

Aus der
Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken
– Leiter: Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann –
der Klinik für Chirurgie
- Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck -
an der Universität zu Lübeck



**Detektion und Charakterisierung
von Tumorstammzellen
in Mammakarzinom-Zelllinien**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Jennifer Tübing
aus Coesfeld

Lübeck 2023

1. Berichterstatter: Prof. Jens K. Habermann, M.D., Ph.D.
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Reck

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.08.2023

Promotionskommission der Sektion Medizin

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
VERZEICHNIS VERWENDETER MAßEINHEITEN	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 EINFÜHRUNG	1
1.2 DAS KRANKHEITSBILD DES MAMMAKARZINOMS	1
1.2.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.2.2 <i>Ätiologie und Pathogenese</i>	2
1.2.3 <i>Klassifikation</i>	2
1.2.4 <i>Klinische Präsentation</i>	3
1.2.5 <i>Therapie und Verlauf</i>	4
1.3 GENETISCHE IN-/STABILITÄT	4
1.3.1 <i>Ploidie</i>	5
1.3.2 <i>DNS-Zytometrie</i>	5
1.4 MODELLE DER TUMORENTSTEHUNG	5
1.4.1 <i>Klonales Evolutionsmodell der Tumorentstehung</i>	5
1.4.2 <i>Tumorstammzellmodell der Tumorentstehung</i>	7
1.4.3 <i>Zelllinien als Modellsystem für die Tumorstammzellforschung</i>	10
1.6 TUMORSTAMMZELLMARKER	10
1.6.1 <i>Cluster of Differentiation-Antigene</i>	10
1.6.2 <i>In dieser Arbeit detektierte CD-Antigene</i>	11
2. FRAGESTELLUNG	14
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1 MATERIALIEN.....	15
3.1.1 <i>Geräte</i>	15
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	15
3.1.3 <i>Chemikalien</i>	16
3.1.4 <i>Puffer und Lösungen</i>	17
3.1.5 <i>Medien für humane Zelllinien</i>	17
3.1.6 <i>Software</i>	18

3.1.7 Antikörper.....	18
3.1.8 Humane Zelllinien	20
3.2 METHODEN.....	21
3.2.1 Zellkultur	21
3.2.2 DNS-Bild-Zytometrie.....	23
3.2.3 Durchfluss-Zytometrie.....	26
3.2.4 Analyse von Netzwerken und Signalwegen.....	30
3.2.5 Statistische Evaluationsmethoden	31
4. ERGEBNISSE	32
4.1 DNS-BILD-ZYTOTOMETRIE.....	32
4.1.1 Nicht-maligne Mammazelllinien.....	32
4.1.2 Maligne Mammazelllinien.....	33
4.1.3 Ploidieklassifikation und genomische Instabilität.....	35
4.2 TUMORSTAMMZELLMARKER-EXPRESSION	36
4.2.1 Expression des Oberflächenantigens CD133.....	38
4.2.2 Expression des Oberflächenantigens CD326.....	40
4.2.3 Expression des Oberflächenantigens CD44.....	41
4.2.4 Expression des Oberflächenantigens CD24.....	42
4.2.5 Expression des Oberflächenantigens CD29.....	43
4.2.6 Expression des Oberflächenantigens CD49f.....	44
4.2.7 Assoziation zwischen Expressionsprofil und Ploidie-Status.....	45
4.3 ANALYSE VON NETZWERKEN UND SIGNALWEGEN	45
5. DISKUSSION.....	47
5.1 PLOIDIE UND GENOMISCHE INSTABILITÄT	47
5.2 TUMORSTAMMZELLMARKER-PROFILE	49
5.2.1 CD24, CD29 und CD49f.....	50
5.2.2 CD44 steigert das Malignitätspotential einer Zelle	51
5.2.3 CD326 fördert maligne Zelleigenschaften.....	52
5.2.4 CD133 als möglicher Prognosefaktor.....	53
5.3 ANALYSE VON NETZWERKEN UND SIGNALWEGEN	55
5.4 TUMORSTAMMZELLEN IM ZELLINIENMODELL.....	56
5.5 AKTUELLE WISSENSCHAFTLICHE DATEN.....	59
5.6 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	61
5.7 AUSBLICK.....	62

6. ZUSAMMENFASSUNG.....	65
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	66
8. ANHANG	87
8.1 ABBILDUNGEN	87
8.1.1 <i>Interpretation der DNS-Histogramme anhand der genomischen Instabilität</i>	87
8.1.2 <i>IPA (Ingenuity Pathway Analysis).....</i>	88
8.2.1 <i>TNM-Klassifikation</i>	89
8.2.2 <i>Stadiengruppierung nach UICC bzw. AJCC</i>	89
8.3 PROTOKOLLE DER FÄRBUNGEN	90
8.3.1 <i>Feulgen-Färbung.....</i>	90
8.3.2 <i>Antikörper-Färbung</i>	91
9. DANKSAGUNG.....	92
10. PUBLIKATIONEN	93

Abkürzungsverzeichnis

5cER	<i>5c exceeding rate</i>
9cER	<i>9c exceeding rate</i>
AACR	<i>American Association for Cancer Research</i> (Amerikanische Gesellschaft für Krebsforschung)
AC133	Synonym für CD133
ADH	<i>atypical ductal hyperplasia</i> (atypische (intra-) duktales Hyperplasie)
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> (Amerikanischer Gemeinsamer Ausschuss zu Krebserkrankungen)
APC	Allophycocyanid
BET	brusterhaltene Therapie
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i> (Brustkrebsgen 1)
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i> (Brustkrebsgen 2)
CAFs	<i>Cancer-associated Fibroblasts</i> (Krebs-assoziierte Fibroblasten)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
Chk	Checkpoint-Kinase
CSCs	<i>Cancer Stem Cells</i> (Tumorstammzellen)
CTNNB1	β -Catenin
DCIS	<i>ductal carcinoma in situ</i> (duktales Carcinoma in situ)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMO	Dimethylsulfoxid
ECM-III	<i>Extracellular Matrix Receptor III</i> (Extrazellulärmatrix-Rezeptor III)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EMT	Epitheliale- Mesenchymale Transition
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i> (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
Fab	<i>antigen-binding fragment</i> (Antigenbindendes Fragment)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
Fc	<i>crystallisable fragment</i> (kristallisierbares Fragment)
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
G1-Phase	Interphase (vom englischen <i>gap</i> für Lücke)
G2-Phase	Postsynthesephase (vom englischen <i>gap</i> für Lücke)
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H-CAM	<i>Homing Cell Adhesion Molecule</i> (Homing-Zelladhäsionsmolekül)
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (Epithelialer Wachstumsfaktor 2-Rezeptor)
HLDA	<i>Human Leukocyte Differentiation Antigen</i>
HSA	<i>heat-stable antigen</i> (Hitze stabiles Antigen)
HUTCH-1	Synonym für CD44
ICD	<i>invasive ductal carcinoma</i> (invasives duktales Karzinom)
ILC	<i>invasive lobular carcinoma</i> (invasives lobuläres Karzinom)
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>

LN	lobuläre Neoplasie
MW	Mittelwert
META-Maus	Nacktmaus – Modellorganismus für Metastasierung
MRM	modifizierte radikale Mastektomie
MRUs	<i>mammary-repopulation units</i> (Brustdrüsen induzierende Einheiten)
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i> (Sequenzierung der nächsten Generation)
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i> (Nicht-fettleibig-diabetisch)
nu/nu	Albino Nacktmaus– Modellorganismus aus dem <i>Naval Medical Research Institute</i>
NMRI-Maus	
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer-Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PgP-1	phagozytotisches Glykoprotein-1
PROM1	Prominin 1
S1	Schutzstufe 1
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i> (schwerer kombinierter Immundefekt)
SD	Standardabweichung
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
SSI	<i>stemline scatter index</i> (Stammlinien Verteilungs-Index)
TACSTD1	<i>tumorassociated calcium signal transductor 1</i> (tumorassoziierter Calcium-Signalgeber 1)
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i> (Transformierender Wachstumsfaktor-β)
UDH	<i>usual ductal hyperplasia</i> (gewöhnliche (intra-) duktale Hyperplasie)
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i> (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	<i>world health organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WNT	<i>Wingless-type</i> (flügelloser Typ)

