD319* (56 %). Nur drei Zellen exprimierten beide Transkripte (17 %), wie es nach der Färbung, bei welcher die Zellen doppelt positiv waren, auch zu erwarten gewesen wäre. Vier Zellen waren negativ für alle getesteten Transkripte (22 %). In der Gruppe der EpCAM^+ , CD27/CD319^+ Zellen exprimierte, wie nach der Färbung erwartet, keine Zelle das *EpCAM*-Transkript. Die Transkripte von *CD27* und *CD319* exprimierten 14 Zellen (74 %), fünf Zellen exprimierten kein getestetes Transkript (26 %).

Damit ergibt sich, dass EpCAM^+ , CD27/CD319^- Zellen signifikant häufiger das *EpCAM*-Transkript aufwiesen als EpCAM^+ , CD27/CD319^+ Zellen ($p < 0,0001$). Diese verhielten sich eher wie EpCAM^- , CD27/CD319^+ Zellen ($p = 0,3$) und exprimierten signifikant häufiger als nur die *CD27/319*-Transkripte ($p = 0,04$), (Abbildung 18).

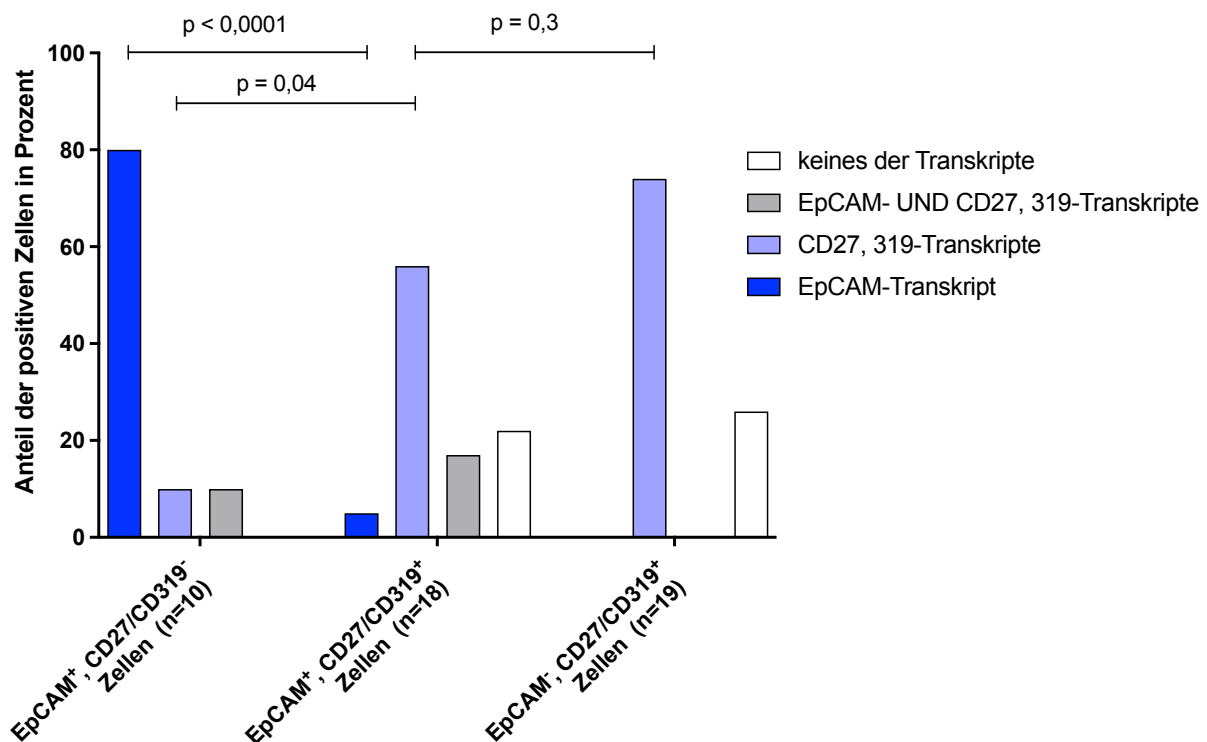


Abbildung 18 Genexpression von EpCAM, CD27 und CD319 unterteilt nach Zelltypen. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellen unterschiedlichen Phänotyps der M0-Mammakarzinom-Patientinnen in der qPCR, hinsichtlich der Expression der EpCAM-, CD27-, CD319- Transkripte. Auf der y-Achse ist die relative Verteilung zu sehen. Die p-Werte wurden mit dem Fischers Exact- Test berechnet.

4.1.2.5 Hinzunahme von DCC- und NCC-Signaturgenen zur näheren Identifikation

Da die qPCR-Auswertungen hinsichtlich der *EpCAM*- und *CD27*, *CD319*-Transkripte ergaben, dass NCCs signifikant seltener das *EpCAM*-Transkript exprimierten, sollte die qPCR-Untersuchung um weitere Primer ergänzt werden. Die zusätzlichen Primer sollten weiteren Aufschluss über die Identität der Zellen geben. In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurden mittels Geneexpressionsprofilen von 25 chromosomal aberranten M0-DCCs und 22 Healthy Donor-NCCs (Kontrollpatienten, Healthy Donor, HD) Gene identifiziert, welche entweder häufiger in DCCs oder NCCs vorkommen. Dabei handelte es sich um *AHNAK* und *JUN*, häufiger exprimiert von NCC, und *AHSP* und *CAI*, häufiger in DCC zu finden (Irlbeck, C., 2019). Die Zellen mit ihren verschiedenen Phänotypen wurden nun hinsichtlich ihrer Expression der DCC- und NCC-Signaturgene getestet und in Zellen mit 1) DCC-Signatur, 2) NCC-Signatur und 3) Zellen mit undefinierter Signatur eingeteilt. Eine strengere Einteilung teilt die DCC- und NCC-Signaturen nochmals in deutlich DCC oder NCC und DCC- und NCC-ähnlich. In folgender Auswertung wurden alle DCC- oder NCC-ähnlichen Zellen der DCC- und NCC-Signatur zugeteilt. Das in Abbildung 19 gezeigte Schema macht die Unterteilung anhand der Cp-Werte nochmal deutlich.

In den Vorarbeiten des Lehrstuhls wurde diese qPCR-Untersuchung bereits auf 272 M0 EpCAM⁺ Zellen und 40 EpCAM⁺ Zellen aus HDs angewendet. In der Gruppe EpCAM⁺ M0-Zellen wiesen 66 % die DCC-Signatur auf, 22 % eine NCC-Signatur und 11 % konnten nicht näher definiert werden. Bei den Zellen der gesunden Spender waren 61 % positiv auf die NCC-Signatur, 36 % positiv auf die DCC-Signatur, 5 % verblieben undefiniert (Irlbeck, C., 2019).

	DCC	DCC-like		Undefined			NCC-like		NCC
DCC genes (AHSP/CA1)	Both Cp ≤ 25	Both Cp < 30	One Cp < 30 Other Cp ≥ 30	Both Cp ≤ 30	Both Cp ≥ 30	One Cp < 30 Other Cp ≥ 30	One Cp < 30 Other Cp ≥ 30	Both Cp ≥ 30	Both Cp ≥ 30
NCC genes (AHNAK/JUN)	Both Cp ≥ 30	One Cp < 30 Other Cp ≥ 30	Both Cp ≥ 30	Both Cp ≤ 30	Both Cp ≥ 30	One Cp < 30 Other Cp ≥ 30	Both Cp < 30	One Cp < 30 Other Cp ≥ 30	Both Cp ≤ 25



Abbildung 19 Darstellung der Klassifizierung von Zellen anhand der DCC- oder NCC-Signatur (Irlbeck, C., 2019).

Somit sollte eine Ergänzung des bisherigen qPCR-Ansatzes mit den beschriebenen Signatur-Genen die Zellen näher definieren. Die in 4.1.2 beschriebenen Zellen wurden für die vorliegende Auswertung verwendet.

In der Gruppe der phänotypisch EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen wiesen fünf Zellen die DCC-Signatur auf (50 %), drei Zellen die NCC-Signatur (30 %), zwei Zellen verblieben undefiniert (20 %). In der Gruppe der phänotypisch EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen waren elf Zellen positiv auf die NCC-Signatur (61 %) und sieben Zellen konnten nicht genau einer Signatur zugeordnet werden (39 %). Keine Zelle der Gruppe der phänotypisch doppelt positiven Zellen wies die DCC-Signatur auf. Auch in der Gruppe der EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen ergab sich eine ähnliche Verteilung.

Mittels Fisher's Exact Test konnte gezeigt werden, dass EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen signifikant häufiger die DCC-spezifische Signatur exprimierten als EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen (p = 0,002). Diese zeigten eine NCC-spezifische Signatur (p = 1), (Abbildung 20).

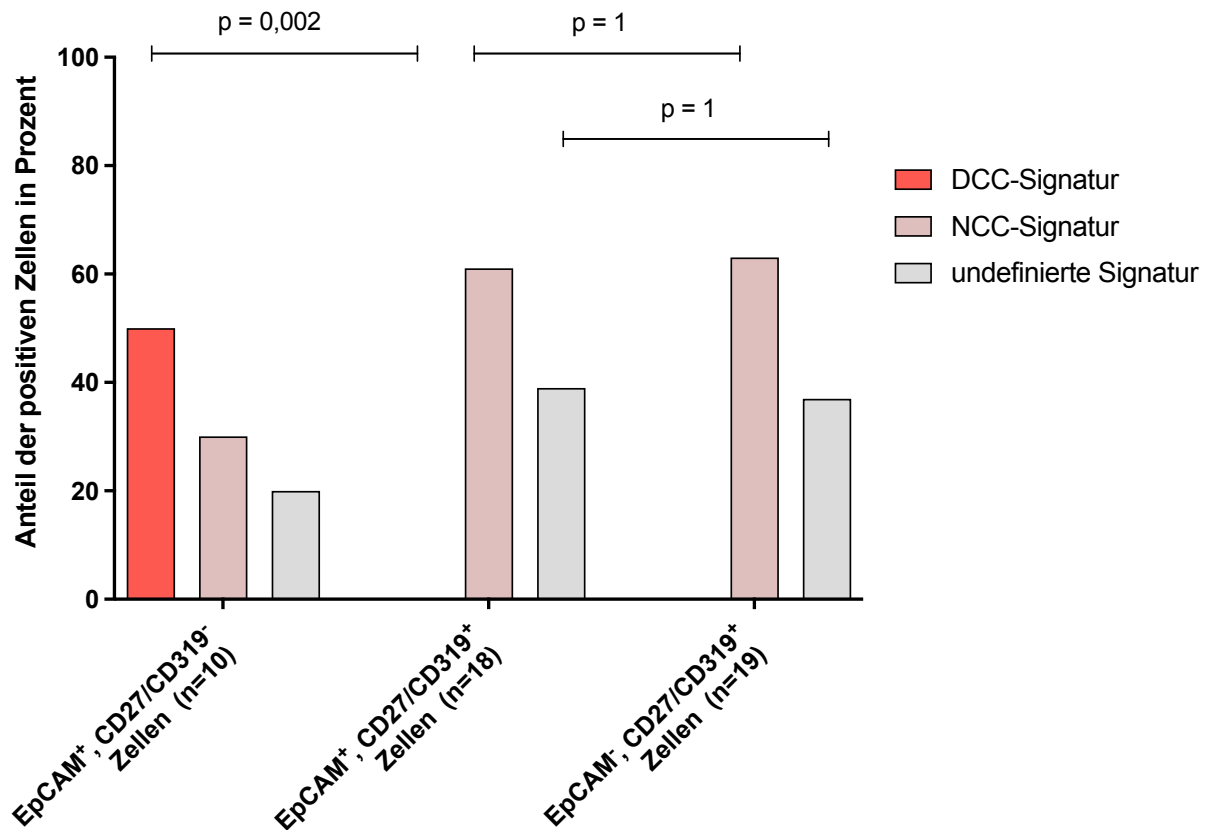


Abbildung 20 Einteilung der Zellen anhand DCC- und NCC- Signaturgene unterteilt nach ihren Phänotypen. Zu sehen sind die Ergebnisse der Zellen unterschiedlichen Phänotyps der M0-Mammakarzinom-Patientinnen in der qPCR, hinsichtlich ihrer Expression der DCC-Signaturgene (AHSP, CA1) und NCC-Signaturgene (AHNAK, JUN). Auf der y-Achse ist die relative Verteilung zu sehen. Die p-Werte wurden mit dem Fishers Exact- Test berechnet.

Eine zusammenfassende Darstellung der qPCR-Ergebnisse aller Zellen liefert Abbildung 21. Darin wurde deutlich, dass EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen ein eigenes Kluster bildeten und sich somit von den EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen abgrenzten. Hinsichtlich ihrer exprimierten Transkripte bildeten diese eher mit den Immunzellen eine Gruppe. Die qPCR-Ergebnisse legten damit nahe, dass eine Einteilung der EpCAM⁺ Zellen nach ihrer Expression von CD27/CD39 sinnvoll erscheint, um diese genauer zu charakterisieren.

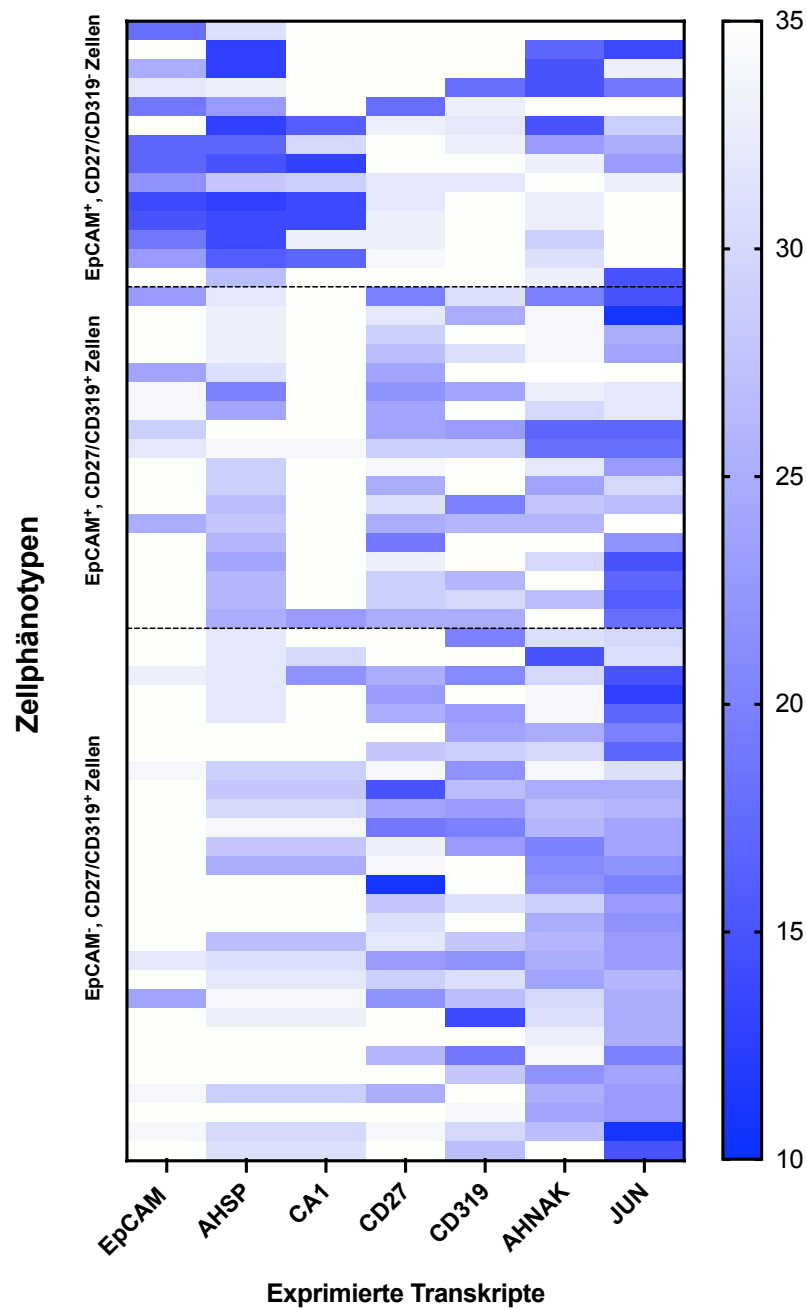


Abbildung 21 Darstellung der Expression ausgewählter Gene aller Zellen. In der Heatmap ist die Expression der Transkripte EpCAM, CD27, CD319, AHNAK, JUN, AHSP, CA1 in der qPCR für jede Zelle dargestellt. Dabei zeigt jede Reihe eine Zelle, unterteilt in EpCAM⁺, CD27/319⁻ Zellen, EpCAM⁺, CD27/31⁺ Zelle und EpCAM⁻, CD27/319⁺ Zelle und jede Spalte ein getestetes Gen. Farblich kodiert sind dabei die Cp-Werte, welche sich bei der qPCR ergaben. Je dunkler die Farbe, desto geringer der Cp-Wert. Blaue Kästchen bedeuten also eine Positivität der Zelle für ein entsprechendes Gen, weiße Kästchen bedeuten, dass das gesuchte Transkript nicht exprimiert wurde.

4.1.2.6 Überprüfung der Gütekriterien der EpCAM, CD27/CD319

Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der qPCR-Ergebnisse

Zu dem Schluss kommend, dass das Vorhandensein der beiden Immunmarker CD27 und CD319 in der Oberflächenfärbung unerwünschte EpCAM-positive Zellen detektieren und aus weiteren Analysen ausschließen kann, sollte nun eine vergleichende Betrachtung von IF-Färbung und qPCR-Signaturen erfolgen (Tabelle 3 36). Dabei ergab sich eine Testsensitivität von 100 % und eine Spezifität von 88 %. Weiterhin kann man sagen, dass man zu 62,5 % (positiver Prädiktionswert) eine Zelle mit DCC-Signatur erhält. Mit einer 100-prozentigen Wahrscheinlichkeit zeigt eine Zelle keine DCC-Signatur, wenn ihr Phänotyp CD27/ CD319⁺ ist, unabhängig von ihrem EpCAM-Status (negativer Prädiktionswert).

Tabelle 3 36 Gütekriterien der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung im Vergleich mit der qPCR-Klassifizierung.

	qPCR DCC	qPCR NCC	Prädiktionswerte
EpCAM⁺, CD27/CD319⁻	5	3	0,625
EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ EpCAM⁻, CD27/CD319⁺	0	23	1
Sensitivität und Spezifität	1	0,88	

Abschließend lässt sich nach allen qPCR-Analysen und -Auswertungen sagen, dass sich Zellen, welche EpCAM-einzeln positiv sind, eher als echte DCCs einordnen lassen. EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen verhalten sich eher wie die EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen. Die abschließende Analyse dieser Zellen und den Beleg, welche Zellen ein aberrantes Genom haben und damit echte DCCs sind, sollte die LowPass-Sequenzierung erbringen.

4.1.3 LowPass-Sequenzierung zur Detektion genomischer Aberrationen

Wie zuvor beschrieben verhielten sich Zellen, welche einen EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Phänotyp aufwiesen auf Transkriptebeine wie EpCAM⁻ Zellen und grenzten sich damit von EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen ab. Dementsprechend könnte eine Unterscheidung zwischen EpCAM⁺ DCCs und EpCAM⁺ NCCs auf Proteinebene mittels CD27/319 gelingen. Diese Hypothese sollte nun anhand einer Kopiezahlanalyse mittels LowPass Genomsequenzierung untersucht werden. Tumorzellen sollten demnach Mutationen und Genomaberrationen tragen, während gesunde Zellen eher ein balanciertes Genom aufweisen sollten.