Verzeichnis verwendeter Maßeinheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
pmol	Picomol
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	enzyme unit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Modelle der Tumorentstehung	6
Abbildung 2:	Exemplarische Fotos des Wachstumsphänotyps von drei der elf verwendeten Zelllinien.....	21
Abbildung 3:	Die vier DNS-zytometrischen Histogramme nach Auer (1980).....	25
Abbildung 4:	Darstellung eines durchflusszytometrischen Messvorgangs	27
Abbildung 5:	Exemplarisches durchflusszytometrisches Histogramm der Mammakarzinom- Zelllinie T1	30
Abbildung 6:	Grafische Darstellung der DNS-Zytometrischen Messung der Normalzelllinien N1 und N2	32
Abbildung 7:	Grafische Darstellung der DNS-zytometrischen Messung der Tumorzelllinien T1, T2 und T3.....	33
Abbildung 8:	Grafische Darstellung der DNS-zytometrischen Messung der Tumorzelllinien T4, T5 und T6	34
Abbildung 9:	Grafische Darstellung der DNS-zytometrischen Messung der Metastasenzelllinien M1, M2 und M3	34
Abbildung 10:	Expression der Oberflächenantigene CD133, CD326, CD44, CD24, CD29, CD49f im Mittel in den analysierten Zellpopulationen.....	38
Abbildung 11:	Expression des Oberflächenantigens CD133 in den analysierten Zelllinien	40
Abbildung 12:	Expression des Oberflächenantigens CD326 in den analysierten Zelllinien	41
Abbildung 13:	Expression des Oberflächenantigens CD44 in den analysierten Zelllinien	42
Abbildung 14:	Expression des Oberflächenantigens CD24 in den analysierten Zelllinien	43
Abbildung 15:	Expression des Oberflächenantigens CD29 in den analysierten Zelllinien	44
Abbildung 16:	Expression des Oberflächenantigens CD49f in den analysierten Zelllinien.....	45
Abbildung 17:	Der Einfluss von Tumorstammzellen auf die zukünftige Therapie des Mammakarzinoms	63

Tabellenverzeichnis

Abbildung A1:	Interpretation der DNS-Histogramme anhand der genomischen Instabilität nach Kronenwett (2004)	87
Abbildung A2:	Pathway Analyse mittels IPA (Ingenuity Pathway Analyses) der analysierten Tumorstammzellmarkern zur Detektion assoziierter Signalwege.....	88

Tabelle 1:	Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	18
Tabelle 2:	Verwendete Isotyp-Kontrollen für durchflusszytometrische Analysen.....	19
Tabelle 3:	Standardkulturbedingungen für die verwendeten Mammazelllinien.....	20
Tabelle 4:	Einteilung der Zelllinien nach Progressionsgrad und TNM-Klassifikation	21
Tabelle 5:	Ergebnisse der DNS-zytometrischen Messung und Übersicht über die Ploidieklassifizierung der Normal- und Mammakarzinom-Zelllinien.....	35
Tabelle 6:	Darstellung der Expressionsprofile der Tumorstammzellmarker in Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien.....	36
Tabelle 7:	Darstellung der Expressionsprofile der Tumorstammzellmarker im Mittel in den analysierten Zellpopulationen	37
Tabelle A1:	TNM-Klassifikation für Brustkrebs	89
Tabelle A2:	Stadiengruppierung nach UICC bzw. AJCC	89

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung

Das Mammakarzinom ist die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen. Klinische Therapiestrategien operieren unter der Annahme, dass alle Tumorzellen das gleiche maligne Potenzial aufweisen. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass Wachstum und Progression des Tumors nur von einer kleinen Fraktion von Tumorstammzellen abhängig sind. Der Tumorstammzelltheorie liegt die Annahme zu Grunde, dass nur eine kleine Subpopulation von Zellen innerhalb des Tumors, die sogenannten Tumorstammzellen, tumorigenes Potential besitzen. Diese Tumorstammzellen bestimmen die Tumorprogression und –migration sowie die Initiierung neuer Tumoren und Manifestation lebenslimitierender Metastasen [45, 55, 156]. Gängige Therapeutika greifen proliferierende, aktive Zellen an, sodass Tumorstammzellen in der Seneszenz unbeeinträchtigt bleiben [33]. Trotz einer Remission durch eine Zerstörung aller ausdifferenzierten Tumorzellen kann es daher im Verlauf zu einer Reaktivierung und damit zu einem Tumorrezidiv mit einem ähnlichen histologischen Phänotyp kommen [54, 161, 186]. Somit bedarf es einer genaueren Charakterisierung der Mammakarzinom-Stammzellen, um in Zukunft die neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tumorforschung in die Therapie des Mammakarzinoms einfließen zu lassen [143]. Etablierte Zelllinien könnten dabei sowohl als Grundlage für die Charakterisierung dieser Tumorstammzellen als auch als Modellsystem für die Entwicklung neuer Chemo- und Radiotherapeutika dienen [81].

1.2 Das Krankheitsbild des Mammakarzinoms

1.2.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Die Gesamtlebenszeit-Prävalenz, an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt für Frauen bei ca. 12% [90]. Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2021 in Deutschland 18.636 Menschen an Brustkrebs [176].

1. EINLEITUNG

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Genese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell. Etwa 5% aller Mammakarzinome entstehen aufgrund einer familiären Disposition, wobei es sich am Häufigsten um Mutationen der Tumor-Suppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* handelt [6, 37].

Zu den benignen bzw. präinvasiven Läsionen, die entweder mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen oder aber als Präkanzerosen im engeren Sinne anzusehen sind, zählen die gewöhnliche (intra-) duktale Hyperplasie (*usual ductal hyperplasia*, UDH), die atypische (intra-) duktale Hyperplasie (ADH), das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und die lobuläre Neoplasie (LN; ehemals atypische lobuläre Hyperplasie und lobuläres Carcinoma in situ) [101]. Weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs sind hormonelle Einflüsse wie frühe Menarche (<12. Lebensjahr), späte Menopause (> 55. Lebensjahr), Nulliparität, späte Erstparität (> 35. Lebensjahr) und eine kurze Stillperiode sowie ein unbehandeltes Mammakarzinom auf der kontralateralen Seite [47, 97, 148, 160].

1.2.3 Klassifikation

1.2.3.1 Histologische Klassifikation

Die histologische Typisierung von Mammakarzinomen erfolgt entsprechend der WHO-Klassifikation im Rahmen der präoperativen Diagnostik am Stanz- und Vakuumbiopsie-Material und die abschließende Zuordnung am Operationspräparat. Der häufigste Tumortyp ist mit 40-75% das invasive duktales Karzinom (ICD), das eine heterogene Gruppe von Tumoren umfasst. Das invasive lobuläre Karzinom (ILC) macht ca. 5-15% der Mammakarzinome aus und zeichnet sich in seinem klassischen Erscheinungsbild durch seine Kleinzelligkeit, sein dissoziiertes infiltrierendes Wachstum und eine begleitende Desmoplasie aus. Weitere Typen sind das tubuläre, muzinöse und medulläre Karzinom (je etwa 2%), welche eine günstigere Prognose zeigen, sowie als Sonderform des duktales Carcinoma in situ der Morbus Paget der Mamille [19].

1.2.3.2 Differenzierungsgrad

Die histologischen Typen werden entsprechend Elston und Ellis nach histo- und zytologischen Kriterien in drei Differenzierungsgrade eingeteilt (G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = schlecht differenziert). Die Einstufung erfolgt nach

1. EINLEITUNG

Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate, wobei ein höherer Malignitätsgrad (synonym Differenzierungsgrad) ein ungünstigeres Tumorverhalten anzeigt [57].

1.2.3.3 TNM-Klassifikation

Die Tumorausbreitung wird durch eine vollständige klinische Untersuchung der Patientinnen ermittelt und nach den TNM-Kriterien der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC, dt. Internationale Vereinigung gegen Krebs) klassifiziert (**Tabelle A1**). Aus der TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms ergibt sich die Stadieneinteilung nach UICC bzw. AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (**Tabelle A2**).