4.1.3.1 Überblick über das in die Genomanalyse eingeschlossene Kollektiv an Einzelzellen von Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollpatienten

Für die LowPass-Sequenzierung wurden alle bereits in der qPCR analysierten Zellen verwendet (Absatz 3.5). Zusätzlich wurden weitere Zellen direkt für die LowPass-Sequenzierung isoliert und ohne weitere Zwischenschritte aufgereinigt (Absatz 3.6), um qualitätsbedingte Ausfälle möglichst gering zu halten. Daher wurden im Folgenden die Zellen zunächst getrennt nach ihrem Aufarbeitungsweg beurteilt und in Überstandszellen (Ü) und frisch isolierte Zellen (F) unterschieden. Von 24 M0-Patientinnen wurden 80 Zellen und von drei KP sechs Zellen zur Genomanalyse mitgeführt (Abbildung 34) und die erhaltenen CNV-Profile nach den in 3.14 aufgeführten Qualitätskriterien beurteilt (Abbildung 22).

Von den Überstandszellen konnten 16 Zellen von zehn M0-Patientinnen ($n(\text{EpCAM}^+, \text{CD27/CD319}^-) = 3$; $n(\text{EpCAM}^+, \text{CD27/CD319}^+) = 6$; $n(\text{EpCAM}^-, \text{CD27/CD319}^+) = 7$) ausgewertet werden. Von den frischen Zellen waren es 21 Zellen von acht M0-Patientinnen ($n(\text{EpCAM}^+, \text{CD27/CD319}^-) = 6$; $n(\text{EpCAM}^+, \text{CD27/CD319}^+) = 11$; $n(\text{EpCAM}^-, \text{CD27/CD319}^+) = 4$). Die Zellen der Kontrollpatienten konnten nach den strengen Qualitätskriterien nicht mehr in weitere Analysen eingeschlossen werden (Absatz 8.6).

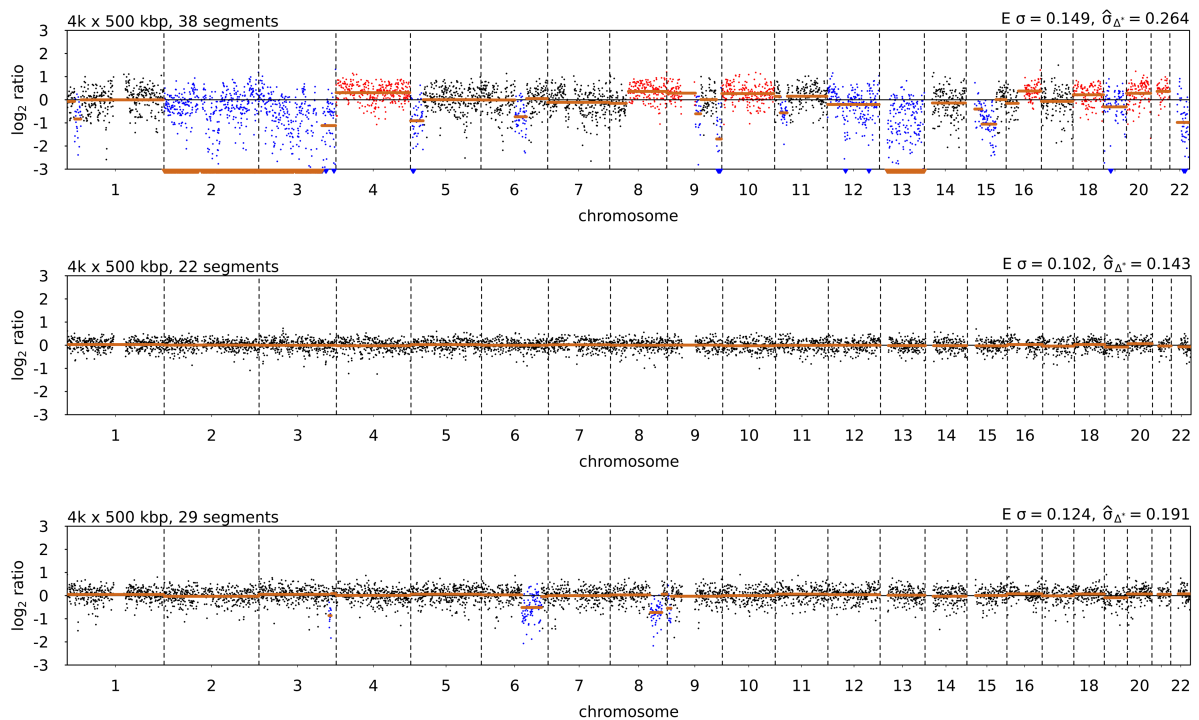


Abbildung 22 Beispielhafte Darstellung von CNV-Profilen mit guter und schlechter Qualität. Beispielhafte Darstellung von CNV-Profilen mit schlechter Qualität (oben), guter Qualität und balanciertem Profil (mittig) sowie guter Qualitäten und aberrantem Profil (unten). Amplifikationen sind in rot zu sehen, Deletionen in blau.

4.1.3.2 Auswertung der LowPass-Sequenzierung zur Detektion genomischer Aberrationen in Einzelzellen von Mammakarzinom-Patientinnen

Sowohl die EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen als auch die EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen wiesen in 100 % der Fälle ein balanciertes Genom auf. Unerwarteterweise zeigten jedoch die Immunzellen in 18,2 % der Fälle ein aberrantes Genom. Dabei handelte es sich bei den aberranten Zellen in beiden Fällen um Überstandszellen, frisch isolierte Zellen wiesen durchgehend balancierte Genome auf. Weiterhin konnten den aberranten Zellen nur eine undefinierte Signatur in den qPCR zugeordnet werden. Zellen, welche eine DCC- oder NCC-spezifische Signatur hatten, wiesen durchgehend ein balanciertes Genom auf (Abbildung 23).

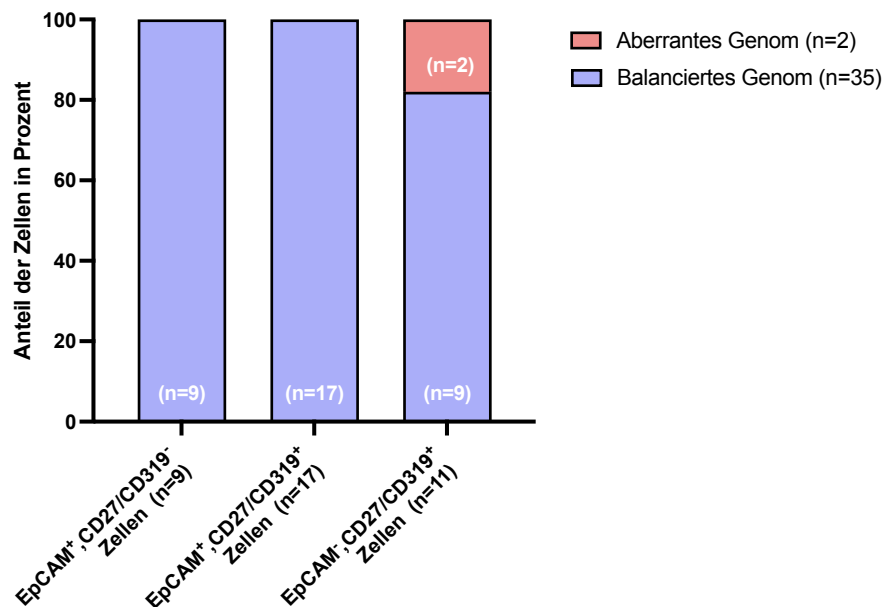


Abbildung 23 Darstellung der Anteile von Zellen mit balanciertem und aberrantem Genom hinsichtlich ihres Zellphänotypes. Zu sehen ist die prozentuale Verteilung von Zellen mit aberrantem und balanciertem Genom in der LowPass-Sequenzierung in den Gruppen der EpCAM⁺, CD27/319⁻ Zellen und EpCAM⁺, CD27/319⁺ Zellen und der Gruppe der EpCAM⁺, CD27/319⁺ Zellen.

Weiterhin wurde deutlich, dass sich ein erheblicher Qualitätsunterschied in den Gruppen der frisch isolierten Zellen und der Überstandszellen ergab. Wie erwartet, wiesen die frischen Zellen signifikant häufiger ($p < 0,0001$) Profile auf, welche ein $\sigma\Delta^* < 0,2$ zeigten (Abbildung 24). Da die sogenannten frischen Zellen direkt für die Sequenzierung isoliert wurden und weniger Aufarbeitungsschritte durchliefen als die Überstandszellen, kann hier eine mögliche Erklärung dafür liegen (Absatz 5.3).

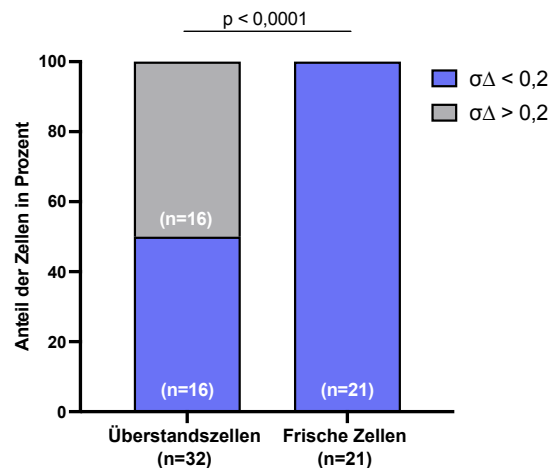


Abbildung 24 Darstellung der Anzahl der Profile von M0-Zellen mit guter und schlechter Qualität. Zu sehen ist der Anteil der LowPass-Profile von M0-Zellen mit guter Qualität ($\sigma\Delta^* < 0,2$) und schlechter Qualität ($\sigma\Delta^* > 0,2$) in Prozent. Dabei wurde unterteilt in Überstandszellen (blau) und frisch isolierte Zellen (grau). Der p-Wert wurde mit dem Fisher's exact Test berechnet.

4.1.3.3 Überprüfung der Gütekriterien der EpCAM, CD27/CD319

Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der LowPass-Sequenzierung

Da das Vorhandensein der beiden Immunmarker CD27 und CD319 in der Oberflächenfärbung Zellen, welche die Population der EpCAM-positiven putativen DCCs verunreinigen, detektieren und aus weiteren Analysen ausschließen kann, sollte nun die Spezifität und Sensitivität der IF-Färbung hinsichtlich der LowPass-Ergebnisse überprüft werden. Dazu charakterisiert man die Zellen hinsichtlich ihres CD27/CD319 Phänotypes in EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen und CD27/CD319⁺ Zellen und bewertet den Erfolg der Färbung im Vergleich zu ihren Genomsequenzierungs-Ergebnissen (Tabelle 3 37). Dabei haben die Berechnungen gezeigt, dass die EpCAM, CD27/319 Färbung vor allem eine Spezifität von 74,3 % sowie einen negativen Prädiktionswert von 92,8 % aufweist. Die Färbung eignet sich daher gut zum Ausschluss der ungewollten EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen, jedoch nicht gut für die spezifische Identifikation von EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen.

Tabelle 3 37 Darstellung der Gütekriterien der EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der LowPass-Ergebnisse.

	Genom aberrant	Genom balanciert	Prädiktionswerte
EpCAM⁺, CD27/CD319⁻	0	9	0,0
EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ EpCAM⁻, CD27/CD319⁺	2	26	0,928
Sensitivität und Spezifität	0,0	0,743	

4.2 Etablierung und Anwendung der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung auf Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen

Nach der Anwendung des EpCAM, CD27/CD319 Färbepanels auf Patientenproben und der Feststellung der Eignung der Immunmarker CD27, CD319 als Negativmarker zum Ausschluss falsch positiver DCCs im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen, sollte nun eine Positivität in der IF-Färbung auf EpCAM und CD117 echte DCCs nachweisen, während EpCAM⁺, CD117⁻ Zellen eher falschpositive DCCs darstellen könnten. Ausgehend von dieser Hypothese wurde eine IF-Färbung etabliert. Ziel sollte es dabei sein, eine Markerkombination aus Negativ-, Positiv- und EpCAM-Marker zu erhalten, um nur echte DCCs zu isolieren. Weiterhin sollten die Proben nach EpCAM^{high} Zellen gescreent und dann hinsichtlich ihrer weiteren Phänotypen näher charakterisiert werden. Da die Doppelfärbung mit EpCAM und den Immunmarkern bereits etabliert war, musste nun noch die Färbung mit einem möglichen Positivmarker untersucht werden.

4.2.1 Auswahl eines geeigneten Fluorochroms

Da das Ziel, eine anwendbare Markerkombination zu entwerfen, zunächst im Vordergrund stand, musste ein Kanal am Mikroskop gewählt werden, welcher noch nicht durch EpCAM oder die Immunmarker CD27/CD319 belegt war.

Dazu standen am Olympus Mikroskop IX81 noch die FITC- und DAPI -Kanäle zur Verfügung, da EpCAM-PE in Cy3 und CD27/CD319-AF647 in APC sichtbar werden. So stellte auch hier das Filterset des Mikroskops eine Limitation der Färbungsetablierung dar.

Es wurden Isotyp- und Antikörper-Färbungen durchgeführt, sowie jedes Mal eine ungefärbte Probe mitgeführt. Da das undepletierte Knochenmark ein Ort heterogener Zellpopulationen ist und somit noch alle Zellpopulationen enthält, welche CD117 exprimieren können, diente dieses hierbei als Kontrolle. Zellen, welche schwach oder gar nicht gefärbt waren, wurden als CD117⁻ betrachtet, stark gefärbte Zellen als CD117⁺.

Zunächst wurde das Fluorochrom Brilliant Violet 421, bei welchem Exkitation und Emission am ehesten vom DAPI-Filter des Mikroskops abgedeckt werden konnten, verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die Färbungsintensität nur sehr schwach und Isotyp- sowie ungefärbte Probe nicht negativ waren oder die Antikörper-Färbung zumindest nicht stärker positiv (Abbildung 25). Möglicherweise resultiert dies aus einer nicht optimalen Anregung des

Fluorochroms durch das verwendete Filterset des Mikroskops, sodass die Färbungsergebnisse die Notwendigkeit ergaben, ein alternatives Fluorochrom zu verwenden.

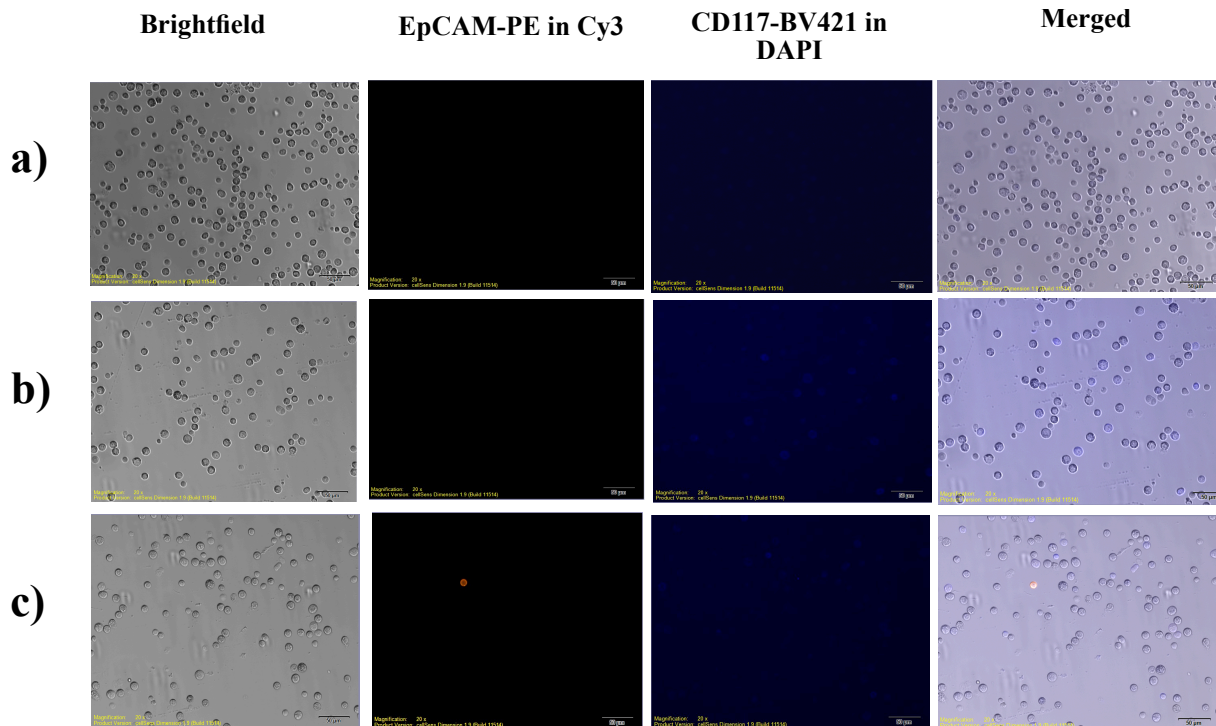


Abbildung 25 Darstellung der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung einer undepletierten M0-Knochenmarkprobe. Zu sehen sind die Ergebnisse der EpCAM, CD117 Färbung in Suspension im Hellfeld, im Cy3-Kanal, im DAPI-Kanal und die Überlagerung der drei Kanäle. In a) eine ungefärbte Probe, in b) die Isotyp-Färbungen (mIgG1-PE, mIgG1-BV421), in c) die Antikörper-Färbung (EpCAM-PE, CD117-BV421) mit einer EpCAM⁺ Zelle. Die Vergrößerung liegt bei 20x. Im Cy3-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 0 (Helligkeit 65, Kontrast 62) gearbeitet. Bei DAPI mit Belichtungszeit 1s, Gain 18 (Helligkeit 50, Kontrast 50). Skala 50 µm.

Weiterhin zur Auswahl stand Alexa Fluor 488 (FITC). Mit dem CD117-AF488 Antikörper wurde erneut undepletiertes KM einer Mammarkarzinom-Patientin gefärbt. Die ungefärbte Probe sowie die Isotyp-Kontrolle fielen negativ aus. Die gefärbte Probe zeigte CD117⁺ Zellen. Trotz der recht hohen Hintergrundfärbung konnten positive Zellen deutlich erkannt werden. Um die Positivität dieser im Knochenmark befindlichen Zellen weiter zu prüfen, wurden CD117⁺ endotheliale Progenitorzellen (EPC) als Positivkontrolle gefärbt. Die Färbungsintensitäten von Kontrollzellen und Knochenmarkzellen stimmten überein (Abbildung 31). Das Fluorochrom wurde somit für weitere Experimente gewählt (Abbildung 26).

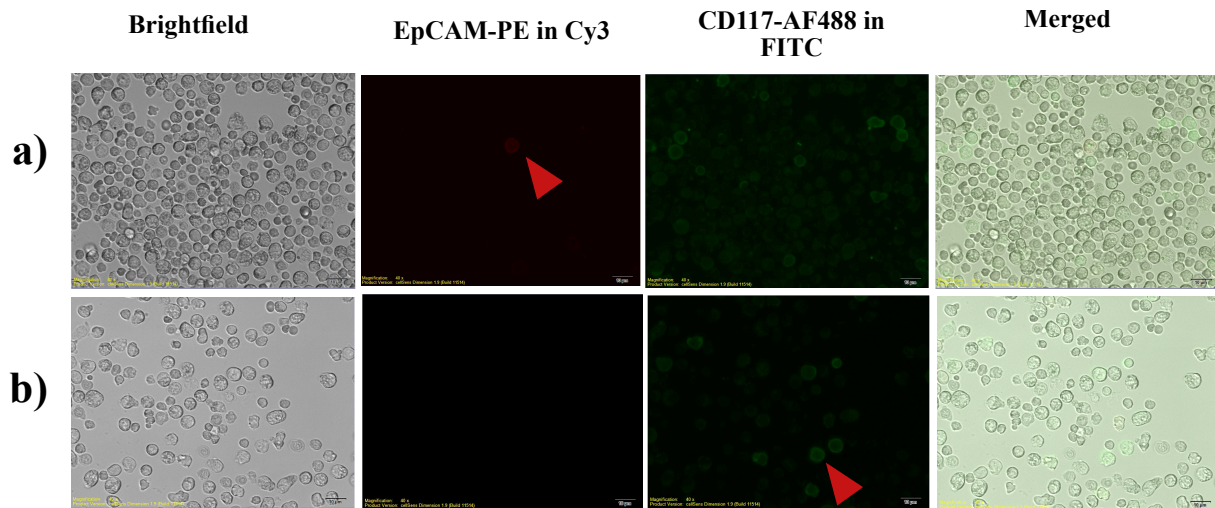


Abbildung 26 Ergebnisse der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung einer M0-Knochenmarkprobe. Zu sehen sind die Ergebnisse der EpCAM, CD117 Färbung in Suspension im Hellfeld, im Cy3-Kanal, im FITC-Kanal und die Überlagerung der drei Kanäle. In a) eine EpCAM⁺, CD117⁻ Zelle, welche nur ein Signal im Cy3-Kanal aufweist. In b) mehrere EpCAM⁺, CD117⁺ Zellen, welche im FITC-Kanal ein positives Signal zeigen. Die Vergrößerung liegt bei 40x. Im Cy3-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 0 (Helligkeit 65, Kontrast 62) gearbeitet, im FITC-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 10 (Helligkeit 80, Kontrast 72). Skala 50 µm.

4.2.1.1 Kontrolle der Überlappung der Fluoreszenzkanäle

Da die Emissionsspektren von PE und AF488 leicht überlappen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine positive Färbung von EpCAM-PE im Cy3-Kanal auch zu einer Färbung im FITC-Kanal führt. Somit würden alle EpCAM^{high} Zellen auch ein Signal im FITC-Kanal auslösen, unabhängig von der CD117-Expression der Zellen.

Um dies auszuschließen, wurde mit einer EpCAM^{high} Zelllinie eine Kontrolle erstellt. Dazu wurde die Brustkrebszelllinie MCF7 ausschließlich mit EpCAM-PE gefärbt. Die Zellen zeigten nur eine schwache Färbung im FITC-Kanal (Abbildung 27).

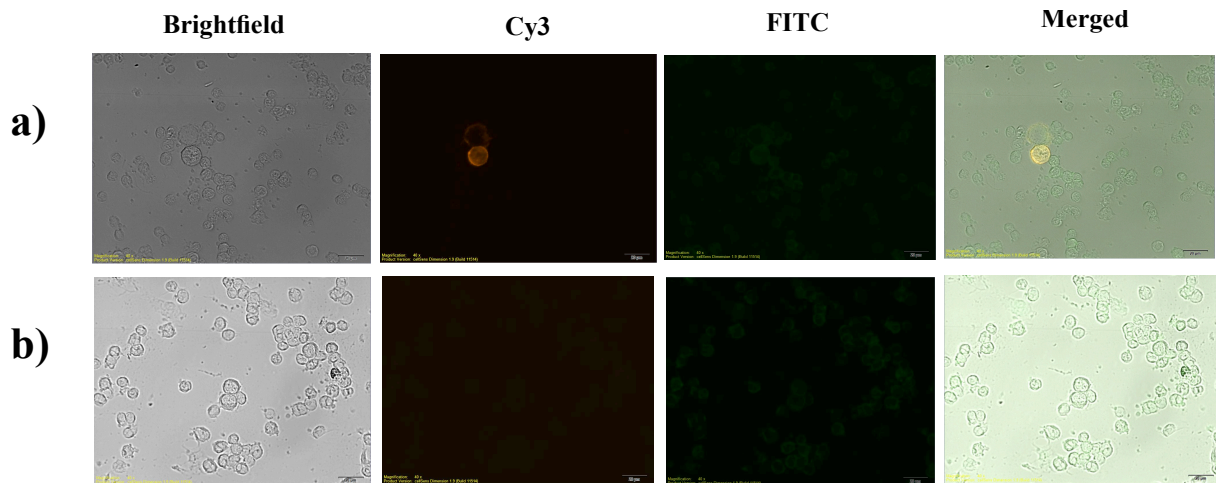


Abbildung 27 Kontrolle der Überlappung der Immunfluoreszenzkanäle Cy3 und FITC. In a) zu sehen sind die Ergebnisse der EpCAM IF-Färbung im Hellfeld, im Cy3-Kanal, im FITC-Kanal und die Überlagerung der drei Kanäle. Dabei wurde die stark EpCAM-positive MCF7-Zelllinie auf HOTS gefärbt. In b) zu sehen ist die Kontrolle in Form von ungefärbten MCF7-HOTS. Die Vergrößerung liegt bei 40x. Im Cy3-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 0 (Helligkeit 65, Kontrast 62) gearbeitet, im FITC-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 10 (Helligkeit 80, Kontrast 72). Skala 50 µm.

Dabei wurde deutlich, dass die Zellen hierbei nicht das gleiche Färbungsmuster wie bei der EpCAM-Färbung im Cy3-Kanal aufwiesen, also keine Oberflächenfärbung zu erkennen war. Als Vergleich wurde weiterhin der Hintergrund einer ungefärbten Probe von MCF7-Zellen analysiert und festgestellt, dass die Zellen eine ähnliche Autofluoreszenzintensität wie die EpCAM-gefärbten Proben aufwiesen ($p = 0,23$, Abbildung 28). Die Autofluoreszenz beeinträchtigte die weitere Färbungsetablierung also nicht.

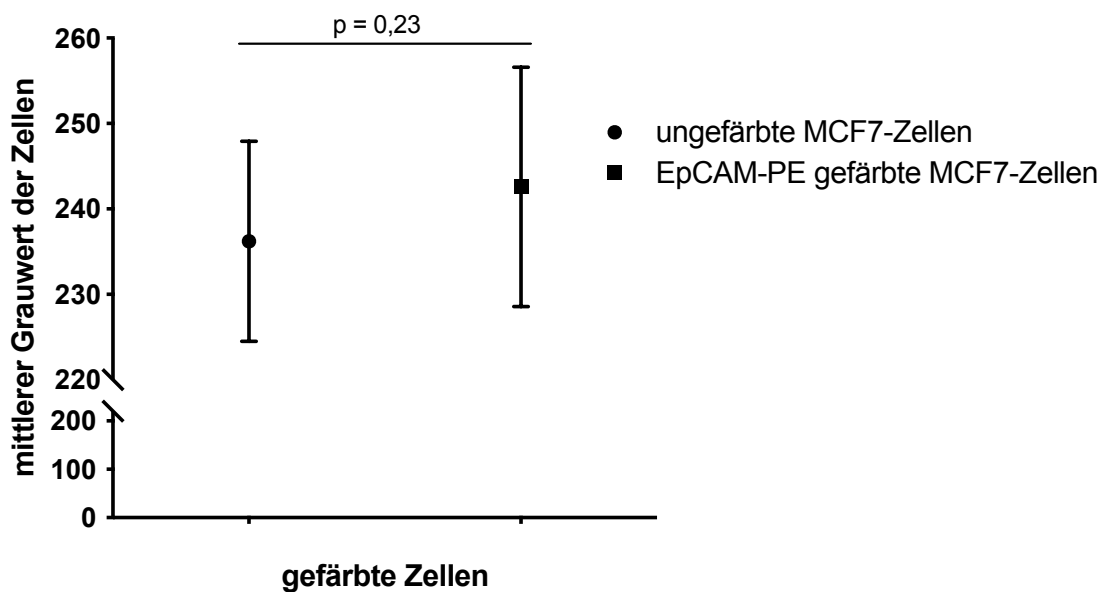


Abbildung 28 Auswertung der IF-Autofluoreszenz der MCF7-Zellen. Zu sehen ist die Auswertung der IF-Färbungsintensitäten im FITC Kanal der MCF7-Zellen mittels der Software ImageJ. Dabei sind die mittleren Grauwerte der ungefärbten Zellen und der EpCAM-gefärbten Zellen vergleichend dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Der p-Wert wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

Weiterhin wurde ein ähnlicher Versuch mit CD117⁺ Endothelial Progenitorzellen (Endothelial Progenitor Cells, EPCs) durchgeführt, um auszuschließen, dass eine CD117-AF488 Färbung zu falsch positiven Signalen in anderen Kanälen führt. Dabei war keine Färbung im Cy3-Kanal zu erkennen (Abbildung 29).

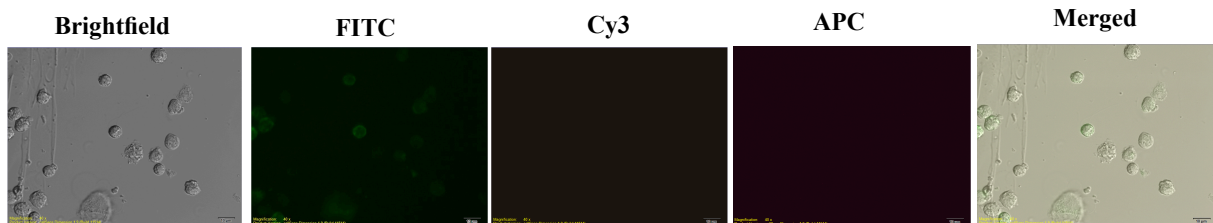


Abbildung 29 Kontrolle der Überlappung der Immunfluoreszenzkanäle FITC, Cy3 und APC. Zu sehen sind die Ergebnisse der CD117- IF Färbung im Hellfeld, im FITC-Kanal, im Cy3-Kanal, im APC-Kanal und die Überlagerung der vier Kanäle. Dabei wurden die stark CD117-positiven EPCs in Suspension gefärbt. Die Vergrößerung liegt bei 40x. Im Cy3-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 0 (Helligkeit 65, Kontrast 62) gearbeitet, im FITC-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 10 (Helligkeit 80, Kontrast 72), im APC-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 18 (Helligkeit 50, Kontrast 50). Skala 50 μ m.

Um auch die Anwendbarkeit einer möglichen Markerkombination mit CD27/CD319-AF647 zu ermöglichen, wurden ebenfalls die Signale der PE und AF488 Färbung im APC-Kanal geprüft, welche negativ ausfielen. Die Färbung einer CD27/CD319⁺ Zelle wies kein Signal im Cy3-Kanal auf und eine schwache Färbung im FITC-Kanal, welche aber mit der Autofluoreszenz der Zellen vereinbar war (Abbildung 30).

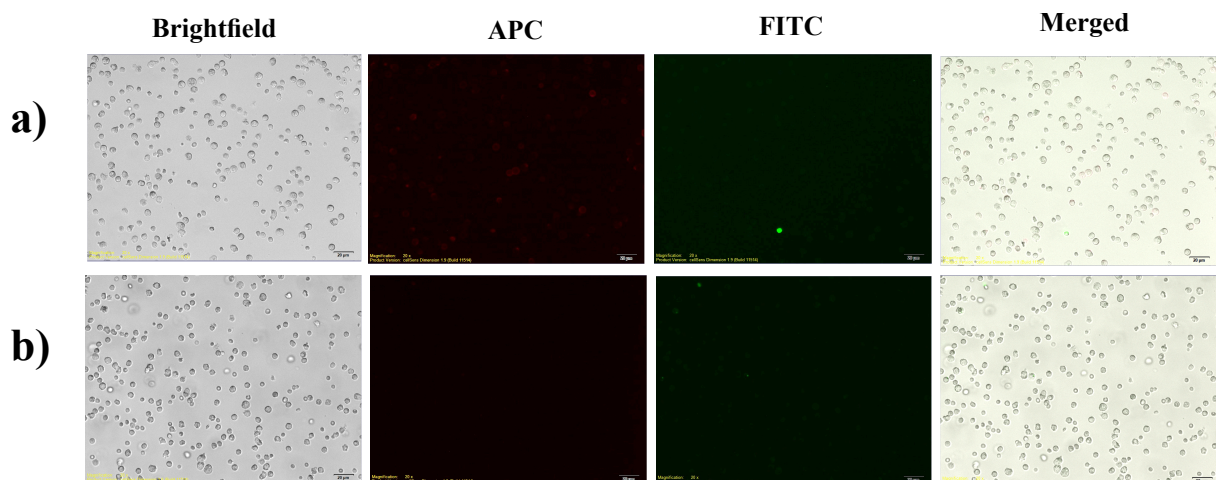


Abbildung 30 Kontrolle der Überlappung der Immunfluoreszenzkanäle APC und FITC. In a) zu sehen sind die Ergebnisse der CD27/319 IF-Färbung im Hellfeld, im APC-Kanal, im FITC-Kanal und die Überlagerung der drei Kanäle. Dabei wurde das undepletierte Knochenmark mit CD27/319-AF647 gefärbt. In b) zu sehen ist die Kontrolle in Form von ungefärbten undepletierten Knochenmarkszellen. Die Vergrößerung liegt bei 20x. Im APC-Kanal wurde mit Belichtungszeit 1s, Gain 18 (Helligkeit 50, Kontrast 50) gearbeitet, im FITC-Kanal mit Belichtungszeit 1s, Gain 10 (Helligkeit 80, Kontrast 72). Skala 50 μ m.

Neben den ungefärbten Proben wurde jedes Mal eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt, welche negativ verblieb.

Somit ist die Überlappung der Emissionsspektren nicht relevant für die Beurteilung der Färbung am Olympus Mikroskop IX81 und es kommt nicht zu einem falsch positiven Signal in den Kanälen.

4.2.2 EpCAM-PE/CD117-AF488-Doppelfärbung auf Knochenmarkproben von Mammakarzinom-Patientinnen

Da in 4.2.1.1 ausgeschlossen werden konnte, dass die Emissionsspektren überlappen oder es zu unspezifischen Bindungen kommt, wurden im weiteren Verlauf Knochenmarkproben mit EpCAM-PE und CD117-AF488 gefärbt.

Dabei wurden nur zwei KMP von M0-Patientinnen gefärbt und depletierter und undepletierter Zustand verglichen. Dabei wurden je Färbung eine ungefärbte Probe, die Isotyp-Kontrolle sowie eine Positivkontrolle (CD117⁺ EPCs) mitgeführt. Hinsichtlich der CD117-Färbung wurden die Färbungsintensitäten quantifiziert. Dazu wurde eine Auswertung der Zellen mit der Software ImageJ durchgeführt. Dies erfolgte, wie im Absatz 4.1.1.2 beschrieben. Es war dabei festzustellen, dass zwischen der Antikörper- und Isotyp-Färbung signifikant unterschiedliche Färbungsintensitäten auftraten, sowohl bei der mitgeführten Positivkontrolle als auch bei den gefärbten Knochenmarkproben ($p < 0,0001$). Des Weiteren wurde deutlich, dass die Intensität der Knochenmark-Färbung der Intensität der Positivkontrolle folgte (KM (depletiert): $p = 0,26$ und KM (undepletiert): $p = 0,08$). Ein signifikanter Unterschied wird jedoch bei der Intensität von depletiertem und undepletiertem Knochenmark deutlich. Dabei wiesen Zellen des depletierten Knochenmarkes eine höhere Färbungsintensität auf als Zellen des undepletierten Knochenmarks ($p = 0,01$). Ein möglicher Grund dafür könnte die Depletion selbst sein, durch welche die Zellzahl insgesamt verringert wird und somit die Zielzellen stärker gefärbt werden können (Abbildung 31).

Im Knochenmark der zwei Spenderinnen konnten zahlreiche EpCAM⁻, CD117⁺ Zellen gefunden werden. Nur eine EpCAM⁺, CD117⁻ Zelle war zu finden. Die Färbung und das Auffinden von EpCAM⁺, CD117⁺ Zellen ist ausstehend. Ebenso die Anwendung einer Färbung mit EpCAM, CD117 und CD27/CD319 auf weiteren Knochenmarkproben.

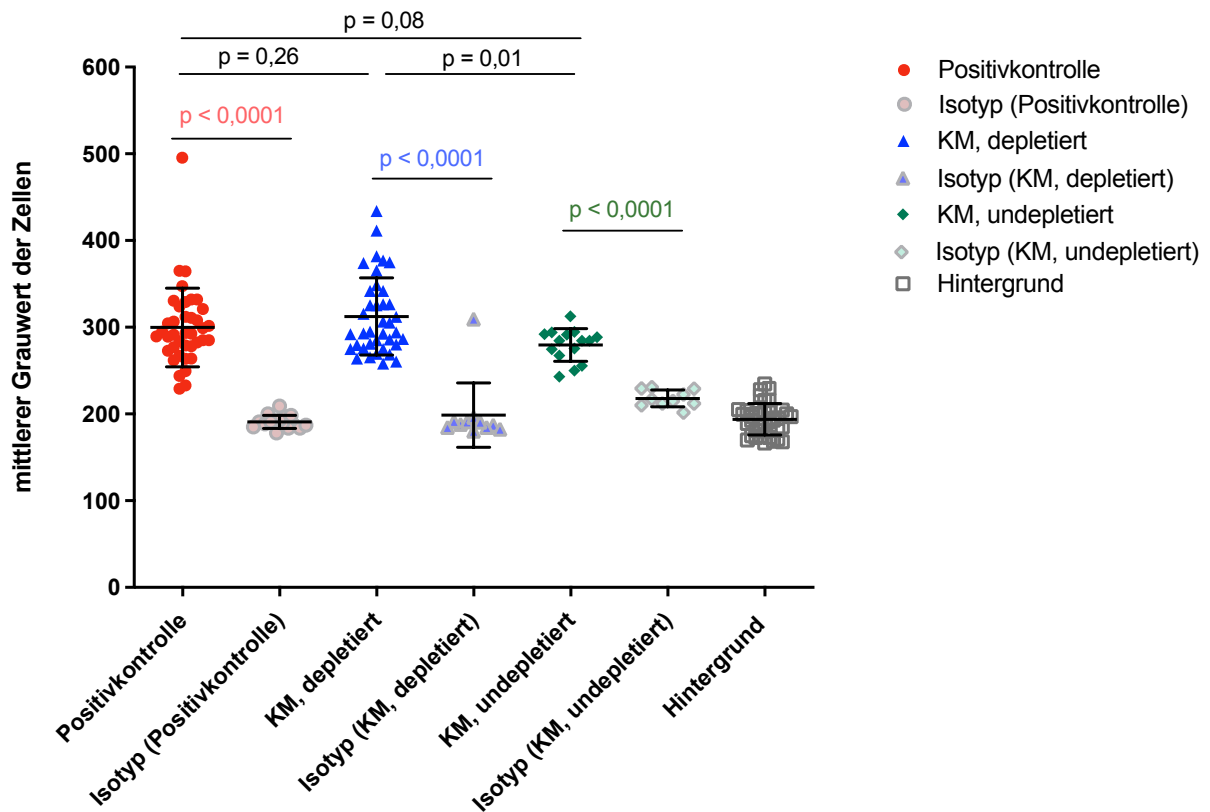


Abbildung 31 Auswertung der EpCAM, CD117 Immunfluoreszenzfärbung von undepletierten und depletierten M0-Knochenmarkproben hinsichtlich der Intensität der Antikörper- und Isotypfärbungen. Zu sehen ist die Auswertung der Färbungsintensitäten der EpCAM, CD117 gefärbten Zellen mittels der Software ImageJ. Dabei sind sowohl die Färbungsintensitäten der Antikörper- und Isotypfärbung vergleichend dargestellt, als auch die Färbungsintensitäten der Positivkontrolle (CD117·EPCs) und des undepletierten und depletierten Knochenmarkes. KM steht für Knochenmark. Das Streudiagramm zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet.