1.2.3.4 Immunhistochemische Zusatzuntersuchungen

Beim invasiven Mammakarzinom sollte in der Primärdiagnostik der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie der HER-2/neu-Status bestimmt werden, vorzugsweise bereits an der Stanzbiopsie. Hierdurch kann das mögliche Ansprechen auf eine endokrine Therapie, bzw. eine Anti-HER-2/neu-Therapie abgeschätzt werden [70]. Durch den Ki-67-Proliferationsindex kann eine weitere Subklassifikation erfolgen, wobei bislang keine allgemein anerkannte, umfassende Empfehlung zur Standardisierung verfügbar ist, was die klinische Anwendung von Ki-67 als Entscheidungsgrundlage für die Therapie erschwert [101, 113].

1.2.4 Klinische Präsentation

Die Symptome eines Mammakarzinoms umfassen Hautveränderungen (*Peau d'orange*, Erythem, Ekzem), Mamillensekretion (einseitig, wässrig-blutig, ohne umschriebene tastbare Veränderung), asymmetrische Verdichtungen (Knotigkeit) und umschriebene tastbare Veränderungen (Knoten) mit und ohne Schmerzen [133].

Zu der notwendigen Basisdiagnostik gehören die klinische Brustuntersuchung, die Mammographie und die Ultraschalldiagnostik. Ergibt die klinische Brustuntersuchung einen auffälligen Befund, sollten sich bildgebende Verfahren und ein histologischer Nachweis anschließen [34, 101, 145]. Frauen ab 30 Jahren bietet das gesetzliche Früherkennungsprogramm eine jährliche Tastuntersuchung beim Arzt an. Zwischen 2005 und 2009 wurde in Deutschland das Mammographie-Screening als Sekundärprävention für Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren eingeführt [17].

1. EINLEITUNG

1.2.5 Therapie und Verlauf

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung sowie dem Alter und Begleiterkrankungen der Patientinnen und sollte im Frühstadium die Heilung, im Stadium der Metastasierung die Verbesserung der Lebensqualität anstreben. Die Therapie besteht aus einer der Erkrankung angepassten Kombination aus chirurgischer Therapie, Strahlentherapie, Chemotherapie, antihormoneller Therapie und Antikörpertherapie.

Lokalrezidive nach brusterhaltender Operation und Bestrahlung treten mit einer Häufigkeit von 5–10 % (nach 10 Jahren) auf. Eine Auswertung deutscher Krebsregister durch das Robert-Koch-Institut hatte 2014 ein 5-Jahres-Überleben von 78% für Männer und 88% für Frauen ermittelt. Prognostische Faktoren für das Auftreten eines lokalen/lokoregionalen Rezidivs nach modifizierter radikaler Mastektomie (MRM) oder brusterhaltender Therapie (BET) sind Anzahl der befallenen Lymphknoten, Tumorgröße (maximaler Durchmesser), Differenzierungsgrad, Hormonrezeptorstatus, Resektionsstatus (R0/R1/R2) und Fokalität (unifokal > multifokal > inflammatorisch) [101].

1.3 Genetische In-/Stabilität

Der Zellzyklus unterliegt einer strengen Kontrolle, durch die genomische Abweichungen wie Aneuploidie verhindert werden sollen. Veränderungen des DNS-Gehaltes wurden von dem Würzburger Biologen Theodor Boveri bereits vor über 100 Jahren mit der Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht [24]. Man geht heutzutage davon aus, dass zelluläre Aneuploidie eine zentrale Rolle in der Karzinogenese spielt, wobei eine fehlerhafte DNS-Replikation [99] und Zellteilung (Zentrosomen-Separation [38], chromosomale Segregation [88, 122]) zu der Entstehung eines abnormalen DNS-Gehaltes (Aneuploidie) und damit zur Tumorgenese führen. Zellen mit einer chromosomalen Instabilität generieren Tochterzellen mit vielfältigen genetischen Veränderungen, die zu einem Überlebens- und Wachstumsvorteil führen und so das Tumorwachstum vorantreiben können. Größtenteils führt die zelluläre Aneuploidie zur Apoptose der Zellen. Evolutionäre Selektion lebensfähiger aneuploider Zellen, die die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen, könnte jedoch zu neuen, stabilen Zelllinien führen.

1. EINLEITUNG

1.3.1 Ploidie

In einer Vielzahl von Studien wurden die prognostische und prädiktive Aussagekraft der Ploidie für epitheliale Tumoren untersucht [51, 67]. Das Mammakarzinom wurde als erster Tumortyp intensiv mittels DNS-Zytometrie beforscht. Intratumorale Heterogenität, genomische Instabilität und ein chromosomales Ungleichgewicht sind charakteristisch für frühe Stadien des Mammakarzinoms [142]. In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen DNS-Aneuploidie und Tumorgenese, Tumorgrad und Prognose des Mammakarzinoms nachgewiesen werden [9, 94, 106, 149, 211].

1.3.2 DNS-Zytometrie

Der DNS-Gehalt einer Zelle kann durch unterschiedliche Verfahren (Durchflusszytometrie oder statische Bildzytometrie) bestimmt werden. Die Durchflusszytometrie ist ein schnelles Verfahren mit der Möglichkeit, eine Vielzahl von Parametern gleichzeitig zu bestimmen. Es kann mit einer hohen Sensitivität aneuploide Werte nahe diploider Grenzen detektieren [138]. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich, simultan morphologische Aspekte einzelner Zellen zu vergleichen oder Ploidie an Zellen im Gewebeverband zu bestimmen. Mittels der statischen Bildzytometrie kann die zu untersuchende Zellpopulation direkt visualisiert und abnormale Zellen auch bei einer geringen Zellzahl erkannt werden [20]. Beide Verfahren zeigen eine hohe Ergebnisübereinstimmung hinsichtlich der Analyse des DNS-Gehaltes [109, 159].

1.4 Modelle der Tumorentstehung

Tumoren sind eine morphologisch und funktionell heterogene Population von Zellen, die sich hinsichtlich Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsfähigkeit unterscheiden [164, 182]. Das wachsende Verständnis der Tumorbiologie fördert die Optimierung neuer Frühdiagnostik-, Prognostik- und Therapiemöglichkeiten.

Im Folgenden werden zwei Erklärungsmodelle für die Entstehung der Tumorheterogenität vorgestellt: das klonale Evolutionsmodell und das Tumorstammzellmodell.

1.4.1 Klonales Evolutionsmodell der Tumorentstehung

Das klonale Evolutionsmodell oder auch stochastische Modell lehnt sich an die Darwin'sche Theorie an [127]. Dabei verfügt jede Tumorzelle innerhalb eines Tumors über das gleiche

1. EINLEITUNG

tumorigene Potential; jedoch nur ein kleiner Teil von ihnen hat die Möglichkeit, eine passende Umgebung bzw. Nische für das Tumorwachstum zu finden. Die Tumorentstehung basiert auf der Akkumulation multipler Mutationen innerhalb einer einzigen Zelle, in der so zufällig eine mutagene Veränderung entsteht, die in einer übersteigerten Proliferation, einer inhibierten Differenzierung und einer reduzierten Apoptosebereitschaft resultiert. Basierend auf der positiven Selektion mehrfach mutierter, genetisch instabiler Zellen kommt es zu einer klonalen Expansion und damit einer stetigen Tumorprogression. Ausgehend von der Klonalität, die diesem Modell gedanklich zugrunde liegt, wird die Heterogenität von Tumoren damit begründet, dass basierend auf einer Kombination aus zufälligen genetischen Veränderungen und Anpassung an das Mikromilieu des Tumors unterschiedlich mutierte Subklone innerhalb eines Tumors entstehen und nebeneinander positiv selektiert werden. Dies bedeutet, dass potentiell jede Tumorzelle über die Eigenschaft der Invasivität, Metastasierung und Therapieresistenz verfügen kann [36, 73, 137] (**Abbildung 1**).

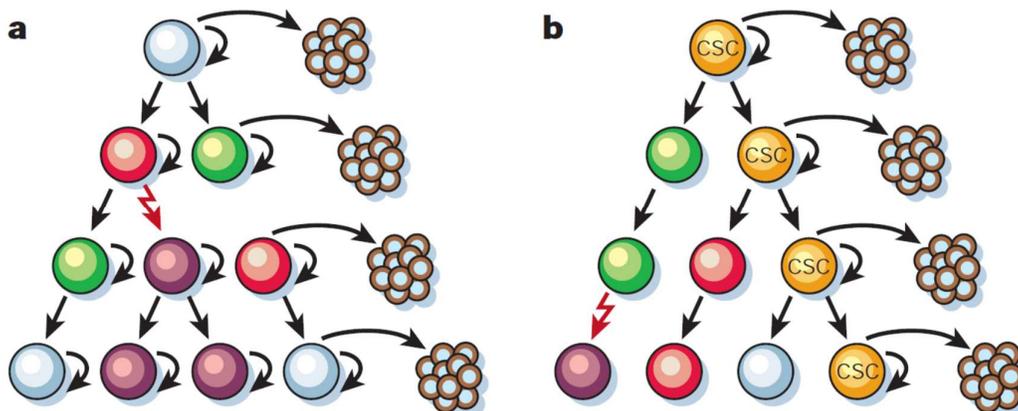


Abbildung 1: Modelle der Tumorentstehung

A) Das klonale Evolutionsmodell nimmt an, dass alle aus einer heterogenen Tumorpopulation gewonnenen Tumorzellen (farbige Kreise) die Fähigkeit zur Proliferation, Regeneration und Initiation von Tumoren besitzen. B) Das Tumorstammzellmodell besagt, dass nur eine kleine Subpopulation innerhalb des Tumors, die Tumorstammzellen - CSCs = cancer stem cells (orange Kreise), in der Lage sind, sich zu regenerieren und Tumoren in-vivo zu formen. Der Großteil der heterogenen Tumorzellpopulation besitzt diese Fähigkeiten nicht und ist somit nicht tumorigen. Die roten zick-zack-Pfeile stehen für die genetischen und/oder epigenetischen Veränderungen, die in einem onkogenen Zellprogramm münden. Die runden Pfeile repräsentieren proliferierende Zellen.

Reya et al. (2001) [156]

1. EINLEITUNG

1.4.2 Tumorstammzellmodell der Tumorentstehung

Ein anderes Erklärungsmodell für die Entstehung der Tumorerheterogenität ist das Tumorstammzellmodell. Zur besseren Einordnung werden zunächst embryonale und adulte Stammzellen beschrieben und dann das Tumorstammzellmodell vorgestellt.

1.4.2.1 Embryonale und adulte Stammzellen

Charakteristische Eigenschaften aller Stammzelltypen sind Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung. Im Wesentlichen werden embryonale und adulte Stammzellen unterschieden, die sich vor allem durch ihre Herkunft bzw. ihr Alter und das damit verbundene Differenzierungspotenzial unterscheiden.

Embryonale Stammzellen des Blastomeren-Stadiums sind omnipotent und können sich damit noch in jede Zellform der verschiedenen Keimblätter, aber auch Plazenta oder Keimbahnzellen differenzieren. Spätere embryonale Stammzellen des Embryoblasten sind pluripotent. Aus ihnen können sich alle somatischen Zellen der drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) entwickeln.

Postembryonale Stammzellen, die sog. adulten Stammzellen hingegen werden nur noch als multipotent bezeichnet und haben ein deutlich geringeres Selbsterneuerungsvermögen und ein eingeschränkteres Differenzierungspotential als embryonale Stammzellen. Sie finden sich in den Organen des erwachsenen Organismus und differenzieren dort zu den organ-/gewebespezifischen somatischen Zellen aus. Beispiele für Gewebe mit Stammzell-Reservoirs sind das Knochenmark, die Nabelschnur, Gehirn, Leber, Darm, Haut und das Pankreas [195].

1.4.2.2 Tumorstammzellmodell

Der Tumorstammzelltheorie liegt die Annahme zu Grunde, dass nur eine kleine Subpopulation von Zellen innerhalb des Tumors, die sogenannten Tumorstammzellen, tumorigenes Potential besitzen. Diese Tumorstammzellen bestimmen die Tumorprogression und –migration sowie die Initiierung neuer Tumoren und Manifestation lebenslimitierender Metastasen [45, 55, 156]. Die Tumorstammzellen weisen dabei mehrere Schlüsseleigenschaften normaler Stammzellen auf: Selbsterneuerung, unlimitierte Proliferation, eine seltene und langsame Replikation, Resistenz gegenüber verschiedenen Noxen, hohe DNA-Reparaturfähigkeit und die Fähigkeit, differenzierungsfähige Tochterzellen zu generieren. Diese hierarchische Organisation findet sich auch in normalem

1. EINLEITUNG

Gewebe, in dem eine kleine Subpopulation von Zellen, die adulten Stammzellen, das Wachstum und die Erneuerung des Gewebes aufrechterhalten. Tumorstammzellen zeigen im Gegensatz zu adulten Stammzellen dysregulierte Selbsterneuerungs- und Differenzierungsprogramme. Diese Subpopulation von Tumorstammzellen bleibt durch Selbsterneuerung mit asymmetrischer Zellteilung fortbestehen. Ihre Tochterzellen zeichnen sich durch eine hohe Replikationsrate aus und machen somit den Großteil der Tumormasse aus, verlieren jedoch die typischen Stammzeleigenschaften und haben nur noch ein limitiertes Proliferationspotential. Die Heterogenität von Tumoren spiegeln hierbei die in verschiedenen Differenzierungsstadien terminierten Tochterzellen wider [164, 182] (**Abbildung 1**).

1.4.2.3 Ursprung der Tumorstammzellen

Schon 1867 postulierte Cohnheim [46], dass Tumoren entweder aus Zellen mit Stammzeleigenschaften oder direkt aus einer gewebespezifischen Stammzelle hervorgehen. 2011 wurde von den Teilnehmern der Konferenz zu Tumorstammzellen (*The 2011 Working Conference on CSCs*) ein Leitfaden zur Definition und Terminologie von Tumorstammzellen erstellt [191].

Wenn die gewebliche Stammzelldifferenzierung ein monodirektionaler Prozess ist, bei dem partiell differenzierten Zellen die Rückkehr zu dem „Stammzellprogramm“ im transformierten Zustand nicht möglich ist, ist eine naheliegende Ursprungszelle der Tumorstammzelle die gewebespezifische, adulte Stammzelle [188, 197]. Diese Theorie wird von mehreren Annahmen gestützt: Adulte Stammzellen besitzen bereits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Bildung differenzierter Vorläuferzellen. Außerdem birgt ihre geringe Replikationsrate und damit ihre Langlebigkeit ein größeres Potential für die Akkumulation von seriellen Mutationen, die zur Transformation in eine Tumorstammzelle führen können [156].

Bei der Transformation der Gewebestammzelle zur Tumorstammzellen kommt dem Mikromilieu eine entscheidende Bedeutung zu. So können Stammzellen Mutationen durchlaufen, die a) eine Adaptation an alternative Nischen und eine Expansion in andere Umgebungen möglich machen, b) zu der Proliferation von Nischenzellen führen, die in eine Expansion der Nische münden, an die die mutierten Stammzellen angepasst sind, c) eine nischenunabhängige Selbsterneuerung zulassen, und/oder d) durch eine Modifikation der Nische zu der Selektion von bestimmten Stammzell-Mutationstypen führen, die maligne

1. EINLEITUNG

Vorläuferzellen darstellen [45]. Es wird angenommen, dass für das Überleben, die Proliferation und Differenzierung der metastasierten Stammzellen an dem Ort ihrer Absiedelung fehlregulierte Signale des Mikromilieus verantwortlich sind [23, 115, 202]. Somit spielen Tumorstammzellen und ihre Mikroumgebung die entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Tumoren und der damit verbundenen Krankheitsprognose [124].

Verschiedene Studien legen nahe, dass Tumorstammzellen auch durch Re-Differenzierung aus Progenitorzellen entstehen können [39, 84, 87, 105]. Für dieses Konzept spricht, dass ein großer Pool an Progenitorzellen zur Verfügung steht und gerade die rasche Replikationsrate luminaler Zellen ein erhöhtes karzinogenes Risiko birgt. Da differenzierte Progenitorzellen das Potential zur Selbsterneuerung jedoch bereits verloren haben, müssten sie erst multiple Mutationen zur Rückerlangung dieser Fähigkeit durchlaufen. Der Transformationsprozess übt dabei einen starken Selektionsdruck auf die differenzierten Zellen aus. Nur Zellen, die die epigenetischen Veränderungen zur Wiederherstellung der Stammzeleigenschaften durchlaufen, sind fähig, mehrere Transformationen zu erfahren [177].