5. Diskussion

Metastasen stellen mit über 90 % die häufigste krebsbedingte Todesursache dar (Valastyan und Weinberg, 2011). Dabei bilden die disseminierten Krebszellen (Disseminated Cancer Cell, DCC) die Vorläuferzellen der Metastasen (Sosa et al., 2014; Hosseini et al., 2016) und sind oft schon im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen zu finden, obwohl diese noch keine klinischen und histopathologischen Anzeichen einer Metastasierung aufweisen (Pantel, Woelfle, 2004). Die frühe Erkennung dieser disseminierten Zellen ist somit sowohl für die Krankheitsprognose als auch Therapieauswahl wichtig, da das Auftreten von DCCs mit einer erniedrigten Überlebensrate, einem höheren Tumorgrad, einer schlechteren Differenzierung, und dem Auftreten von Lymphknoten-Metastasen korreliert (Braun et al., 2005). Eine große Herausforderung stellt gegenwärtig noch die genaue Identifikation der DCCs dar. Dafür ist das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM, welches derzeit als Marker zur Detektion der DCCs verwendet wird, nicht völlig spezifisch und sensitiv, da es bei Brustkrebs EpCAM-negative DCCs sowie EpCAM-positive gesunde Zellen im Knochenmark gibt (Klein et al., 2002). Auch in gesunden Patienten können EpCAM⁺ Zellen gefunden werden (Gužvić et al. 2014).

Cackowski et al. stellen in diesem Kontext heraus, dass es sich bei Zellen, welche die Population der EpCAM-positiven putativen DCCs verunreinigen, um Plasmazellen bzw. Zellen der B-Zelllinie handeln könnte (Cackowski et al. 2019). In der Vorarbeit des Lehrstuhls kam es in Folge dieser Annahme zu einer Charakterisierung der sogenannten EpCAM-positiven Nicht-Krebszellen (NCC). Es konnte dabei gezeigt werden, dass die potentiellen NCCs eine B-Zell Signatur aufweisen (Abbildung 32). Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die erfolgreiche Verwendung der Oberflächenmarker CD27 und CD319, welche auf zahlreichen Immunzellen (u.a. Plasma- und B-Zellen) zu detektieren sind, zum Ausschluss der unerwünschten NCCs.

Zellen, die in der Durchflusszytometrie als EpCAM^{high+/CD45+} identifiziert wurden und daher vermutlich NCCs darstellen, zeigten signifikant häufiger die Expression der Immunmarker CD27 und CD319 im Vergleich zu Zellen, die als EpCAM^{high+/CD45-} klassifiziert wurden und somit gemäß unserer Definition DCCs waren (Damböck, A., 2022). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher mögliche Markerkombinationen mit u.a. EpCAM und CD27/CD319 auf ihre Eignung zur Abgrenzung der NCCs von den DCCs mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

5.1 Charakterisierung von DCCs und NCCs mittels Immunfluoreszenzfärbung

5.1.1 Verwendung von CD27 und CD319 zur Charakterisierung von NCCs

Um weitere Marker zu finden, wurden Zellen von M0- und Kontrollpatienten, welche eine hohe EpCAM-Expression in der Immunfluoreszenzfärbung aufwiesen (EpCAM^{high}), sequenziert. Laut bisheriger Erkenntnisse ist das Vorkommen von Zellen mit einer hohen EpCAM Expression im Patienten nicht nur mit einer verminderten Gesamtüberlebensrate assoziiert (Spizzo et al., 2004), es konnte auch festgestellt werden, dass EpCAM^{high} Zellen ein hohes Proliferationspotenzial aufweisen (Balzar et al., 1999). Diese Erkenntnis konnte auch in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigt werden, in welchen gezeigt wurde, dass EpCAM⁺ Zellen vermehrt die Proliferationsmarker *MKI67* oder *MCM2* auf Transkriptelevone exprimierten (Irlbeck, C., 2019). Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen vermuteten wir die größte Fraktion an echten DCCs unter den EpCAM⁺ Zellen, sodass diese Zellen, wie in 1.2.3 beschrieben, auch als Grundlage zur RNA-Sequenzierung verwendet wurden. Die Marker CD27 und CD319 fanden sich, als herausstechende Kandidaten, überexprimiert in den EpCAM⁺ Zellen der Kontrollpatienten und sollten somit als Ausschlussmarker verwendet werden. Diese Erkenntnisse konnten auch in der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden. In 100 % der Fälle waren EpCAM⁺ Zellen der Kontrollpatienten auch positiv auf CD27 und CD319.

In der vorliegenden Arbeit waren nur 42,5 % der gefundenen EpCAM⁺ Zellen von Krebspatienten negativ auf CD27 und CD319, also vermutlich echte DCCs. Diese Färbungsergebnisse korrelieren auch mit Vorergebnissen des Lehrstuhls, in welchen 45,8 % der gescreenten EpCAM⁺ Zellen ein aberrantes Genom aufwiesen und damit vermutlich Metastasen bildende Krebszellen waren (Irlbeck, C., 2019). An dieser Stelle bleibt zu erwähnen, dass eine mögliche Schwachstelle der stattgefundenen Analysen zur Auswahl möglicher Kandidatenmarker die hauptsächliche Fokussierung auf die EpCAM^{high} Zellen ist. Gerade im Hinblick auf das Konzept der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT), bei welcher Zellen zu Beginn des Metastasierungsprozess ihr epitheliales Erscheinungsbild herunterregulieren und mesenchymale Stammzeleigenschaften erwerben, scheint eine alleinige Betrachtung der EpCAM^{high} Zellen als zu einseitig (Thiery et al., 2009). Eine mögliche Population an EpCAM^{low/-} DCCs bliebe somit unentdeckt.

Die EMT ist ein kontinuierlicher Vorgang, in welchem sich Zellen in verschiedenen Entwicklungsstufen und Zuständen befinden. So konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells, CTC) vom

epithelialen Typ in Brust- und Prostatakrebs mehr Metastasen bilden als Zellen mesenchymalen Typs (de Wit et al., 2018). Dies würde wiederum unterstützen, die Detektion dieser metastasenbildenden Fraktion mittels epithelialer Marker durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit konnte dazu gezeigt werden, dass 76,5 % der Patientinnen mit mindestens einer EpCAM⁺ Zelle im Knochenmark einen N1-3 Nodalstatus aufwiesen, hingegen nur 50,0 % der Patientinnen, bei welchen keine EpCAM⁺ Zelle im Knochenmark gefunden werden konnte (Absatz 8.2). Patientinnen mit EpCAM⁺ Zellen befinden sich also schon in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung, weisen somit ein stärker proliferierendes und prognostisch ungünstigeres Tumorwachstum auf.

Die Mehrheit der gefundenen EpCAM⁺ Zellen (57,5 %) waren ebenfalls positiv auf CD27 und CD319 und damit vermutlich NCCs. Somit erscheint der Ansatz, EpCAM⁺ Zellen nochmals nach ihrer Expression von CD27/CD39 zu unterteilen sinnvoll, um unerwünschte EpCAM⁺ Zellen auszuschließen und die Detektion von echten DCCs zu erleichtern.

5.1.2 Verwendung von cKIT/CD117 zur Charakterisierung von DCCs

Nachdem CD27 und CD319 als mögliche Negativmarker zum Ausschluss unerwünschter EpCAM⁺ Zellen identifiziert werden konnten, sollten weiterhin auch Positivmarker zur Verwendung kommen, welche DCCs verlässlich detektieren können. Wie in 1.2.3 beschrieben, wurde dabei in Vorarbeiten die Tyrosinkinase *cKit* in Zellen von M0-Spenderinnen auf Transkriptebene hochreguliert gefunden. *CKit* ist charakteristisch für luminale Vorläuferzellen. Dabei stellen luminale Vorläuferzellen die letzte gemeinsame Vorstufe von dreifach negativen, basalähnlichen und hormonrezeptorpositiven Krebsarten dar. Zellen mit diesem Phänotyp gehören zu den Metastasen-Gründerzellen von EpCAM-positiven, dreifach negativen und Hormonrezeptor-positiven Krebsarten (Fu et al., 2020). Weiterhin ist in diesem Kontext zu erwähnen, dass in CTCs von Prostatakarzinompatienten gezeigt werden konnte, dass ein Auffinden von cKIT⁺ Zellen mit einer verminderten Überlebensrate und einer erhöhten Proliferation sowie Migration korreliert ist (Harris et al., 2021). Da es sich bei Prostatakrebs genau wie bei Brustkrebs um ein Karzinom handelt, könnte eine Übertragung der Ergebnisse auf diese Arbeit möglich sein.

Somit scheint es naheliegend, dass unsere Zielzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen auch auf Proteinebene CD117 (von *cKIT* codiertes Oberflächenprotein) überexprimieren und damit in Kombination mit EpCAM eine Detektion der echten DCCs möglich ist.

Gerade im Hinblick auf die Verwendung einer Markerkombination mit EpCAM muss aber auch in diesem Zusammenhang kritisch erwähnt werden, dass u.a. beim adenoidzystischen Karzinom der Speicheldrüse beobachtet wurde, dass das Vorkommen von *cKit* mit einer vermehrten EMT einhergeht, also vermutet wird, dass *cKit* diesen Prozess anregt (Tang et al., 2014). Dabei bleibt fraglich, ob und wie sehr die Zielzellen dann noch EpCAM exprimieren, eine Kombination der beiden Marker also sinnvoll ist. In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst eine EpCAM/CD117- Doppelfärbung etabliert werden. Das Auffinden von EpCAM⁺/CD117⁺ Zielzellen ist jedoch ausstehend. Ebenfalls könnte eine Erweiterung der Markerkombination um CD27/CD319 sinnvoll sein, um genauer zwischen DCCs und NCCs in der Immunfluoreszenzfärbung zu unterscheiden.

5.2 Charakterisierung von DCCs und NCCs mittels qPCR

5.2.1 Nachweis des *EpCAM*-Transkriptes in DCCs und NCCs in der qPCR

Nachdem Zellen mit 1) einem EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Phänotyp, 2) einem EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Phänotyp und 3) einem EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Phänotyp mittels Immunfluoreszenzmikroskopie isoliert wurden, wurden diese einer qPCR unterzogen, um sie auf das Vorkommen verschiedener Transkripte zu untersuchen. Dabei fiel in vorliegender Arbeit besonders auf, dass nur 46,4 % der Zellen mit einem EpCAM⁺ Phänotypen auch das *EpCAM*-Transkript aufwiesen. In Vorarbeiten konnte beobachtet werden, dass nur 20 % der EpCAM⁺ Zellen aus Lymphknoten beziehungsweise 80 % der EpCAM⁺ Zellen aus dem Knochenmark von M0 NSCLC-Patienten das *EpCAM*-Transkript aufwiesen (Mederer, T., 2021). Auch Massoner et al. konnten im Prostatakarzinom zeigen, dass die *EpCAM* mRNA in malignen Geweben (im Vergleich zu normalem Stroma) nur 2,5-fach erhöht war, wohingegen das Protein eine fast 17-fach höhere Expression zeigte. Es wäre daher denkbar, dass sich die Zellen in einem anderen Stadium der EMT oder des Zellzyklus befinden und somit *EpCAM* nicht mehr aktiv transkribieren, der Nachweis des Proteins mittels Immunfluoreszenz jedoch aufgrund einer längeren Halbwertszeit noch möglich ist (Massoner et al., 2014).

Dabei ist auch in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass *EpCAM* mRNA-positive Zellen im Lymphknoten zu einem signifikant höheren Anteil Genomaberrationen aufweisen als mRNA-negative Zellen (Mederer, T., 2021). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit noch nicht bestätigt werden. Nur zwei Zellen, welche das EpCAM-Transkript aufwiesen, konnten für die LowPass-Sequenzierung bereitgestellt werden. Diese zeigten ein balanciertes Profil (Absatz 8.5).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Patientinnen, bei welchen CTCs mit nachweisbarer *EpCAM* mRNA detektiert werden können, ein signifikant kürzeres Überleben aufweisen (Guo et al., 2014). Womöglich ist die aktive Transkription der *EpCAM* mRNA mit einem stärker proliferativen und prognostisch ungünstigeren Tumorwachstum verbunden (Chaves-Pérez et al., 2013; Keller, Werner, & Pantel, 2019). Die vorliegende Arbeit liefert dazu leider keine Ergebnisse, da zum verwendeten Patientenkollektiv noch keine Follow-Up Daten vorhanden sind. Auffallend war jedoch, dass 87,5 % der Patientinnen, welche nicht nur das EpCAM-Protein sondern auch das *EpCAM*-Transkript aufwiesen, bereits einen fortgeschrittenen Nodalstatus (N1-3) zeigten (Abschnitt 8.2). Untersuchungen des Lehrstuhls konnten diese Erkenntnisse bereits bestätigen (Mederer, T., 2021). Wie sich jedoch die beschriebene verstärkte Transkription der *EpCAM* mRNA in der Immunfluoreszenz nachweisen lässt, bleibt offen, da zum jetzigen Zeitpunkt eine genaue Unterscheidung verschiedener Intensitäten der Proteinexpression mit der herkömmlichen Immunfluoreszenzmikroskopie nicht möglich ist.

5.2.2 Nachweis des *CD45*-Transkripts in DCCs und NCCs in der qPCR

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls alle Zellen auf ihre CD45-Expression untersucht. CD45 ist ein Marker hämatopoetischer Zellen. Daher würde man keine oder nur eine geringe Expression dieses Markers auf Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen erwarten.

Weiterhin sollten durch die Depletion die in den KMP vorhandenen CD45⁺ Zellen weitestgehend entfernt und so die Tumorzellen im zu untersuchenden Knochenmark angereichert werden. In der vorliegenden Arbeit wies keine der analysierten Zellen das *CD45*-Transkript auf, weder EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen noch EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen. Somit konnte eine Kontamination der Proben mit APC-gefärbten Zellen nach Depletion für die weiteren Analysen ausgeschlossen werden und bei einer Positivität im APC-Kanal des IF-Mikroskops eine CD27/CD319-Proteinexpression angenommen werden (Absatz 4.1.2.2).

Jedoch wurde bereits in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe die *CD45*-Expression von M0-Knochenmarkzellen mittels einer Endpunkt-PCR untersucht. Es konnte dazu herausgefunden werden, dass 13 % der Knochenmarkzellen aus Mammakarzinom-Patientinnen das *CD45*-Transkript exprimierten (Haunschild, 2013). In Prostata-DCCs waren es 19 % (Guzvic et al., 2014) und in NSCLC-Zellen sogar 22,5 % (Mederer, T., 2021). Davon abweichende Werte in der vorliegenden Arbeit könnten durch eine geringe Stichprobenzahl zu erklären sein.

Hinsichtlich der Verwendung der Negativmarker CD27/CD319 wurden M0-Knochenmarkzellen mittels DZM in DCCs und NCCs eingeteilt. Dies geschah mittels der EpCAM- und CD45-Expression der Zellen. Zellen, welche EpCAM^{high}/CD45⁺ waren, stellten damit NCCs dar, EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen DCCs. Dabei konnte bei 45 % der EpCAM^{high} M0-Knochenmarkzellen von Mammakarzinom-Patientinnen eine CD45-Proteinexpression nachgewiesen werden (Damböck, A., 2022).

Diese Ergebnisse spiegelten sich ebenfalls nicht in der Transkriptanalyse der vorliegenden Arbeit wider. Hier könnte, wie bereits erklärt, eine längere Halbwertszeit des Proteins gegenüber der des Transkripts ursächlich sein. Anhand dieser Daten wird jedoch deutlich, dass eine Limitation der Arbeit darin liegt, DCCs und NCCs mittels der CD45-Proteinexpression zu kategorisieren. Dadurch könnten zum einen mögliche EpCAM^{high}/CD45⁺ DCCs depletiert worden sein, zum anderen könnten EpCAM^{high}/CD45⁻ Zellen nur ein unvollständiges Bild hinsichtlich der Charakteristiken von DCCs liefern. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich unter den mutmaßlichen Immunzellen noch EpCAM-negative DCCs befinden, welche Aberrationen tragen (Absatz 5.3).

5.2.3 Nachweis der DCC- und NCC-Signaturgene in DCCs und NCCs in der qPCR

Um die isolierten Zellen weiterhin näher zu charakterisieren, wurden diese neben dem Vorkommen der *EpCAM*- und *CD27/CD319*- Transkripte, noch auf DCC- und NCC-Signaturgene in der qPCR getestet. Dabei wurden in Vorarbeiten des Lehrstuhls *AHSP* und *CAI* überexprimiert in DCCs und *AHNAK* und *JUN* überexprimiert in NCCs gefunden. In einer Trainingskohorte von Zellen, welche vorher mittels CNA-Profilung als bekannt aberrant oder balanciert eingeordnet wurden, konnte gezeigt werden, dass diese Signatur eine Messgenauigkeit von 89 % und eine Missklassifizierungsrate von 11 % aufweist (Irlbeck, C., 2019). Weiterhin ist zur Verwendung der qPCR zu sagen, dass sie eine sehr sensitive Technologie ist, die Transkripte bis hinunter zu nur zehn Kopien genau quantifizieren kann (Androvic et al., 2017). Die qPCR-Signatur dient also einer Vorauswahl an Zellen. Ob die Verwendung einer qPCR-Signatur die LowPass-Sequenzierung ersetzen kann, bleibt weiterhin offen. Eine ergänzende Verwendung von qPCR und LowPass-Sequenzierung erscheint zunächst sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wiesen 50 % der EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen eine DCC-Signatur auf. In der Gruppe der EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen exprimierte dahingegen keine Zelle die DCC-Signatur. In eben dieser Gruppe konnte bei der Mehrheit der Zellen eine NCC-

Signatur nachgewiesen werden. Ausgehend von der Annahme, dass die qPCR-Signatur eine spezifische Klassifikation von DCCs und NCCs ermöglicht, konnte auf Transkriptebene nachgewiesen werden, dass mittels einer EpCAM, CD27/CD319 Immunfluoreszenzfärbung unerwünschte EpCAM⁺ Zellen ausgeschlossen werden können und nur EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen vermutlich echte DCCs darstellen.

Interessanterweise konnte ebenfalls festgestellt werden, dass in allen Gruppen von isolierten Zellen eine große Fraktion in der qPCR undefiniert verblieb, also mit der DCC- und NCC-Signatur nicht eindeutig klassifiziert werden konnten. Dabei handelte es sich bei den EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen um 20 %. Der höchste Anteil mit 40 % fand sich jeweils in den Gruppen der CD27/CD319⁺ Zellen (Abbildung 20). Weitere Experimente sollten hier folgen, um die Ergebnisse genau zu überprüfen, Artefakte auszuschließen und die Identität der betreffenden Zellpopulation zu klären. Dabei konnten erste Erkenntnisse bereits durch die Genomsequenzierung gesammelt werden (Absatz 5.3).

5.3 Charakterisierung von DCCs und NCCs mittels LowPass Genomsequenzierung

Um die Ergebnisse der LowPass-Sequenzierung richtig einzuordnen, sollte man wissen, dass die LowPass-Sequenzierung der Einzelzell-Genome nur die Untersuchung von Kopienzahlveränderungen erlaubt, Punktmutationen und strukturelle Aberrationen bleiben dabei unentdeckt. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum in der vorliegenden Arbeit wenige Zellen Aberrationen aufwiesen. Dabei muss auch erwähnt werden, dass die Stichprobenzahl zu gering ist, um finale Erkenntnisse daraus abzuleiten. Somit konnten auch keine sich wiederholenden Aberrationen detektiert werden, welche typisch für Zellen des Mammakarzinoms sein könnten. Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang festgestellt werden, dass Zellen von M0-Spenderinnen generell weniger Aberrationen aufweisen als Zellen von Spendern mit fortgeschrittener Metastasierung (Haunschild, G., 2013). Gulati et al. konnten dazu herausstellen, dass Zellen mit einem hohen Cytotrace-Score das höchste Proliferationspotential aufweisen (Gulati et al., 2020). Dabei wurde auch in Voruntersuchungen klar, dass vor allem Zellen von M0-Spenderinnen diese hohen Proliferationsmerkmale aufweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass M0-Zellen sich noch als unreife Vorstufen verhalten und sich erst an bevorzugten Metastasierungsorten differenziert entwickeln und dadurch Aberrationen anhäufen. So könnte erklärt werden, warum in vorliegender Arbeit nur 5,4 % (n = 2 von 37) der Zellen Aberrationen trugen.

Zur Auswertung der LowPass-Profile muss auch gesagt werden, dass sie durch eine konsensuelle Beurteilung durch mehrere Experten im Labor erfolgte. Bisher gibt es noch keinen automatisierten Algorithmus, welcher objektiv und standardisiert die Zellen in balanciert und aberrant klassifiziert. Eine objektive Beurteilung der Profile bleibt damit weiterhin ausstehend. Es ist ebenfalls zweifelhaft, ob eine objektive Auswertung der Profile überhaupt jemals möglich sein wird, da diese immer mit einer gewissen Unschärfe behaftet sind.

Außerdem wurden in vorliegender Arbeit zum einen Zellen für die LowPass-Sequenzierung verwendet, welche aus den WTA-Überständen aufgearbeitet wurden (Absatz 3.5). Dies sollte der vergleichenden Transkriptom- und Genomanalyse von ein und derselben Zelle dienen. Zum anderen wurden Zellen genutzt, welche frisch isoliert wurden und ohne vorherige Aufarbeitungsschritte direkt für die Sequenzierung bereitgestellt werden konnten (Absatz 3.6). Zwischen den erhaltenen CNV-Profilen der Überstandszellen und der frischen Zellen ergab sich jedoch ein Qualitätsunterschied. Es mussten deutlich mehr Profile von Überstandszellen ausgeschlossen werden, da ihre Qualität nicht den gestellten Anforderungen entsprach ($p < 0,0001$). Da der Aufarbeitungsprozess von der Zellisolierung über die WTA bis hin zur LowPass-Library mehrere Zwischenschritte beinhaltet und es an jedem Punkt, trotz höchster Vorsicht, zu weiteren Einflüssen und Manipulationen auf und an der Zelle kommen kann, ist dies nicht verwunderlich. Ein größeres Kollektiv hätte die qualitätsbedingten Ausfälle ausgleichen können, konnte aber in vorliegender Arbeit nicht bereitgestellt werden. Ein Vergleich zwischen Transkriptom und Genom einer Zelle in vorliegender Arbeit nur bedingt geleistet werden.

Zusammenfassend war trotz allem auffallend, dass in den Gruppen der EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen und der EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen keine Aberrationen nachgewiesen wurden, jedoch die Immunzellen in 18,2 % der Fälle Aberrationen trugen. Dazu kommt, wie in 5.2 bereits erwähnt, dass auch eine große Fraktion der Immunzellen in der qPCR-Signatur undefiniert verbleibt, also nicht sicher einer DCC- oder NCC-Signatur zugeordnet werden kann. Auch diese Zellen mit undefinierten Signaturen trugen in 20,0 % der Fälle Aberrationen. Gerade durch die hohe Rate an Aberrationen und undefinierten qPCR-Ergebnisse in der Gruppe der EpCAM-negativen Zellen könnte diese Erkenntnis auch ein weiteres Indiz dafür sein, dass eine Detektion von DCCs basierend auf der alleinigen Verwendung von EpCAM nicht ausreichend ist, da eine große Population an potentiellen Krebszellen damit unentdeckt bleibt.

Bei der Betrachtung der Gütekriterien fällt auf, dass die Spezifität und der negative Prädikationswert der etablierten Färbung recht hoch sind. Somit eignet sich die Färbung gut zum Ausschluss der ungewollten NCCs.

Trotzdem muss die Stichprobe weiterhin vergrößert werden, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

5.4 Limitationen der Arbeit

Eine große Limitation der Arbeit stellt die zu geringe Zahl an Brustkrebsproben dar. Auch wenn erste Ergebnisse abgeleitet werden können, müssen diese im Rahmen zukünftiger Projekte mit mehr Material überprüft werden. So konnten für die vorliegende Arbeit 33 Proben von M0-Patientinnen bearbeitet und 146 Zellen für weitere Schritte isoliert werden. Für diese niedrigen Zahlen gibt es zwei Hauptgründe: Zum einen willigt nicht jede Patientin in eine Knochenmarkspende ein oder die Punktion verläuft frustan, zum anderen lief durch die Corona-Pandemie die Probenzustellung zunächst nur langsam an.

Weiterhin ist in diesem Kontext zu erwähnen, dass nicht in jeder Probe auch Zellen für weitere Analysen gefunden werden können oder deren Qualität ausreichend gut ist. Somit musste in dieser Arbeit mit einer hohen Ausfallquote gerechnet werden.

Auch die geringe Zahl an Kontrollknochenmark ist als Limitation zu erwähnen. Gerade um Negativmarker zu validieren, sollte ein Vergleich zwischen Krebs- und Kontrollproben angestrebt werden. Die RNA-Sequenzierung, bei welcher CD27 und CD319 identifiziert wurden, beinhaltete einen Vergleich von Brustkrebs- und Kontrollpatientinnen, weshalb auch die Validierung dieser Marker vergleichend stattfinden sollte. Durch eine geringe Anzahl an Patienteneinwilligungen und die Abhängigkeit vom Auffinden der entsprechenden Zielzellen konnten in vorliegender Arbeit nur sechs Proben bearbeitet und 15 Zellen daraus isoliert werden.

Vorangehend erwähnte Punkte bereiteten auch bei der Etablierung der EpCAM/CD117-Doppelfärbung Probleme. So konnte diese nur anhand von zwei Knochenmarkproben validiert werden, daher lassen sich Ergebnisse daraus noch nicht ableiten.

Eine weitere Limitation stellt die Filtersetausstattung des verwendeten Mikroskops und die damit schwierige Objektivierbarkeit der Immunfluoreszenzfärbung dar.

Beide Marker CD319 und CD27 wurden auf das Fluorochrom AF647 gelegt und sind damit im APC-Kanal sichtbar. Somit kann bei einer positiven Zelle nicht unterschieden werden, für welchen der beiden Marker die Zelle positiv ist. Da die Färbung nach der Depletion stattfindet, die mit APC-konjugierten Antikörpern durchgeführt wird, kann eine positive Zelle zusätzlich auch für CD11b, CD33 oder CD45 positiv sein. Da alle diese Marker jedoch Ausschlussmarker sind und die positive Zelle damit mutmaßlich keine DCC ist, sind dadurch keine negativen Konsequenzen für die Effektivität des Färbekonzepts zu erwarten.

6. Zusammenfassung

Brustkrebs ist die weltweit am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Frauen. Haupttodesursache sind dabei die Metastasen, welche sich beim Mammakarzinom häufig nach der Primärtumorentfernung bilden. Die disseminierte Krebszellen (DCC) stellen dabei den Ausgangspunkt der Metastasenbildung dar und befinden sich oft schon lange vor Metastasenbildung im Knochenmark der Patientinnen. Da ihre Anwesenheit mit schlechten klinischen Parametern und einer verringerten Überlebensrate korreliert, ist die sichere Detektion der DCCs von großer Bedeutung. Dies geschieht bisher mittels des Oberflächenmarkers EpCAM, welcher jedoch nicht spezifisch genug ist. So lassen sich auch EpCAM⁺ Nicht-Krebszellen (NCC) und EpCAM⁻ Krebszellen finden. Durch Vermutungen, welche nahelegen, dass es sich bei den NCCs um Plasma- oder B-Zellen handeln könnte, wurden in Vorarbeiten des Lehrstuhles die beiden weiteren Oberflächenmarker CD27 und CD319 zur näheren Charakterisierung dieser NCCs betrachtet (Absatz 8.3). Es konnte in der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass NCCs signifikant häufiger CD27 und CD319 exprimierten als mutmaßliche DCCs.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels EpCAM, CD27 und CD319 eine Immunfluoreszenzfärbung angewendet, mit deren Hilfe ein spezifischeres Screening des Knochenmarks von M0-Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärtumorentfernung gewährleistet werden kann. Es wurde dafür Knochenmark von M0-Patientinnen mit entsprechenden Markern gefärbt und Zellen mit drei verschiedenen Phänotypen: 1) EpCAM⁺, CD27/CD319⁻, 2) EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und 3) EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie isoliert. Diese wurden dann zunächst in einer qPCR auf das Vorkommen der *EpCAM*-, *CD27*-, und *CD319*- Transkripte untersucht und im weiteren Verlauf auf DCC- und NCC-Signaturgene getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass in EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen signifikant häufiger das *EpCAM*-Transkript nachweisbar war als in EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen. Das Vorkommen des *EpCAM*-Transkriptes neben dem Protein ist assoziiert mit einer verringerten Überlebensrate. Ebenfalls exprimierten die EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen häufiger die DCC-Signaturgene als die EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen. Mit Hilfe der Kopienzahlanalyse mittels LowPass Genomsequenzierung wurden die Zellen weiter untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass in vorliegender Arbeit weder EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen noch EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen Aberrationen trugen. Überraschenderweise wiesen EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen

Aberrationen auf. Somit kann diese Arbeit weitere Indizien liefern, dass eine große Population von Krebszellen mit alleiniger Verwendung des EpCAM-Markers unentdeckt bleibt. Zellen, welche die Population der EpCAM positiven putativen DCCs verunreinigen, könnten mit der Anwendung einer EpCAM-, CD27/319- Doppelfärbung weitgehend isoliert und für weitere Anwendungen ausgeschlossen werden. Die Hinzunahme eines weiteren Markers könnte weiterhin die spezifischere Detektion der echten Krebszellen ermöglichen. cKit scheint dabei ein vielversprechender Kandidat zu sein. In jedem Fall sind jedoch weitere Untersuchungen anzuschließen.

Die sichere Detektion von möglichen DCCs im Knochenmark von M0-Mammakarzinom-Patientinnen ist von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnten die Marker CD27 und CD319 auf Protein-, Transkriptom- und Genomebene untersucht werden. Dabei konnten Hinweise geliefert werden, dass durch eine Verwendung dieser Ausschlussmarker zusätzlich zu der EpCAM-basierten Detektion von Tumorzellen, verunreinigende Zellen ausgeschlossen werden können. Weitere Untersuchungen, um Tumorzellen sicher detektieren zu können, müssen jedoch noch erfolgen. Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit maßgeblich dazu bei, die Analysen und die weiteren Charakterisierungen der Tumorzellen zeit- und kosteneffizienter zu gestalten sowie die Erkennung von Patientinnen, mit hohem Metastasierungspotential zu verbessern.

7. Literaturverzeichnis

Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2443–59.

Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Zaman Huri H, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *DDDT.* August 2016;Volume 10:2443–59.

Agerbæk MØ, Bang-Christensen SR, Yang M-H, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, u. a. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun.* Dezember 2018;9(1):3279.

Agerbæk MØ, Bang-Christensen SR, Yang M-H, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, u. a. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun.* Dezember 2018;9(1):3279.

Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* November 2007;7(11):834–46.

Androvic, P., Valihrach, L., Elling, J., Sjoback, R., and Kubista, M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic acids research.* 6 September 2017;15(45): e144.

Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, u. a. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 1. Oktober 2006;12(19):5615–21.

Banys M, Krawczyk N, Fehm T. The role and clinical relevance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Cancers (Basel).* 15. Januar 2014;6(1):143–52.

Banys-Paluchowski M, Schneck H, Blassl C, Schultz S, Meier-Stiegen F, Niederacher D, u. a. Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* März 2015;75(3):232–7.

Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.* März 2011;17(3):320–9.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, u. a. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 25. August 2005;353(8):793–802.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* November 2018;68(6):394–424.

Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell.* April 2004;5(4):365–74.

Cackowski FC, Wang Y, Decker JT, Sifuentes C, Weindorf S, Jung Y, u. a. Detection and isolation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Prostate.* 2019;79(14):1715–27.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* August 2002;2(8):563–72.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, u. a. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 20. Mai 2009;101(10):736–50.

Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res.* 1. April 1999;59(7 Suppl):1752s–6s.

Chen X, Liu Q, Song E. Mammary stem cells: angels or demons in mammary gland? *Sig Transduct Target Ther*. April 2017;2(1):16038.

Cho ES, Kang HE, Kim NH, Yook JI. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Arch Pharm Res*. Januar 2019;42(1):14–24.

Choesmel V, Anract P, Høifødt H, Thiery J-P, Blin N. 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. *Cancer*. 15. August 2004;101(4):693–703.

Chuba PJ, Hamre MR, Yap J, Severson RK, Lucas D, Shamsa F, u. a. Bilateral risk for subsequent breast cancer after lobular carcinoma-in-situ: analysis of surveillance, epidemiology, and end results data. *J Clin Oncol*. 20. August 2005;23(24):5534–41.

Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? *Breast Cancer Res Treat*. März 2002;72(2):107–15.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *The Lancet*. September 2019;394(10204):1159–68.

Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. Juni 2015;35(6):3147–54.

Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CKY, Hicks J, King TA, u. a. Progression from ductal carcinoma *in situ* to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology*. Oktober 2013;7(5):859–69.

Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*. 2017;8(16):3131–41.

Damböck, Anna (2022): Charakterisierung und Differenzierung von EpCAM-positiven Zellen bei Brustkrebs- und Kontrollpatientinnen.

de Wit S, Manicone M, Rossi E, Lampignano R, Yang L, Zill B, u. a. EpCAM^{high} and EpCAM^{low} circulating tumor cells in metastatic prostate and breast cancer patients. *Oncotarget*. 2. November 2018;9(86):35705–16.

Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1. April 2003;100(7):3547–9.

Elston CW, Ellis IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. November 1991;19(5):403–10.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1. Juni 1990;61(5):759–67.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the „seed and soil“ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. Juni 2003;3(6):453–8.

Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 15. August 2001;19(16):3669–74.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. Localized and reversible TGFβ signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*. November 2009;11(11):1287–96.

Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev*. September 2020;39(3):969–87.

Global Cancer Observatory (2020): <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/276-germany-fact-sheets.pdf> , zuletzt geprüft am 24.02.2020.

Göitlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmüller G. 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. *Int J Cancer*. 15. Juli 1986;38(1):47–53.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, u. a. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. August 2011;22(8):1736–47.

Gulati GS, Sikandar SS, Wesche DJ, Manjunath A, Bharadwaj A, Berger MJ, u. a. Single-cell transcriptional diversity is a hallmark of developmental potential. *Science*. 24. Januar 2020;367(6476):405–11.

Guo W, Yang X-R, Sun Y-F, Shen M-N, Ma X-L, Wu J, u. a. Clinical Significance of *EpCAM* mRNA-Positive Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma by an Optimized Negative Enrichment and qRT-PCR–Based Platform. *Clin Cancer Res*. 15. September 2014;20(18):4794–805.

Gužvić M, Braun B, Ganzer R, Burger M, Nerlich M, Winkler S, u. a. Combined Genome and Transcriptome Analysis of Single Disseminated Cancer Cells from Bone Marrow of Prostate Cancer Patients Reveals Unexpected Transcriptomes. *Cancer Res*. 15. Dezember 2014;74(24):7383–94.

Hagemeister, 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.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Januar 2000;100(1):57–70.

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

Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, u. a. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. Dezember 2016;540(7634):552–8.

Hsu S-K, Chiu C-C, Dahms H-U, Chou C-K, Cheng C-M, Chang W-T, u. a. Unfolded Protein Response (UPR) in Survival, Dormancy, Immunosuppression, Metastasis, and Treatments of Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 22. Mai 2019;20(10).

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

Jorns J, Sabel MS, Pang JC. Lobular neoplasia: morphology and management. *Arch Pathol Lab Med*. Oktober 2014;138(10):1344–9.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. April 2009;9(4):239–52.

kConFab, Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, u. a. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*. August 2009;15(8):907–13.

kConFab, Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, u. a. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*. August 2009;15(8):907–13.

Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *CST*. 10. Juni 2019;3(6):165–80.

Klein CA. CANCER: The Metastasis Cascade. *Science*. 26. September 2008;321(5897):1785–7.

Klein CA. The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection. *Adv Cancer Res*. 2003;89:35–67.

Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. April 2009;9(4):302–12.

Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature*. September 2013;501(7467):365–72.

Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, u. a. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol*. April 2002;20(4):387–92.

Lammers R, Giesert C, Grünebach F, Marxer A, Vogel W, Bühring HJ. Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Exp Hematol*. Juni 2002;30(6):537–45.

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.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, u. a. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. September 1998;153(3):865–73.

Magbanua MJM, Park JW. Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling. *Methods*. 1. Dezember 2013;64(2):114–8.

Massoner P, Thomm T, Mack B, Untergasser G, Martowicz A, Bobowski K, u. a. EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. *Br J Cancer*. August 2014;111(5):955–64.

Mavaddat N, Rebbeck TR, Lakhani SR, Easton DF, Antoniou AC. Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Res.* Juni 2010;12(3):R28.

Mederer, Tobias (2021): Identifizierung und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen bei Nicht-Kleinzelligem Lungenkrebs.

Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* August 2008;10(4):210.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, u. a. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15. August 2004;10(16):5367–74.

Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A. The Lipid Phenotype of Breast Cancer Cells Characterized by Raman Microspectroscopy: Towards a Stratification of Malignancy. Müller M, Herausgeber. *PLoS ONE*. 17. Oktober 2012;7(10):e46456.

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 7. Juli 1999;91(13):1113–24.

Pantel K, Woelfle U. Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *J Biol Regul Homeost Agents*. Juni 2004;18(2):120–5.

Patwary, N. (in Bearbeitung). Identifizierung und molekulare Charakterisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen. Monography (Regensburg).

Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, u. a. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med*. November 2014;6(11):1371–86.

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):285–93.

Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, u. a. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. Liu X, Herausgeber. PLoS ONE. 6. Juli 2015;10(7):e0131285.

Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, u. a. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. November 2011;130(2):449–55.

Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D, u. a. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. BMJ. 1. Dezember 2007;335(7630):1134.

Riethdorf S, Pantel K. Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and Circulating Tumor Cells in Blood of Breast Cancer Patients: Current State of Detection and Characterization. Pathobiology. 2008;75(2):140–8.

Riethdorf S, Pantel K. Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and Circulating Tumor Cells in Blood of Breast Cancer Patients: Current State of Detection and Characterization. Pathobiology. 2008;75(2):140–8.

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.

Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. Clin Obstet Gynecol. 2016;59(4):651–72.

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJF, u. a. From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer

progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24. Juni 2003;100(13):7737–42.

Schneck H, Gierke B, Uppenkamp F, Behrens B, Niederacher D, Stoecklein NH, u. a. EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. Dittmar T, Herausgeber. *PLoS ONE*. 22. Dezember 2015;10(12):e0144535.

Schnell U, Cirulli V, Giepmans BNG. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. August 2013;1828(8):1989–2001.

Shankar J, Messenberg A, Chan J, Underhill TM, Foster LJ, Nabi IR. Pseudopodial Actin Dynamics Control Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells. *Cancer Res*. 1. Mai 2010;70(9):3780–90.

Sloane JP, Ormerod MG, Neville AM. Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases. *Cancer Res*. August 1980;40(8 Pt 2):3079–82.

Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. September 2014;14(9):611–22.

Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. September 2014;14(9):611–22.

Spike BT, Engle DD, Lin JC, Cheung SK, La J, Wahl GM. A mammary stem cell population identified and characterized in late embryogenesis reveals similarities to human breast cancer. *Cell Stem Cell*. 3. Februar 2012;10(2):183–97.

Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, u. a. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. August 2004;86(3):207–13.

Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer*. 1. Februar 2010;126(3):589–98.