1.4.2.4 Identifikation von Tumorstammzellen

Ein Großteil des Wissens über die Biologie der Tumorstammzellen wurde aus Experimenten zur Erforschung der normalen und malignen Hämatopoese erworben. John Dick und seinen Mitarbeitern gelang es, Ende des 20. Jahrhunderts mittels FACS-Analysen (*fluorescence activated cell sorting*, auf Deutsch: fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) zum ersten Mal leukämische Stammzellen nachzuweisen [21, 110]. Einige Jahre später isolierten Al-Haj et al. aus der Pleuraflüssigkeit von Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium des Mammakarzinoms tumorogene Zellen [3]. Diese wiesen das spezifische Zelloberflächen-Antigen-Profil $Lin^{neg}CD44^{pos}CD24^{neg/low}$ auf und konnten in seriellen Transplantationen in NOD/SCID-Mäusen Tumoren mit einem ähnlichen Phänotyp zum Ursprungstumor formen. Hierfür reichten weniger als hundert Zellen aus, wohingegen mehrere tausend Zellen alternativer Phänotypen diese Fähigkeit nicht besaßen. Die Definition der Eigenschaften von normalen Stammzellen und Tumorstammzellen entwickelte sich schnell weiter [45, 117]. Im Jahre 2006 isolierten zwei Arbeitsgruppen Brustdrüsenstammzellen aus Mäusen: Shackelton et al. [165] zeigten, dass $Lin^{neg}CD29^{hi}CD24^{pos}$ Zellen die Fähigkeit besaßen, nach Implantation in einen geeigneten Wirt eine komplette Brustdrüse zu regenerieren. Diese Zellen wurden als *mammary-repopulation units* (MRUs; auf Deutsch: Brustdrüsen

1. EINLEITUNG

induzierende Einheiten) bezeichnet. Gleichzeitig beschrieben Stingl et al. [178] den Immunphänotyp der MRUs als CD49^{pos}CD24^{pos}Sca-1^{low}. Mit der Annahme, dass Tumorstammzellen sich aus normalen Stammzellen entwickeln [156], lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Marker, die zu der Isolation normaler Brustdrüsen-Stammzellen dienen, auch für die Charakterisierung von Mammakarzinom-Stammzellen hilfreich sein könnten [198]. So entwickelte sich die Phänotypisierung der Tumorstammzellen in den Folgejahren rasant weiter [25].

1.4.3 Zelllinien als Modellsystem für die Tumorstammzellforschung

Mammakarzinom-Zelllinien werden bereits viele Jahre genutzt, um die Fehlsteuerung in der Proliferation, Apoptose und Migration des Mammakarzinoms sowie damit im Zusammenhang stehende Gene und Signalwege zu erforschen [81, 112]. Neuere Studien zeigen, dass auch etablierte Mammakarzinom-Zelllinien eine kleine Subpopulation selbsterneuerbarer, tumorigener Zellen mit der Fähigkeit, phänotypisch unterschiedliche Tochterzellen zu generieren, enthalten [62, 74]. So konnten in etablierten Mammakarzinom-Zelllinien Subpopulationen mit Stammzeleigenschaften identifiziert und eine hierarchische Organisation immortalisierter Zelllinien nachgewiesen werden [42]. Han et al. isolierten aus etablierten Mammakarzinom-Zelllinien Subpopulationen mit tumorigenen Eigenschaften, die *in-vivo* Tumoren initiieren konnten [49]. Etablierte Zelllinien könnten damit der Schlüssel für die Charakterisierung von Tumorstammzellen und eine wichtige Grundlage für die Etablierung neuer Therapieoptionen sein.

1.6 Tumorstammzellmarker

1.6.1 Cluster of Differentiation-Antigene

In den 70er und 80er Jahre wurde mit der Herstellung monoklonaler Antikörper und der Generierung verschiedener Klone schnell eine geeignete Klassifikation für phänotypisch verschiedene Zellen nötig. Auf dem ersten *International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA)* wurde 1982 der Grundstein für die sog. CD-Nomenklatur gelegt.

Die Nomenklatur für die CD-Antigene bezieht sich auf den immunphänotypischen Status einer Zelle hinsichtlich spezifischer Membranproteine, die an intrazelluläre Signalkaskaden

1. EINLEITUNG

oder der interzellulären Adhäsion und Kommunikation beteiligt sind. Diese Oberflächenmoleküle, die auch als Differenzierungsantigene bekannt sind, werden nach der internationalen Nomenklatur "*Cluster of Differentiation*" (kurz CD, auf Deutsch: Unterscheidungsgruppen) nach biochemischen und funktionellen Kriterien standardisiert, in Gruppen klassifiziert und benannt. Hiermit wird eine Gruppierung immunzytologisch/morphologisch ähnlicher oder gleicher Zellen ermöglicht.

1.6.2 In dieser Arbeit detektierte CD-Antigene

CD133 ist auch unter den Namen AC133 und Prominin 1 (PROM1) bekannt und gehört zu der Familie der 5-Transmembranglycoproteine. Neben seinem physiologischen Vorkommen auf adulten Stamm- und Progenitorzellen [170] wurde eine Überexpression von CD133 im pathologischen Kontext bei vielen verschiedenen Tumorentitäten beschrieben, bspw. bei Hirntumoren [79, 173], Prostatakarzinomen, Pankreaskarzinomen [114], Gallenblasenkarzinomen [168], Kolonkarzinomen [139, 157], Ovarialkarzinomen [108] und BRCA1-positiven Mammakarzinomen [203]. CD133 ist an der Tumorentstehung [128], Zellmigration [111], Vaskularisierung [118] und Metastasierung [30] des Mammakarzinoms beteiligt. In verschiedenen Studien gibt es Hinweise für seine prädiktive und prognostische Bedeutung in der Behandlung des Mammakarzinoms [7, 98, 132].

CD133 wird als vielversprechender Marker zur Abschätzung der Metastasierungneigung [30] und erfolgreichen Chemotherapie [132] des Mammakarzinoms gesehen und in verschiedenen Studien als Zielstruktur für neue Therapeutika untersucht [15, 179].

CD326 ist auch unter den Synonymen EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*, auf Deutsch: epitheliales Zelladhäsionsmolekül) und TACSTD1 (*tumorassociated calcium signal transductor 1*, auf Deutsch: tumorassoziiertes Calcium-Signalgeber 1) bekannt und wird auf der basolateralen Zelloberfläche fast aller epithelialer Zellen sowie von undifferenzierten pluripotenten Stammzellen exprimiert [162, 198]. Es ist ein homotypes, kalziumabhängiges Zelladhäsionsmolekül und steht über seine intrazelluläre Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung [162]. CD326 ist über den Cadherin-Catenin-Signalweg mit dem Wnt-Signalweg verknüpft [205] und über verschiedene Mechanismen an der Tumorentstehung beteiligt [13]. Als Karzinom-assoziiertes Antigen findet es sich auf Tumorstammzellen verschiedener Tumorentitäten wie dem Kolonkarzinom [50], dem

1. EINLEITUNG

Pankreaskarzinom [114] und auch dem Mammakarzinom [3]. Die Verwendung von CD326 als Stammzellmarker wird derzeit kontrovers diskutiert, da die Expression stark unter dem Einfluss der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) steht, die während der Tumorprogression durchlaufen wird [72].

CD44 ist als transmembranes Glykoprotein an einer Vielzahl von Zellinteraktionen beteiligt. Weitere Namen für CD44 sind auch Homing-Zelladhäsionsmolekül (H-CAM), phagozytotisches Glykoprotein-1 (PgP-1), Extrazellulärmatrix-Rezeptor III (ECM-III), HUTCH-1 oder Hermes-1. CD44 interagiert als Rezeptor für Hyaluronsäure mit Liganden wie Osteopontin, Kollagen und Matrixmetalloproteasen und hat über Veränderungen der extrazellulären Matrix Einfluss auf die Zelldifferenzierung, -adhäsion und -migration [71, 151]. CD44 wird von 90% aller hämatopoetischen Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und seltener auch von Thymozyten, Fibroblasten und Erythrozyten exprimiert. Zudem konnte es auf der Membran verschiedener Tumorstammzellen einzeln oder in Kombination mit anderen Markern identifiziert werden. Beispielhafte Tumorentitäten sind hier das Mammakarzinom [3], das Pankreaskarzinom [114], Kopf- und Halstumore [152], das Kolonkarzinom [50], intestinale Tumore [214], das Leberkarzinom [209], das Magenkarzinom [180], das Blasenkarzinom [41] und das Ovarialkarzinom [219]. CD44 spielt eine Schlüsselrolle bei der Proliferation und Apoptose von Endothelzellen, sodass durch Prozesse der Neovaskularisierung Tumorentstehung und -progression gefördert werden können [189]. Als Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure ist es an der Zelladhäsion [126], Migration [11], Invasion [129] und Metastasierung [126, 167] von Mammakarzinomzellen beteiligt. Zudem scheint CD44 eine prognostische Aussagekraft zuzukommen [1, 52].

CD24 (Synonym: HSA = *heat-stable antigen*, auf Deutsch: Hitze stabiles Antigen) ist ein GPI (Glykosylphosphatidylinositol) gebundenes Membranprotein und Ligand für P-Selektin. CD24 spielt vor allem in der hämatopoetischen Reifung von B-Lymphozyten, in der neuronalen Entwicklung und der homeostatischen Zellerneuerung eine Rolle [61]. In verschiedenen Karzinomen (z.B. Mammakarzinom [104], Ovarialkarzinom [102], Endometriumkarzinom [140], kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom [103], Nasopharynxkarzinom [95], Leberzellkarzinom [208]) war die CD24 Überexpression mit

1. EINLEITUNG

einer schlechteren Prognose und erhöhten Tumormetastasierung assoziiert [16, 174]. In Kombination mit anderen Stammzellmarkern konnte CD24 erfolgreich sowohl zur Isolierung von Stammzellen der Brustdrüse [165, 178] als auch von Mammakarzinom-Stammzellen [3] eingesetzt werden. Auch wenn CD24 überwiegend in der Charakterisierung von Mammakarzinom-Stammzellen Verwendung findet, konnte es auch auf anderen Tumorstammzellen beispielsweise des Ovarialkarzinoms [65] und des Nasopharynxkarzinoms [207] nachgewiesen werden.

CD29 ist auch unter den Namen Integrin- $\beta 1$ und Fibronectin-Rezeptor bekannt [85]. Als Zelladhäsionsmolekül ist es an der Erkennung einer Vielzahl von Prozessen wie der Embryogenese, Hämostase, Immunantwort und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt [26]. Desweiteren ist CD29 Zielantigen bei der Isolierung von Stammzellen der Brustdrüse [165, 178] und konnte in Tumorstammzellen des Kolonkarzinoms [96], p53-negativen und BRCA1-positiven Mammakarzinomen [194, 218] detektiert werden. Es scheint an der Metastasierung des Mammakarzinoms beteiligt zu sein [193], sodass durch die Interaktion von Lemur Tyrosinkinase 3 (LMTK3) mit dem Wachstumsfaktor-Rezeptor gebundenen Protein 2 (*growth factor receptor-bound protein 2*, GRB2) eine gesteigerte CD29 Expression und damit erhöhte Invasivität, Motilität und Migration in Mammakarzinom-Zelllinien induziert werden konnte [204].

CD49f, auch Integrin- $\alpha 6$ genannt, kann mit CD29 Heterodimere (Integrin $\alpha 6\beta 1$) bilden [120], welche als Adhäsionsrezeptoren für Membranproteine der Laminin- und Desintegrinfamilie dienen. Es ist stark in embryonalen, hämopoetischen und neuralen Stammzellen exprimiert [63] und spielt wie CD29 eine entscheidene Rolle bei der Isolierung von Stammzellen der Brustdrüse [165, 178]. CD49f wurde in verschiedenen Tumorstammzellen nachgewiesen [131, 194] und soll mit einer erhöhten Tumorproliferation, dem Metastasierungsprozess [193, 210] und der Therapieresistenz [187] des Mammakarzinoms assoziiert sein.

2. FRAGESTELLUNG

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, etablierte Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihres Ploidie-Status und ihrer Tumorstammzellmarker-Expression zu charakterisieren und dadurch neue Erkenntnisse über Tumorstammzellen in Zelllinien zu gewinnen.

Spezielle Fragestellungen im Einzelnen waren:

1. Wie unterscheiden sich die Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien verschiedener Tumorstadien in ihrem Ploidie-Status voneinander?
2. Lassen sich in etablierten Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien verschiedener Tumorstadien charakteristische Tumorstammzellmarker nachweisen?
3. Zu welchen Prozentsätzen werden dabei charakteristische Tumorstammzellmarker in den verschiedenen Zelllinien exprimiert?
4. Lassen sich in dem Expressionsmuster der Tumorstammzellmarker zwischen Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien verschiedener Tumorstadien Unterschiede aufzeigen?
5. Besteht eine Korrelation zwischen Tumorstammzellmarker-Expression und Ploidie-Status der Zelllinien?
6. Besteht eine Vernetzung der Tumorstammzellmarker im gleichen biologischen Netzwerk?

3. MATERIAL UND METHODEN

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 *Materialien*

3.1.1 Geräte

Autoklav Laboklav 25	Webeco
Brutschrank CO ₂ Inkubator Galaxy 170R	Brunswick/Eppendorf
Durchflusszytometer CTX-500 und LSRII	Beckman-Coulter, BD
Einfrierbox Frosty	Kisker
Eismaschine F 80C	Icematic
Fluoreszenzmikroskop Biorevo BZ-9000	Keyence
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher
Gefrierschränke (-20°C), verschiedene	AEG, Siemens
Glaswaren	Schott Duran
Halbautomatische Pipetten (1000 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL, 2,5 µL)	Eppendorf
Sterile Werkbank 581 I	Köttermann
Kühlschränke, verschiedene	Privileg, Bosch
Lichtmikroskop Axiovert, Axioplan	Zeiss
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann
Stickstofftanks, verschiedene	Airliquide
Tischzentrifuge Sprout	Biozym
Vortexer, verschiedene	IKA
Waagen:	
Analysewaage Scaltec SBC32	Scaltec
Präzisionswaage Kern KB	Kern
Wasseraufbereitungsanleitung Milli-Q	Millipore
Wasserbäder, verschiedene	GFL
Zentrifugen:	
Eppendorf 5415D , 5417R	Eppendorf
Rotanta 46 RS	Hettich
Zytospin Zentrifuge Zytospin 2	Shandon

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alufolie	Labor
Deckgläschen 18 x 18 mm, 24 x 40 mm	Menzel
Einmalhandschuhe, verschiedene	Supermax, NitraTex
Einmalspritzen Plastipak 20 mL, 5 mL, 2 mL, 1 mL	Beckton Dickenson
Einmalkanülen Microlane 3 20G, 22G	Beckton Dickenson

3. MATERIAL UND METHODEN

FACS Röhren	BD Pharmingen
Klebefolie sealing tape 96-well	Sarstedt
Medium-Filter 0,2 µm, 0,45 µm	NalgenNuc, Millipore
Mikroschraubröhren	Sarstedt
Objektträger	Omnilab
Parafilm	Pechinery Packaging
Pasteurpipetten 230 nm	Assistent
Pipettenspitzen ungestopft (1000 µL, 100 µL, 10 µL)	Sarstedt
Pipettenspitzen gestopft (1000 µL, 100 µL, 10 µL)	Sarstedt
Plastikpipetten 5 mL, 10 mL, 20 mL	Sarstedt
PP tubes 15 mL, 50 mL	Greiner
Reaktionsgefäße Safe-Lock (2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL)	Eppendorf
Zellkulturflaschen 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zytospin-Träger Shandon	Thermo Scientific