Tang Y, Fan Y, Jiang J, Li K, Zheng M, Chen W, u. a. C-kit induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to salivary adenoid cystic cancer progression. *Oncotarget*. 30. März 2014;5(6):1491–501.

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. November 2009;139(5):871–90.

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*. Oktober 2011;147(2):275–92.

Wang QS, Ross RK, Yu MC, Ning JP, Henderson BE, Kimm HT. A case-control study of breast cancer in Tianjin, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Oktober 1992;1(6):435–9.

Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. August 2005;5(8):591–602.

Werner-Klein M, Grujovic A, Irlbeck C, Obradović M, Hoffmann M, Koerkel-Qu H, u. a. Interleukin-6 trans-signaling is a candidate mechanism to drive progression of human DCCs during clinical latency. *Nat Commun*. Dezember 2020;11(1):4977.

Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *The Breast*. Oktober 2009;18:S56–8.

Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li J, Goswami S, Stanley ER, u. a. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res*. 15. März 2007;67(6):2649–56.

Yadav AS, Pandey PR, Butti R, Radharani NNV, Roy S, Bhalara SR, u. a. The Biology and Therapeutic Implications of Tumor Dormancy and Reactivation. *Front Oncol*. 2018;8:72.

Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, u. a. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1. Mai 2011;121(2):353–7.

Ziegler E, Hansen M-T, Haase M, Emons G, Gründker C. Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* November 2014;148(2):269–77.

8. Anhang

8.1 Klassifikation der Brustkrebserkrankung

Tabelle 8 1 TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

(modifiziert aus Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

T - Ausdehnung des Primärtumors	
Tx	PT kann nicht beurteilt werden
To	Kein Anhalt für PT
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 2 cm
T2	2 cm < Tumor < 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor jeglicher Größe mit Ausdehnung auf Brustwand und/oder Haut
N - regionäre Lymphknoten	
Nx	Regionäre LK können nicht beurteilt werden
No	Keine regionären LK
N1	Metastasen in 1-3 axillären ipsilateralen LK
N2	Metastasen in 4-9 axillären LK
N3	Metastasen in > 10 axillären LK, Metastasen in ipsilateralen infraklavikulären LK
M - Fernmetastasen	
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

8.2 Überblick über das Studienkollektiv

Tabelle 8 2 Darstellung der Mammakarzinom-Patientinnen mit zugehörigen klinischen Daten.

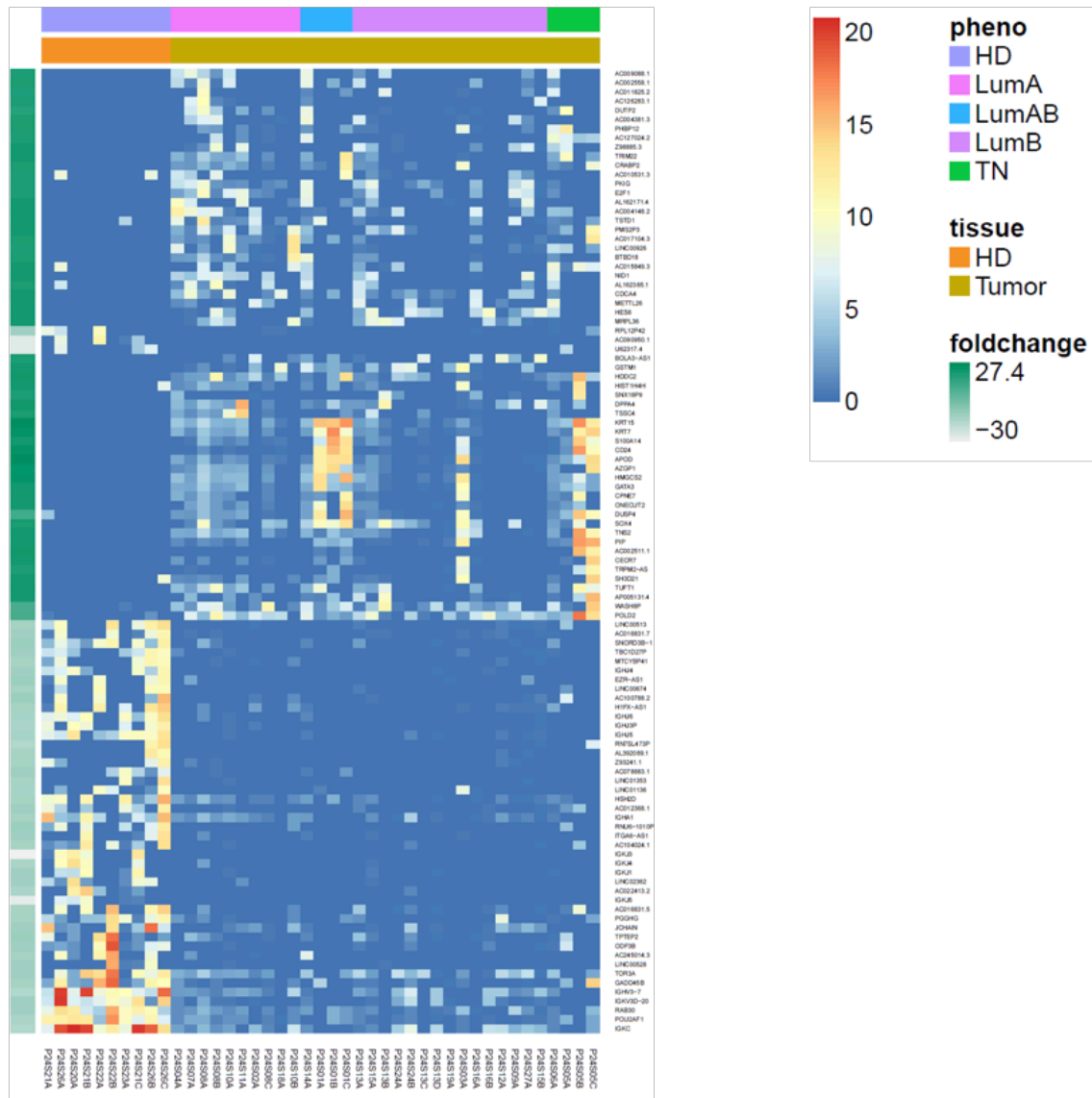
		M0-Patientinnen mit mindestens einer EpCAM⁺, CD27/319⁻ Zelle	M0-Patientinnen ohne eine EpCAM⁺, CD27/319⁻ Zelle
Durchschnittsalter		50,25	48,3
Ausdehnung PT	T1	3 (17,6 %)	3 (16,7 %)
	T2	10 (58,8 %)	11 (61,1 %)
	T3	3 (17,6 %)	3 (16,7 %)
	T4	0 (0,0 %)	1 (5,5 %)
	nicht bekannt	1 (5,9 %)	0 (0,0 %)
Nodalstatus	N0	3 (17,6 %)	8 (44,5 %)
	N1-3	13 (76,5 %)	9 (50,0 %)
	nicht bekannt	1 (5,9 %)	1 (5,5 %)
Differenzierungsgrad	G1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
	G2	5 (29,4 %)	12 (66,7 %)
	G3	6 (35,3 %)	6 (33,3 %)
	nicht bekannt	6 (35,3 %)	0 (0,0 %)
Zeitpunkt der Punktion	vor Therapie	10 (58,8 %)	15 (83,3 %)
	nach begonnener Therapie	7 (41,2 %)	3 (16,7 %)

Tabelle 8 3 Darstellung der qPCR-Ergebnisse der M0-Knochenmarkzellen mit zugehörigen klinischen Daten.

		M0-Patientinnen mit <i>EpCAM</i>-Transkript⁺ Zellen	M0-Patientinnen ohne <i>EpCAM</i>-Transkript⁺ Zellen
Ausdehnung PT	T1	2 (25,0 %)	0 (0,0 %)
	T2	4 (50,0 %)	4 (80,0 %)
	T3	2 (25,0 %)	0 (0,0 %)
	T4	0 (0,0 %)	1 (20,0 %)
	nicht bekannt	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Nodalstatus	N0	0 (0,0 %)	2 (40,0 %)
	N1-3	7 (87,5 %)	2 (40,0 %)
	nicht bekannt	1 (12,5 %)	1 (20,0 %)
Differenzierungsgrad	G1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
	G2	6 (75,0 %)	3 (60,0 %)
	G3	1 (12,5 %)	1 (20,0 %)
	nicht bekannt	1 (12,5 %)	1 (20,0 %)

8.3 RNA-Sequenzierung

a)



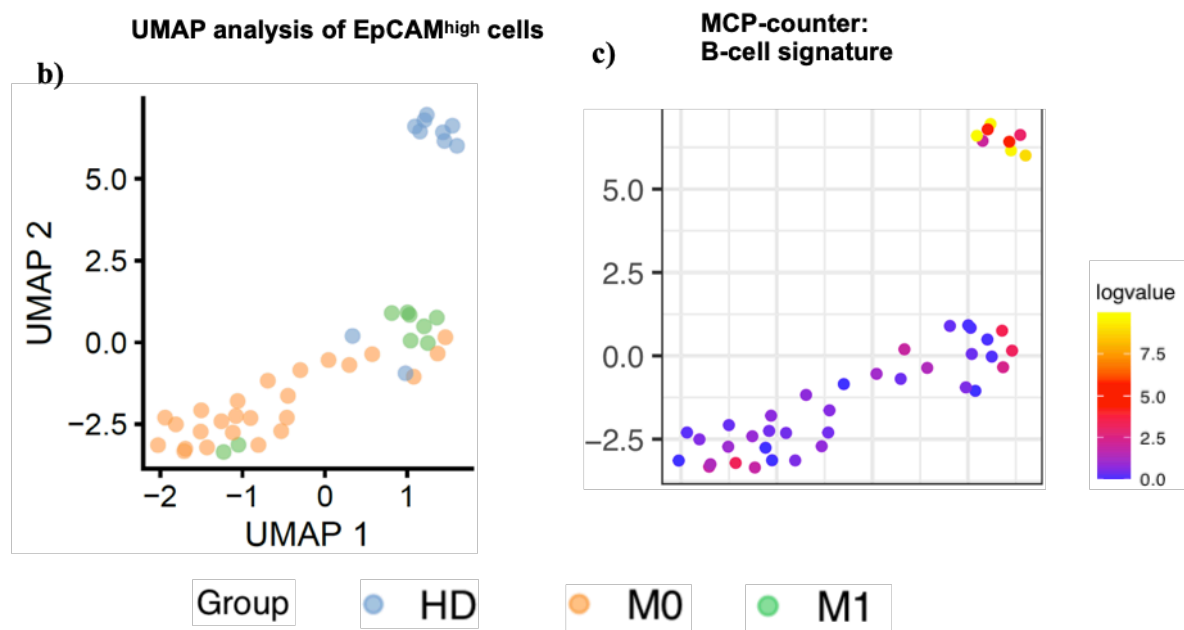


Abbildung 32 Differenziell exprimierte Gene zwischen NCCs und DCCs. In der Heatmap a) sind die normalisierten log counts der Expression der jeweiligen Gene zu sehen. Jede Reihe gibt die Expression des jeweiligen Gens an. Die farbigen Balken zeigen die Herkunft der Zelle (Kontroll- oder Krebspatient), die von je einer Spalte repräsentiert wird. In der Uniform Approximativ and Protection (UMAP) Klusterung in b) sind die gleichen in a) verwendeten Zellen dargestellt. Dabei wird der Status der Spenderzellen farblich kodiert, in Zellen von Healthy Donors (HD) und Zellen von M0- und M1-Patientinnen, dargestellt. Deutlich wird eine klare Begrenzung der Gruppe der HD-Zellen. In c) zu sehen ist die Analyse der Zellen mithilfe der Microenvironment Cell Populations-counter Methode (MCP-Counter). Dabei wird deutlich, dass das HD-Kluster eine Übereinstimmung mit der B-Zell-Expression aufweist. Die normalisierten log counts geben an, wie stark die Expression der Signatur der jeweiligen Zelle ist (Damböck, A., 2022).

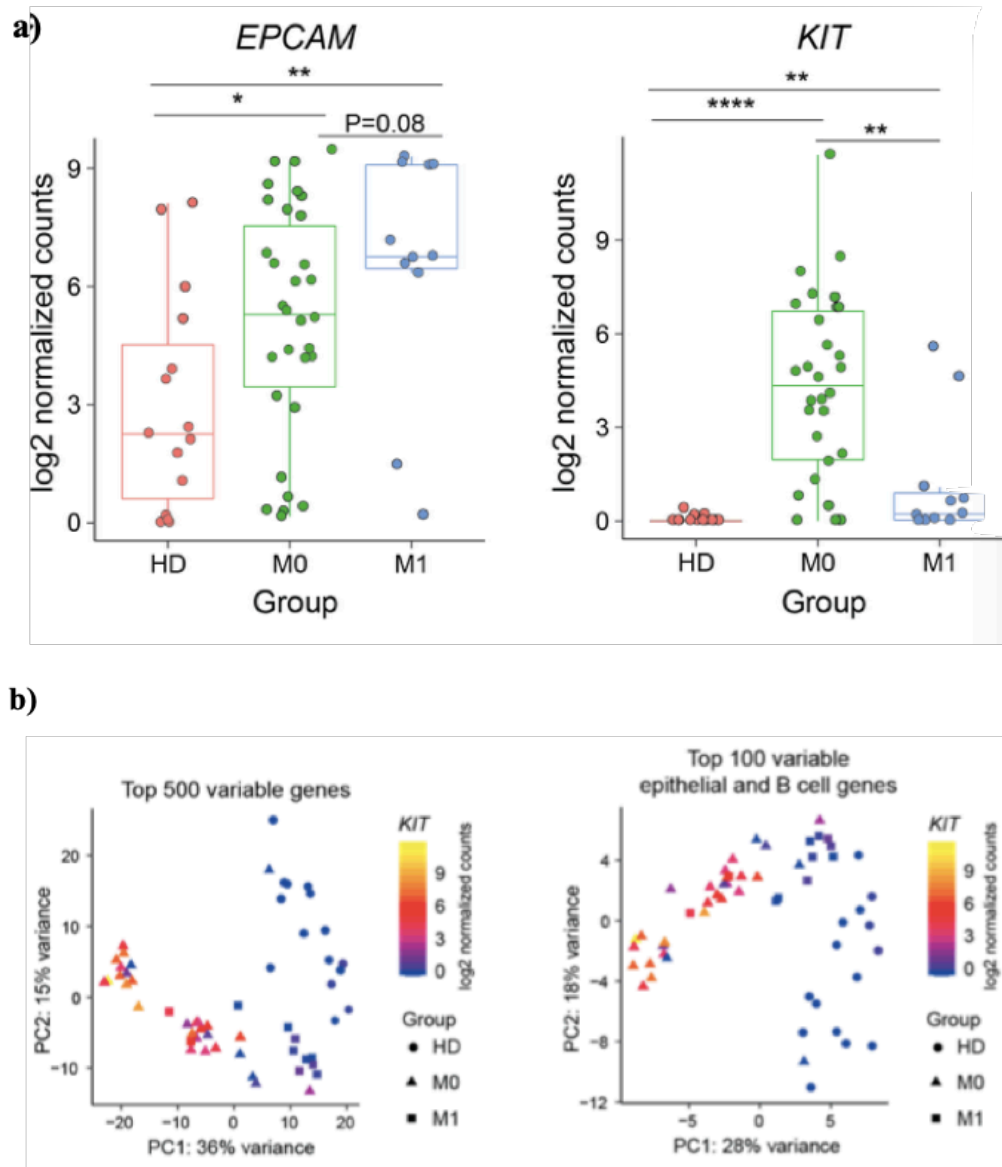


Abbildung 33 Darstellung der Expression von EpCAM und KIT. In den Boxplots in a) ist die Expression von EPCAM und KIT in HD (N=15), M0- (N=30) und M1- (N=15) DCCs dargestellt. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet. In d) zu sehen ist eine Hauptkomponentenanalyse der 500 variabelsten Gene und der 100 variabelsten Epithel- und B-Zell-Gene (Werner-Klein., M., 2020).

8.4 Workflow der verwendeten Zellen

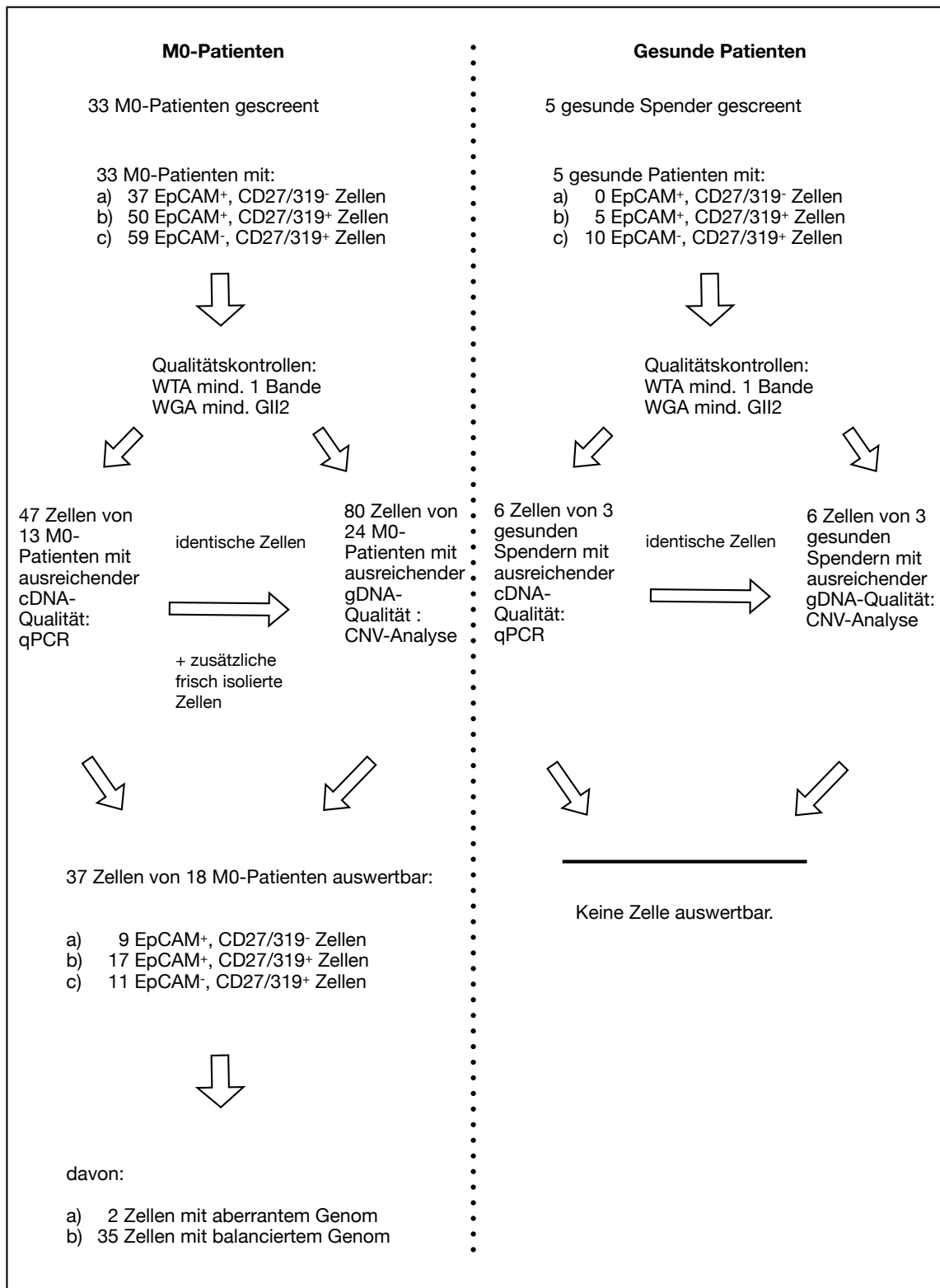


Abbildung 34 Darstellung des Workflows aller bearbeiteten Zellen.