3.1.3 Chemikalien

Aktivkohle	Merck
Aqua bidest MQ	Millipore
Bovines Serumalbumin Fraction 5	Roche
Choleratoxin aus Vibrio	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase I für Gewebedissoziation	ThermoScientific
Entellan	Merck Millipore
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma Aldrich
Ethanol absolut (99,8 %) (v/v)	Fluka
Ethanol (96%) (v/v)	Apotheke des UKSH, HL
Ethanolamin	Sigma Aldrich
Formaldehyd (4,5%) (v/v)	Roth
Fuchsin Hydrochlorid (basisch)	Sigma Aldrich
Glucose	Serva
Glutamin	Sigma Aldrich
HEPES	PAA
Hydrocortison	Sigma Aldrich
Insulin v. bovinem Pankreas	Sigma Aldrich
Kaliumpyrosulfid	Sigma Aldrich
Natriumpyrosulfid	Merck
Natriumpyruvat	PAA
Natriumselenit	Sigma Aldrich
Phosphat buffered Saline (PBS)	PAA
Phosphorylethanolamin	Sigma Aldrich

3. MATERIAL UND METHODEN

Penicillin-Streptomycin	PAA
Salzsäure	Merck
Triiodthyronin	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA Lösung	PAA
Wasserstoffperoxid 30% (v/v)	Sigma Aldrich
Xylol	Baker

3.1.4 Puffer und Lösungen

3.1.4.1 Puffer für die zytologische Analyse (FACS)

FACS Puffer (pH 7,2)

- 1x PBS
- 0,5% (w/v) BSA
- 0,1 U/mL *DNase*

3.1.4.2 Puffer für die Feulgenfärbung

Schiff'sches Reagenz

- 5g basisches Fuchsin in 150 mL 1 M HCl
- 5g Kaliumpyrosulfid + 850 mL MQ, über Nacht bei RT inkubieren
- + 3g Aktivkohle, 10 min. rühren, Aktivkohle 2 x abfiltrieren, in einer dunklen Glasflasche bei 4°C lagern.

Sulfidlösung

- 10 mL Natriumpyrosulfid
- 10 mL 1M HCl
- 180 mL MQ

3.1.5 Medien für humane Zelllinien

ACL-4 Growth Medium

Basierend auf DMEM:F12 (PAA) mit Zusätzen (Sigma): 0,02 mg/mL Insulin, 0,01 mg/mL Transferrin, 25 nM Natriumselenit, 50 nM Hydrocortison, 0,01 mM Ethanolamin, 10 mM HEPES, 1 ng/mL EGF, 3 mM Glutamin, 0,01 mM Phosphorylethanolamin, 100 pM Triiodthyronin, 0,5% (w/v) BSA, 0,5 mM Natriumpyruvat, 1 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF)

DMEM High Glucose Growth Medium	#E15-011	PAA
DMEM/Ham's F12 Growth Medium	#E15-012	PAA
Mam. Epit. Cell-Growth Medium (MEGM)	#C-21210	Promocell
RPMI 1640 Growth Medium	#30-2001	ATCC

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1.6 Software

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems Inc.
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems Inc
CXP FACS Analyse Software	Beckman-Coulter
Image-Zytometrie ICM Software	Ahrens Zytometrie
Ingenuity Pathway Analysis V9	Ingenuity Systems
Mikroskop Software	Zeiss
Office XP und Windows Vista	Microsoft

3.1.7 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden nachfolgend in **Tabelle 1 und 2** zusammengefasste Antikörper für die fluoreszenz-basierte Phänotypisierung von Mammazelllinien genutzt. Die Eigenschaften der Antikörper unter Angabe des Klons, des Wirtsorganismus, Fluoreszenz-Konjugats und des Herstellers sowie der Katalognummer sind nachfolgend dargestellt.

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

PE = Phycoerythrin, APC = Allophycocyanid, FITC = Fluoreszeinisothiozyanat, BE = Becton Dickinson.

Name des Antikörpers	Klon	Wirtsorganismus	Fluoreszenz-Konjugat	Hersteller
anti-CD133/2 (293C3)	293C3	Maus	PE	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland, #293C3
anti-CD326 (EpCAM)	EBA-1	Maus	APC	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #347200
anti-CD44	G44-26	Maus	FITC	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #555478
anti-CD24	ML5	Maus	FITC	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #555427
anti-CD29	MAR4	Maus	APC	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #559883
anti-CD49f	GoH3	Ratte	PE	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #555736

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2: Verwendete Isotyp-Kontrollen für durchflusszytometrische Analysen

PE = Phycoerythrin, APC = Allophycocyanid, FITC = Fluoreszeinisothiozyanat, BE = Becton Dickinson.

Name des Isotypen	Wirtsorganismus	Fluoreszenz-Konjugat	Dem Isotypen zugeordneter Primärantikörper	Hersteller
IgG2b	Maus	PE	CD133	Miltenyi Bergisch Gladbach, Deutschland, #130-092-215
IgG1 λ1	Hamster	APC	CD326	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #553956
IgG2b, κ	Ratte	FITC	CD44	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #556923
IgG2a, κ	Maus	FITC	CD24	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #555573
IgG1 κ	Maus	APC	CD29	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #555751
IgG2a, κ	Ratte	PE	CD49f	BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien, #553930

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1.8 Humane Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden elf Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien des Anbieters ATCC verwendet, deren Histologie, Progressionsgrad und Kulturbedingungen unter Angabe des Kultur-Mediums, des zugehörigen FBS- und CO₂-Gehalts in **Tabelle 3** zusammengefasst sind.

Tabelle 3: Standardkulturbedingungen für die verwendeten Mammazelllinien

n.v.: nicht verfügbar, n.a.: nicht anwendbar, LK negativ/positiv: mit/ohne Lymphknotenmetastasierung

Offizieller Name (interner Name)	ATCC Nummer	Histologie	Progressions-grad	Lymph- knoten- Status	Kultur- Medium	FBS (%)	CO ₂ (%)
184A1 (N1)	CRL- 8798	Normales epitheliales Brustdrüsengewebe, chemisch immortalisiert	Nicht maligne	n.a.	MEGM + Transferrin + Choleratox in	0	5
184B5 (N2)	CRL- 8799	Normales epitheliales Brustdrüsengewebe, chemisch immortalisiert	Nicht maligne	n.a.	MEGM + Choleratox in	0	5
HCC1395 (T1)	CRL- 2324	Duktales Mammakarzinom	TNM Stadium I, Grad 3	LK negativ	RPMI- 1640	10	5
HCC1954 (T2)	CRL- 2338	Duktales Mammakarzinom	TNM Stadium IIA, Grad 3	LK negativ		10	5
HCC1143 (T3)	CRL- 2321	Duktales Mammakarzinom	TNM Stadium IIA, Grad 3	LK negativ		10	5
HCC2157 (T4)	CRL- 2340	Duktales Mammakarzinom	TNM Stadium IIIA, Grad 2	LK positiv (1/9)	ACL-4	10	5
HCC70 (T5)	CRL- 2315	Duktales Mammakarzinom	TNM Stadium IIIA, Grad 3	LK positiv (4/17)	RPMI- 1640	10	5
HCC202 (T6)	CRL- 2316	Duktales Mammakarzinom	TNM Stadium IIIA, Grad 3	LK positiv (4/19)		10	5
MDA-MB-468 (M1)	HTB-132	Metastasiertes Adenokarzinom der Brust	n.v.	n.v.	DMEM:F1 2	10	5
T-47D (M2)	HTB-133	Duktales Mammakarzinom, Metastase der Pleura	n.v.	n.v.	RPMI- 1640 + Insulin	10	5
MDA-MB-175- VII (M3)	HTB-25	Duktales Mammakarzinom, Metastase der Pleura	n.v.	n.v.	DMEM High Glc	10	5

3. MATERIAL UND METHODEN

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zellgruppierung

Für die vorliegende Studie wurden elf kommerzielle Zelllinien (zwei nicht-maligne Mammazelllinien, sechs Mammakarzinom-Zelllinien ohne und drei Mammakarzinom-Zelllinien mit Fernmetastasen) des Anbieters ATCC verwendet (**Tabelle 3**). Es lagen Angaben zu Histologie, Progressionsgrad und Invasivität des Tumors, aus dem die Zelllinien gewonnen wurden, vor. Gemäß dieser Merkmale und der TNM-Klassifikation (**Tabelle A1**) wurden die Zelllinien in vier Gruppen eingeteilt und die Herstellernamen der Übersichtlichkeit halber in Buchstaben-Zahlen-Kombinationen umbenannt (**Tabelle 4**). Beispielhaft sind in **Abbildung 2** die klassischen Wachstumsphänotypen jeweils einer nicht-malignen Mammazelllinie, einer Mammakarzinom-Zelllinie ohne und einer Mammakarzinom-Zelllinie mit Fernmetastasen dargestellt.