8.5 Ergebnisse der verwendeten Zellen

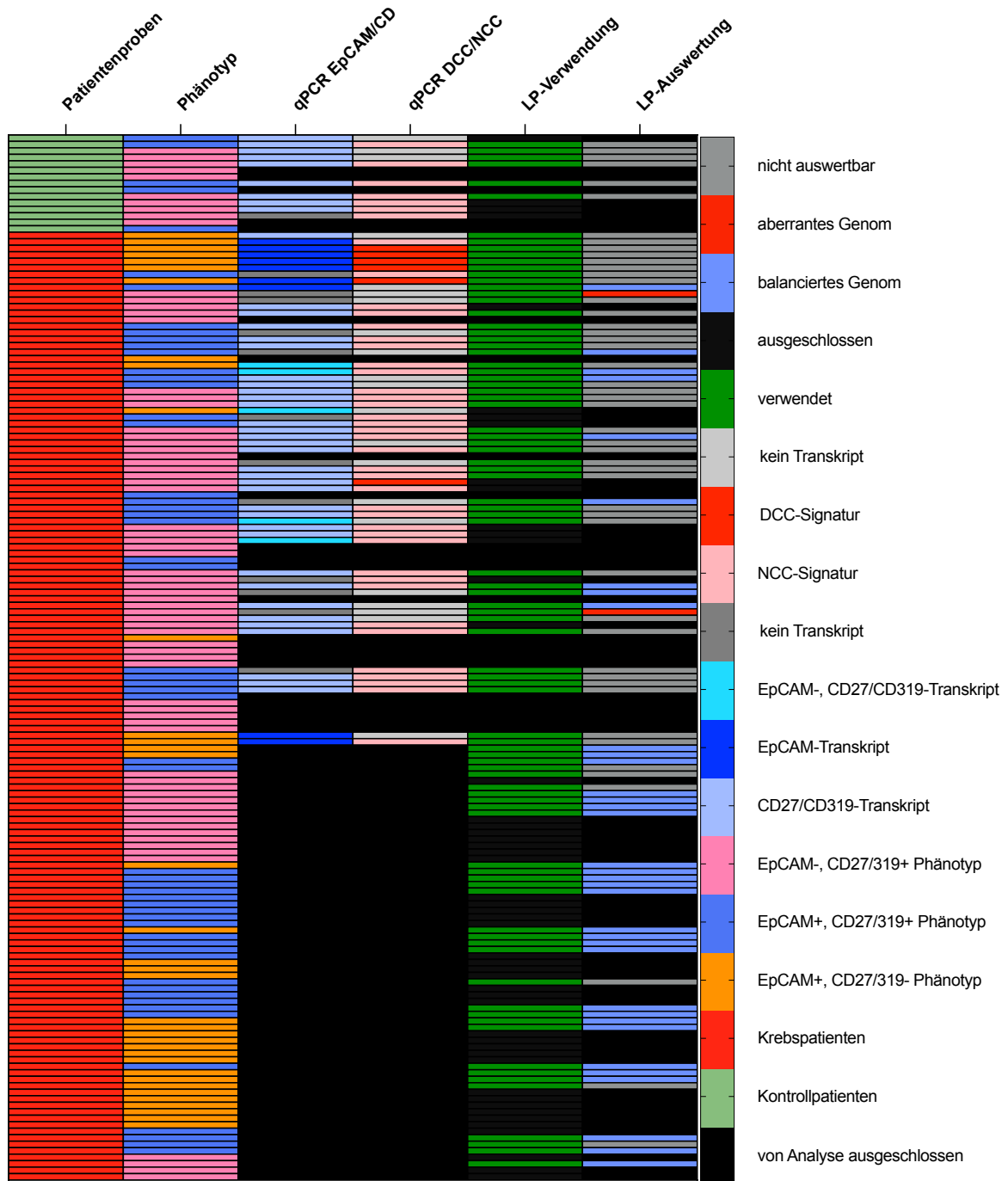
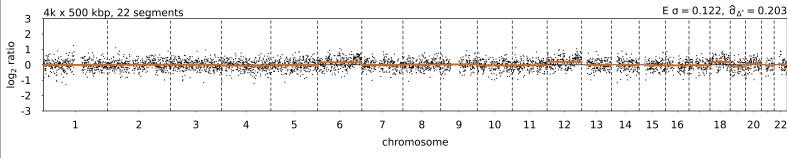
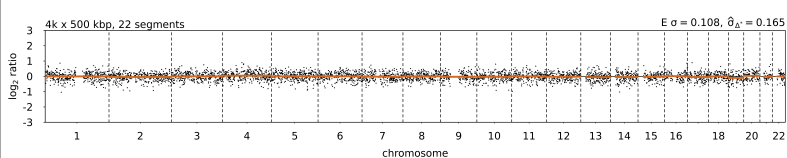


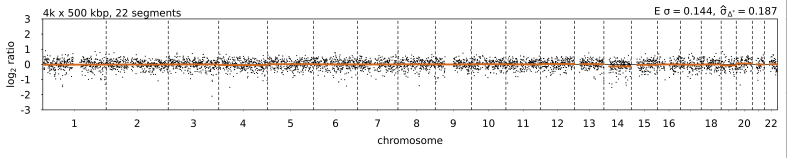
Abbildung 35 Überblick über alle verwendeten und bearbeiteten Zellen mit zugehörigen Ergebnissen. In der dargestellten Heatmap repräsentiert jede Zeile eine Zelle und deren Ergebnisse in den verschiedenen Analysen. Dabei sind die Ergebnisse farbig codiert (siehe Legende) und geben Aufschluss über die Herkunft der Zelle, den Phänotypen, die Ergebnisse der qPCR und die Ergebnisse der LowPass-Sequenzierung. Bei den Zellen, welche hinsichtlich der qPCR-Ergebnisse schwarz markiert sind und somit nicht analysiert wurden, handelt es sich um frisch isolierte Zellen, welche direkt für Genomanalysen bereitgestellt wurden, somit die qPCR nicht durchlaufen konnten.

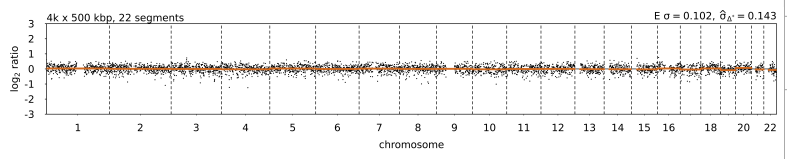
8.6 LowPass-Profile

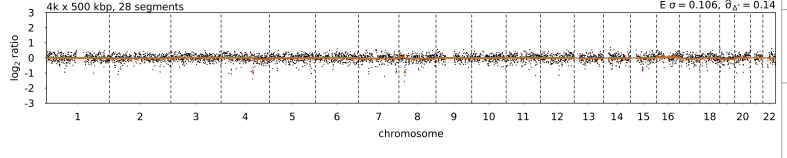
8.6.1 Profile von Überstandszellen

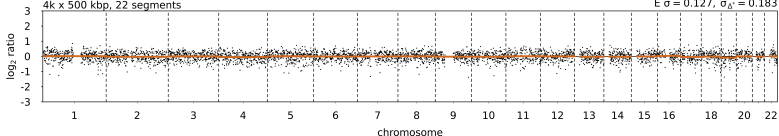
MC22-022-12 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,203
	Qualität	gut
	Status	balanciert

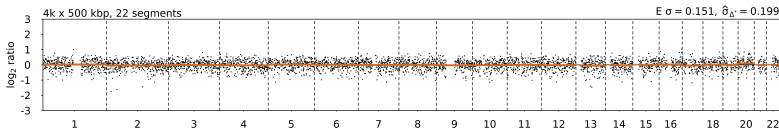
MC22-022-13 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,165
	Qualität	gut
	Status	balanciert

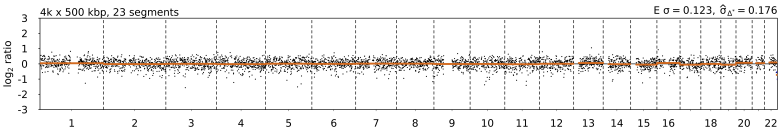
MC22-031-3 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,187
	Qualität	gut
	Status	balanciert

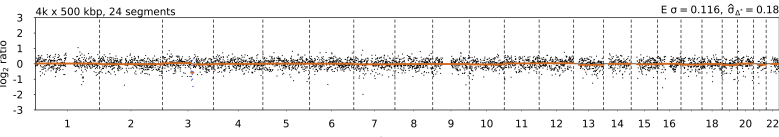
MC21-268-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,143
	Qualität	gut
	Status	balanciert

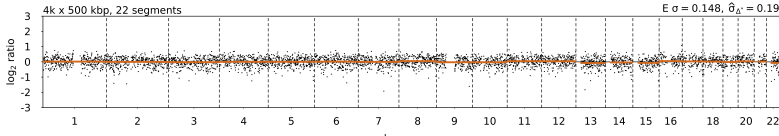
MC21-268-3 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,14
	Qualität	gut
	Status	balanciert

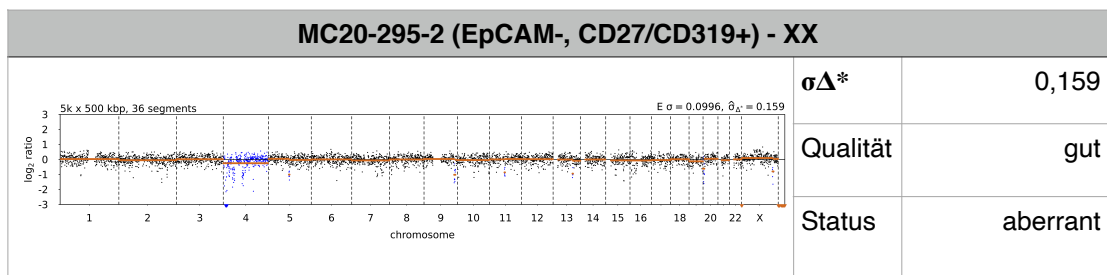
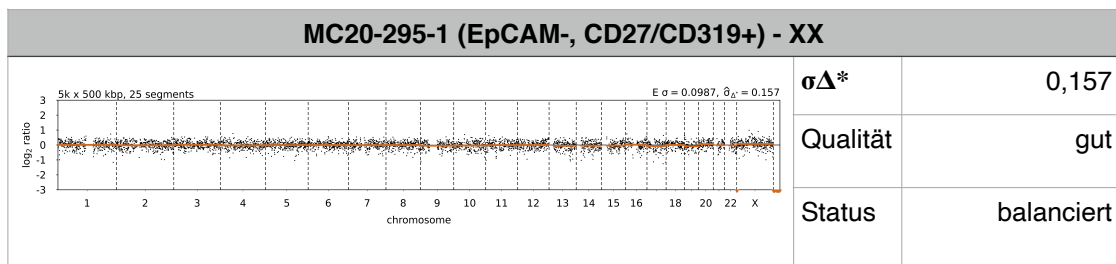
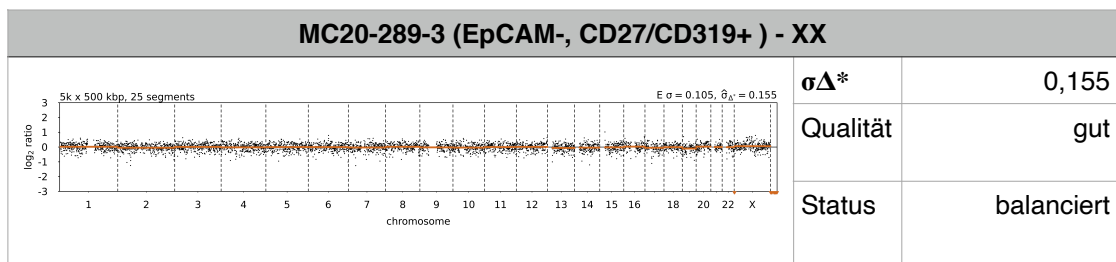
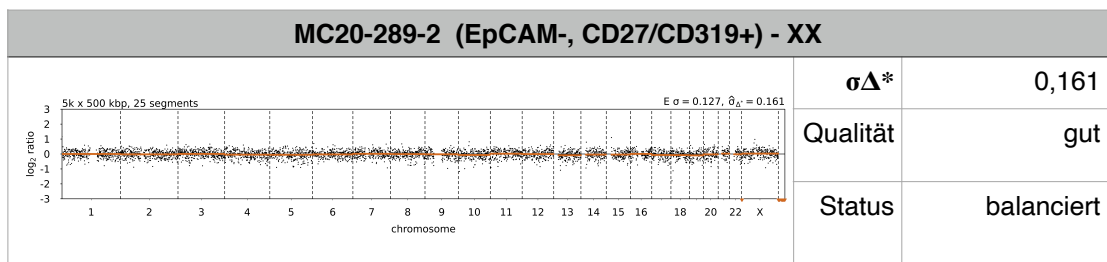
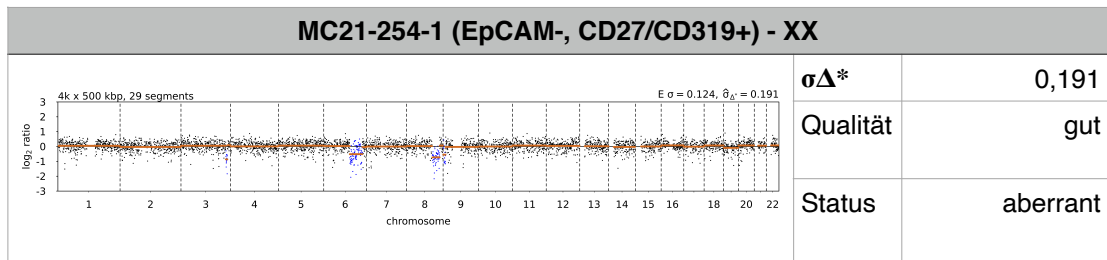
MC21-181-2 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,183
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-262-6 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,199
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-284-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,176
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC22-031-4 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,18
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-281-5 (EpCAM-, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,19
	Qualität	gut
	Status	balanciert



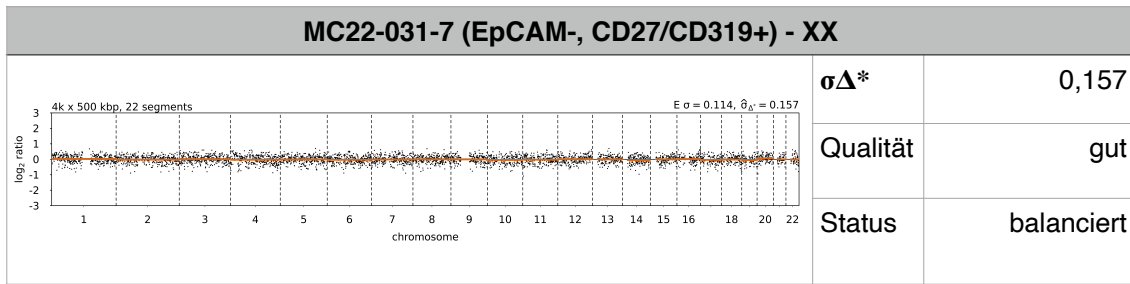
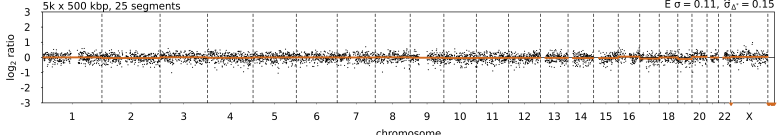
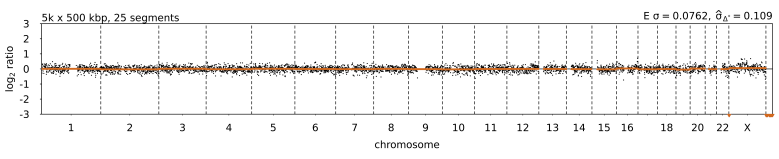
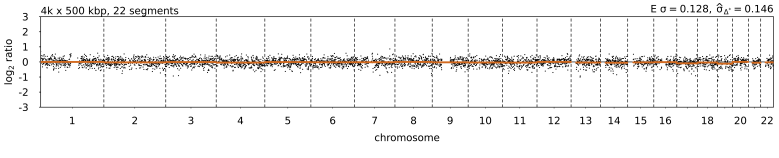
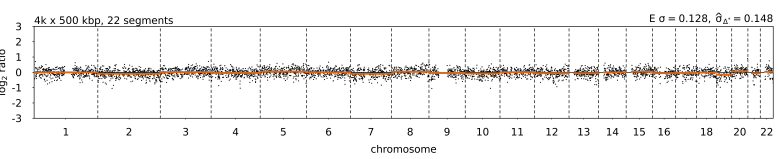
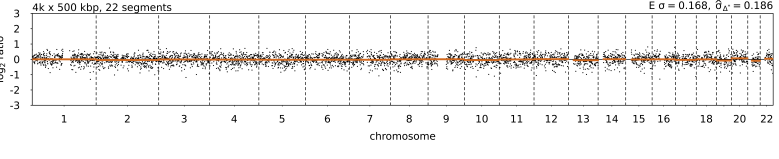
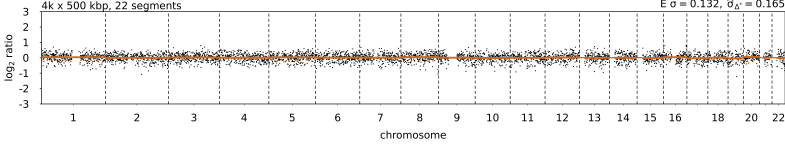
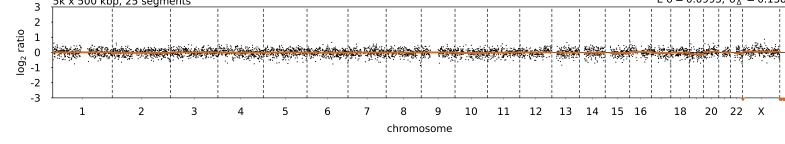


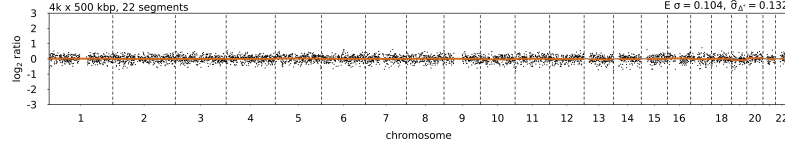
Abbildung 36 Überblick über alle CNV-Profil von Zellen, welche aus dem WTA-Überstand isoliert wurden. Gezeigt sind die CNV Profile der untersuchten Mammakarzinom-Knochenmarkproben (links), mit der Standardabweichung Δ^* , der Einteilung der Profilqualität und dem CNV-Status (rechts). Die Probenart ist in der obersten Zeile angegeben, MC entspricht eine Mammakarzinom-Probe, KP einem Kontrollknochenmark. Für jede Probe ist das Geschlecht des Patienten als Satz der Gonosomen (XY = Mann; XX = Frau) angegeben. SN steht für Überstandszellen (SN). Die Profile sind sortiert nach EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen, EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen.

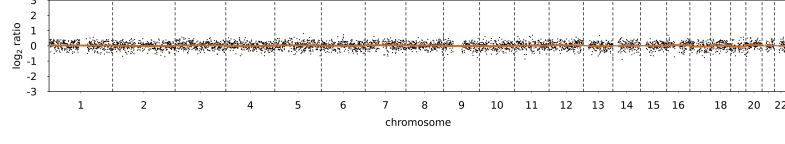
8.6.2 Profile von frisch isolierten Zellen

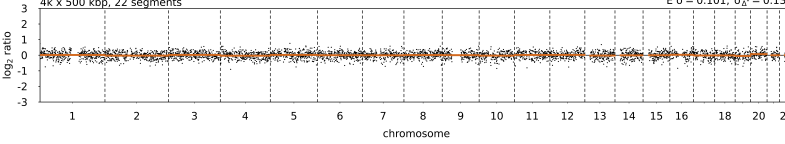
MC21-372-1 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,15
	Qualität	gut
	Status	balanciert
MC21-372-2 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,109
	Qualität	gut
	Status	balanciert
MC21-391-1 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,146
	Qualität	gut
	Status	balanciert
MC21-562-2 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,148
	Qualität	gut
	Status	balanciert
MC22-009-12 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,186
	Qualität	gut
	Status	balanciert

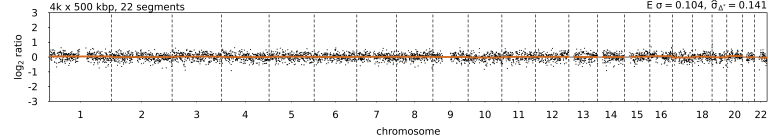
MC22-009-13 (EpCAM+, CD27/CD319-) - XX		
 4k x 500 kbp, 22 segments $E \sigma = 0.132, \hat{\sigma}_{\Delta'} = 0.165$	$\sigma\Delta^*$	0,165
	Qualität	gut
	Status	balanciert

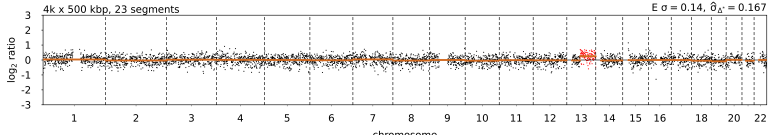
MC21-372-3 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
 5k x 500 kbp, 25 segments $E \sigma = 0.0993, \hat{\sigma}_{\Delta'} = 0.138$	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	balanciert

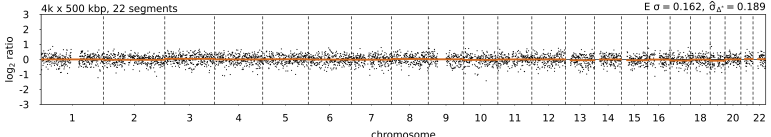
MC21-396-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
 4k x 500 kbp, 22 segments $E \sigma = 0.104, \hat{\sigma}_{\Delta'} = 0.132$	$\sigma\Delta^*$	0,132
	Qualität	gut
	Status	balanciert

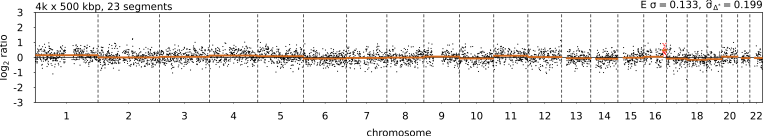
MC21-396-2 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
 4k x 500 kbp, 22 segments $E \sigma = 0.104, \hat{\sigma}_{\Delta'} = 0.142$	$\sigma\Delta^*$	0,142
	Qualität	gut
	Status	balanciert

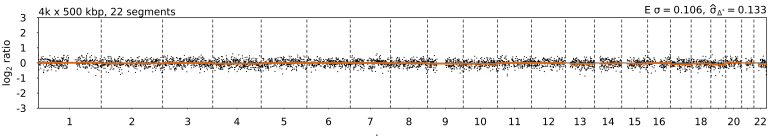
MC21-407-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
 4k x 500 kbp, 22 segments $E \sigma = 0.101, \hat{\sigma}_{\Delta'} = 0.139$	$\sigma\Delta^*$	0,139
	Qualität	gut
	Status	balanciert

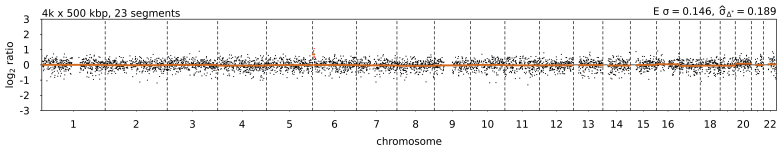
MC21-407-2 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,141
	Qualität	gut
	Status	balanciert

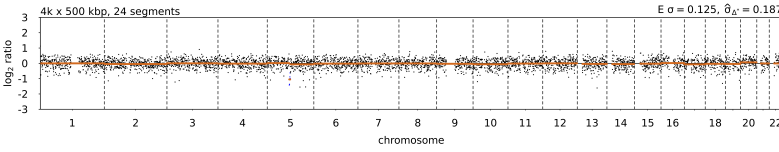
MC21-562-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,167
	Qualität	gut
	Status	balanciert

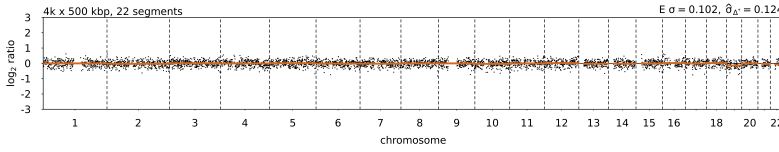
MC21-562-3 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,189
	Qualität	gut
	Status	balanciert

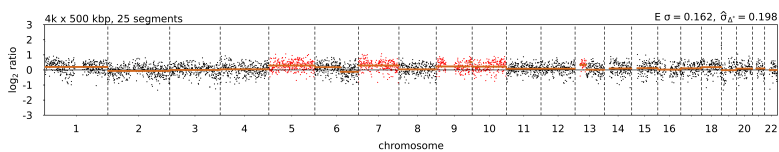
MC21-562-4 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,199
	Qualität	gut
	Status	balanciert

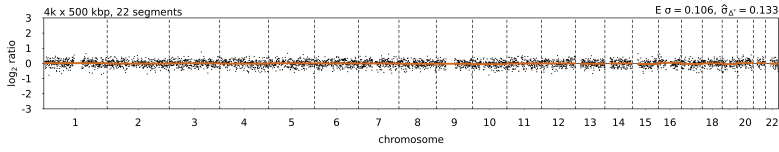
MC21-575-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,133
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-575-2 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,189
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC22-009-11 (EpCAM+, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,187
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-372-8 (EpCAM-, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,124
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-372-9 (EpCAM-, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,198
	Qualität	gut
	Status	balanciert

MC21-384-1 (EpCAM-, CD27/CD319+) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,133
	Qualität	gut
	Status	balanciert

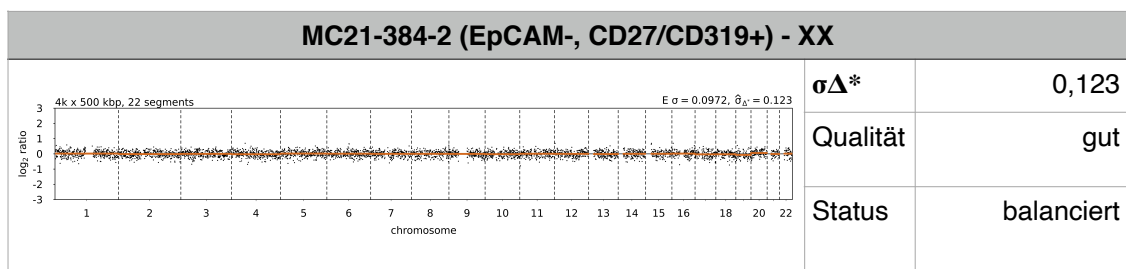
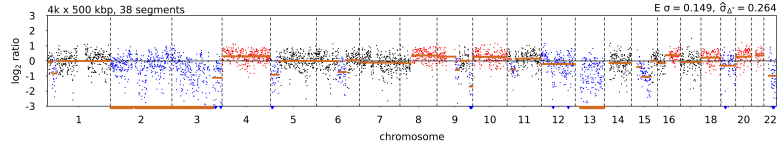
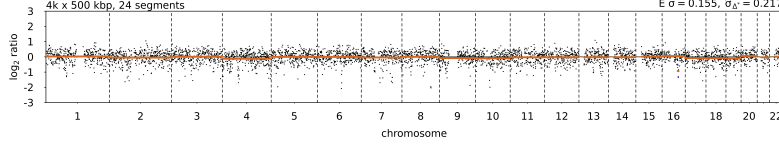
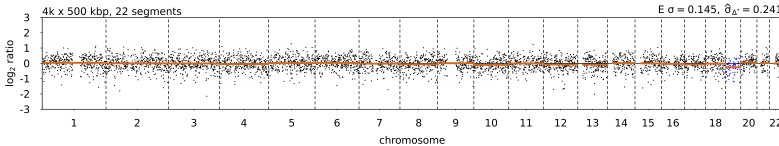


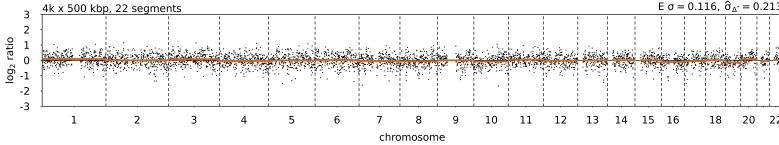
Abbildung 37 Überblick über alle CNV-Profil frisch isolierter Zellen. Gezeigt sind die CNV Profile der untersuchten Mammakarzinom-Knochenmarkproben (links), mit der Standardabweichung Δ^* , der Einteilung der Profilqualität und dem CNV-Status (rechts). Die Probenart ist in der obersten Zeile angegeben, MC entspricht eine Mammakarzinom-Probe, KP einem Kontrollknochenmark. Für jede Probe ist das Geschlecht des Patienten als Satz der Gonosomen (XY = Mann; XX = Frau) angegeben. SN steht für Überstandszellen (SN). Die Profile sind sortiert nach EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen, EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen.

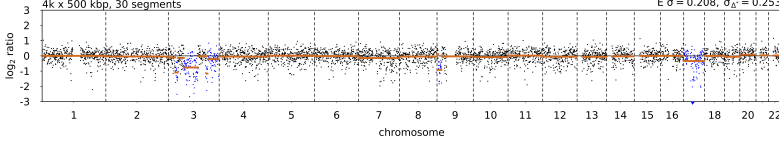
8.6.3 Profile der Zellen, welche aus der Studie ausgeschlossen wurden

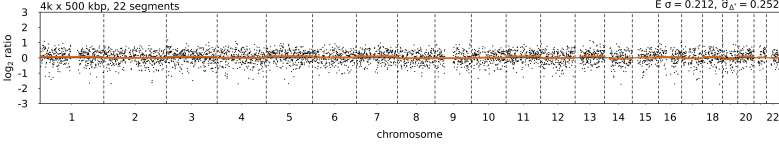
MC21-178-1 (EpCAM+, CD27/CD319-) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,264
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

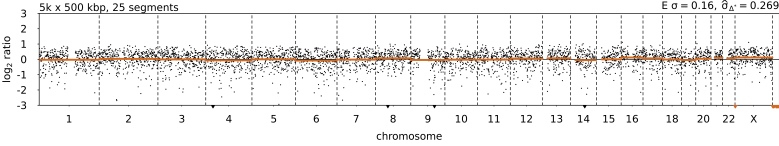
MC21-178-2 (EpCAM+, CD27/CD319-) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,217
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

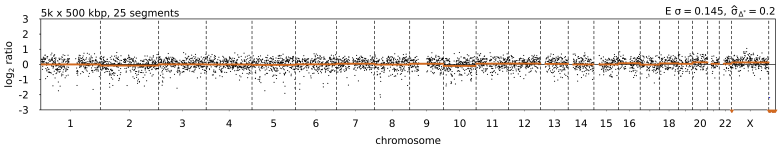
MC21-178-3 (EpCAM+, CD27/CD319-) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,241
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

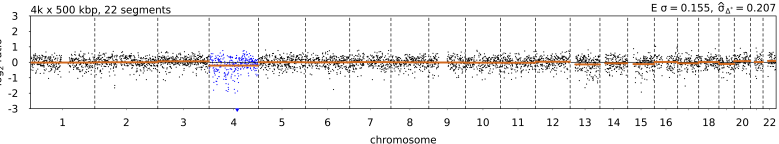
MC21-181-1 (EpCAM+, CD27/CD319-) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,213
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

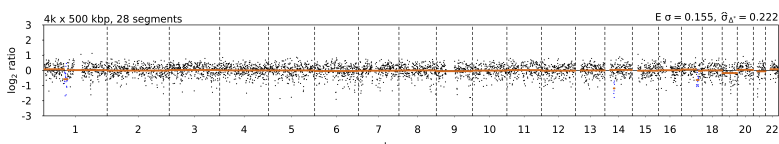
MC21-262-3 (EpCAM+, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,253
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

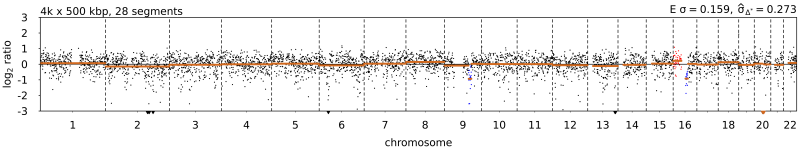
MC21-284-2 (EpCAM+, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,252
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

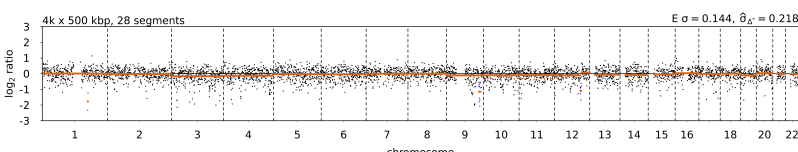
MC20-315-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,269
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

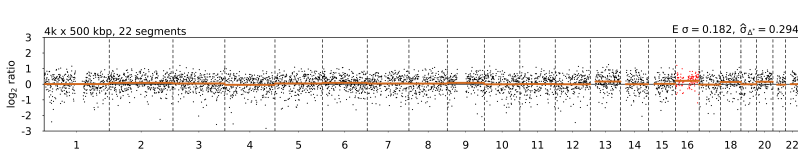
MC20-315-4 (EpCAM+, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,2
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

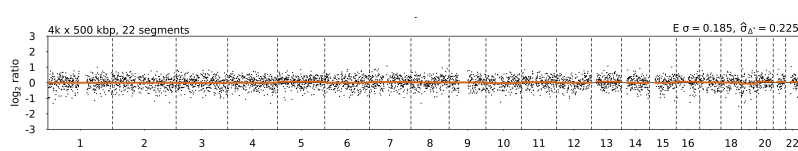
MC21-569-1 (EpCAM+, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,207
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

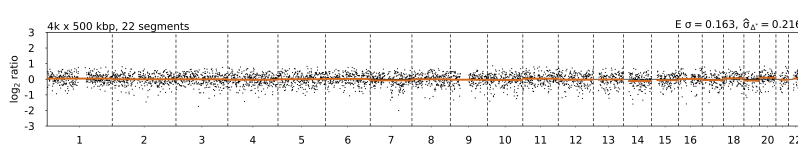
MC21-268-6 (EpCAM-, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,222
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

MC21-281-4 (EpCAM-, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,273
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

MC21-281-7 (EpCAM-, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,218
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

MC21-282-3 (EpCAM-, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,294
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

MC21-254-2 (EpCAM-, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,225
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

MC21-254-4 (EpCAM-, CD27/CD319+) (SN) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,216
	Qualität	ungenügend
	Status	N/A

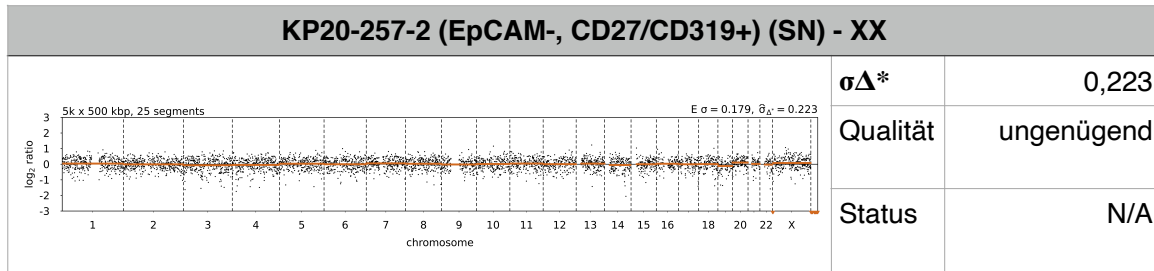


Abbildung 38 Überblick über alle CNV-Profile von Zellen, welche aus der Studie ausgeschlossen wurden. Gezeigt sind die CNV Profile der untersuchten Mammakarzinom-Knochenmarkproben (links), mit der Standardabweichung Δ^* , der Einteilung der Profilqualität und dem CNV-Status (rechts). Die Probenart ist in der obersten Zeile angegeben, MC entspricht eine Mammakarzinom-Probe, KP einem Kontrollknochenmark. Für jede Probe ist das Geschlecht des Patienten als Satz der Gonosomen (XY = Mann; XX = Frau) angegeben. SN steht für Überstandszellen (SN). Die Profile sind sortiert nach EpCAM⁺, CD27/CD319⁻ Zellen, EpCAM⁺, CD27/CD319⁺ Zellen und EpCAM⁻, CD27/CD319⁺ Zellen.

9. Danksagung

Hier möchte ich gerne allen beteiligten Personen danken, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Klein bedanken, für die großzügige Überlassung des Themas und für die Möglichkeit so viel Neues zu erlernen, Erfahrungen zu sammeln und Verantwortung zu übernehmen.

Ausnahmslos meinem ganzen Labor gebührt ein großes Dankeschön, für die fachliche und menschliche Unterstützung zu jeder Zeit. Besonders bei Dr. Dr. Vladan Milosevic, der mich in der Anfangszeit unterstützte und mir jede Frage beantwortete und Dr. Christoph Irlbeck, der während der gesamten Zeit fachlich und menschlich eine enorme Bereicherung war, möchte ich mich bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danke auch an: Dr. Miodrag Guzvic und Steffanie Güldener - für Eure Emergency Help zur richtigen Zeit; Thomas Schamberger - für ein außergewöhnliches Osterfest; Anthea Povall - für viel Musik beim Forschen; Isabell Blochberger - für wertvolle Lebenstips bei der WTA; Sandra Grunewald - für die Hilfe beim Sequenzieren; Susanna Lissek - für dein Verständnis; das Maus-Team - für ein tolles Jahr; Carolina Fisch - für deine fachliche und menschliche Unterstützung und Lena Wasmaier - eine bessere Mitstreiterin hätte ich mir nicht wünschen können.

Ein respektvolles Dankeschön möchte ich auch an die Spender und Spenderinnen und deren Familien richten. Ohne sie würde es wichtige Forschungserkenntnisse nicht geben.

Auch für die reibungslose Kooperation mit Prof. Dr. Seitz des Caritas Krankenhaus St. Josef und Dr. Weber des Asklepios Krankenhauses Bad Abbach möchte ich mich bedanken.

Der Deutschen Krebshilfe danke ich für die Förderung und finanzielle Unterstützung, sodass ich mich vollkommen der Forschung widmen konnte; der Universität Regensburg für die Aufnahme in die Graduiertenschule und für die Möglichkeit, mit Prof. Dr. Seitz und Prof. Dr. Poeck ausgezeichnete Mentoren gefunden zu haben, die mich während meines Forschungszeitraumes interessiert unterstützten.

Ein großer Dank gebührt ebenfalls meinen Eltern und meiner Familie, die nie an mir und meinen Vorhaben zweifeln und mir jeden Weg ebnen, welchen ich beschreiten möchte.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meinem Freund bedanken; für technische Hilfe, wissenschaftliche Anregung, immer offene Ohren und bedingungslose Unterstützung.