Tabelle 4: Einteilung der Zelllinien nach Progressionsgrad und TNM-Klassifikation

Gruppe	Interner Kurz-Name der Zelllinie	Progressionsgrad	Invasivität	TNM-Stadium
A	N1, N2	Normalzelllinie		
B	T1, T2, T3	Karzinomzelllinie	ohne Lymphknoten-Metastasen	I und IIA
C	T4, T5, T6	Karzinomzelllinie	mit Lymphknoten-Metastasen	IIIA
D	M1, M2, M3	Karzinomzelllinie	mit Fern-Metastasen	IV

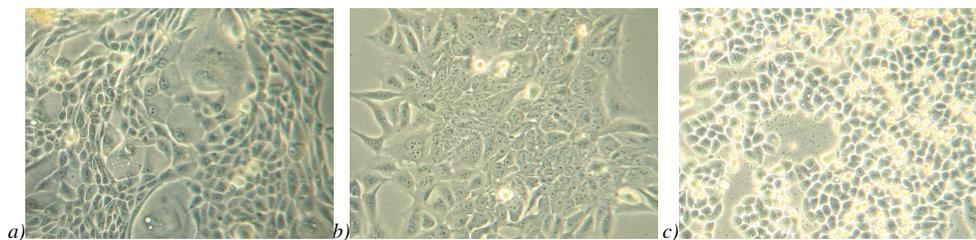


Abbildung 2: Exemplarische Fotos des Wachstumsphänotyps von drei der elf verwendeten Zelllinien

a) Normal N1, b) Karzinomzelllinie T3 und c) Karzinomzelllinie mit Fern-Metastase M1.

Vergrößerung 40fach

3. MATERIAL UND METHODEN

3.2.1.2 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Raumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten und steril-filtrierten Kulturmedien (Porendurchmesser der Filter 0,2 µm). Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen in den kulturspezifischen Medien bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert. Dreimal wöchentlich wurden die Zellkulturmedien erneuert. Die Zellen wurden regelmäßig phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert und mittels Digitalkamera photodokumentiert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen subkultiviert.

3.2.1.3 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Zur Subkultivierung von adhärenenten Zelllinien (N1, N2, T1, T2, T3, T5, T6, M1, M2, M3) wurde das verbrauchte Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen kurz mit Trypsin/EDTA benetzt. Dieses wurde rasch wieder abgesogen und erneut Trypsin/EDTA auf dem Zellrasen verteilt. Nach einer 3-5 minütigen Inkubation bei 37°C wurde am Phasenkontrastmikroskop der Ablösevorgang kontrolliert und gegebenenfalls die restlichen Zellen durch leichtes Klopfen an der Kulturschale („shake off“) oder schonend mit einem Schaber vom Flaschenboden abgelöst. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von 150 µL Trypsin-Neutralisierungslösung pro cm² inhibiert, die Zellen für einen Waschschrift in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min. bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frisches Kulturmedium resuspendiert und je nach Zelllinie im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 auf die neuen Kulturflaschen verteilt.

3.2.1.4 Kultivierung von Zelllinien in Suspension

Bei der Suspensionskultur HCC2157 (T4) wurde das gesamte Medium in Falkon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min. bei 200 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in PBS gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren im Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 in neue Kulturflaschen ausgesät.

3.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Für eine spätere Reaktivierung der Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen Aliquots in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Gefrierkonserven der Zellen wurden in einer

3. MATERIAL UND METHODEN

frühen Passagezahl angelegt und nachfolgend in gleichmäßigen Abständen auf die späteren Passagen ausgedehnt.

Zur Herstellung von Kryokonserven wurden die Zellen vom Flaschenboden wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben abgelöst. Das nach Zentrifugation und Dekantierung gewonnene Zellpellet wurde in einer auf die Zelldichte abgestimmte Menge Zellmedium überführt und auf 4°C heruntergekühlt. Um bei dem Einfrierungsvorgang eine Kristallbildung in den Zellen zu verhindern, wurde als kryoprotektive Substanz (Vitrifikationsflüssigkeit) Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, das dem auf 4°C gekühlten Einfriermedium in einem Anteil von 10% zugegeben wurde. Nach Zusatz von DMSO wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Zellsuspension 4°C nicht überschreitet, da sich sonst die zytotoxischen Eigenschaften des DMSO entfalten. Der Abkühlvorgang erfolgte mit einer Temperaturabsenkung um etwa 1°C/min, um eine möglichst rasche Ableitung der bei der Einfrierung entstehenden Wärme zu gewährleisten und eine Kristallbildung zu vermeiden. Die so gefüllten Kryoampullen wurden für 24 h kontrolliert auf -80 °C herunter gekühlt und anschließend zur Lagerung in Stickstoff bei -196°C überführt.

3.2.2 DNS-Bild-Zytometrie

3.2.2.1 Feulgen-Färbung

Die verwendete Färbung entspricht einer Modifikation der 1924 von Feulgen und Rossenbeck beschriebenen Technik. Die Feulgen-Färbung erlaubt eine isolierte Anfärbung der Desoxyribonucleinsäuren (DNS), was über die Messung der Farbstoffintensität die Bestimmung der Ploidie der Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien ermöglicht. Bei einer milden Säurebehandlung werden durch eine saure Hydrolyse selektiv die Purinbasen partiell abgespalten, sodass sich apurinische Säuren mit einer freien Aldehydgruppe bilden. Mit dieser reagiert das Schiff's-Reagenz. Hierbei wird das hydrophobe, farblose Fuchsin in die DNS interkaliert und die neue elektrische Umgebung des Fuchsin führt zur Ausbildung einer rotviolettten Farbe (*Charge Transfer*). Diese kovalente Bindung ist irreversibel. Da RNA und Proteine mit dem Schiff's Reagenz nicht reagieren, ist eine Entfernung dieser Bestandteile nicht nötig.

Zur Herstellung von Zytospins wurden Zellen der einzelnen Zelllinien in der Zytospin Zentrifuge für 5 min. bei 700 rpm auf einem klar definierten Bereich eines Objektträgers aufgebracht. Die luftgetrockneten Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur in

3. MATERIAL UND METHODEN

4% Formaldehyd fixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate vorsichtig in Leitungswasser gespült und dann für 60 min. bei Raumtemperatur in 5M Salzsäure hydrolysiert. Nach Spülen in Aqua dest. wurden die Präparate für 120 min. bei Raumtemperatur im abgedunkelten Schiff's Reagenz inkubiert und im Anschluss erneut einem Spülvorgang in Aqua dest. unterzogen. Im Anschluss wurden sie 3 x 10 min. in Sulfidlösung gewaschen und unter fließendem Leitungswasser gespült. Den Abschluss bildete die Dehydration in ansteigender Alkoholreihe, ein Xylolbad und die Eindeckung mit Entellan.

3.2.2.2 DNS-Zytometrischer Messvorgang

Die fixierten, nach Feulgen gefärbten Präparate wurden mit einem Bildanalysesystem ausgewertet. Mittels einer interaktiven Bildanalyse wurde das über ein Zeiss Axioplan Mikroskop (Plan Objektiv 40:1) und eine Video-CCD Kamera erzeugte Bild auf einem Rechner digitalisiert und auf dem Bildschirm zur Auswertung in der Software AHRENS ICM (*Ahrens Messtechnische Beratung, Bargteheide*) dargestellt.

Pro Präparat wurden nach dem Zufallsprinzip ca. 500 Tumorzellen gemessen. Pyknische Kerne und in Mitose befindliche Zellen wurden bei der Messung nicht berücksichtigt. Als interner Standard dienten ca. 30 ausgewählte lymphatische Zellen, gewonnen aus einem Tonsillenabstrich. Diese wurden auf einem separaten Objektträger aufgebracht und derselben Fixation und Färbung wie die auszuwertenden Zellen unterzogen. Ihr Medianwert wurde als diploider Referenzwert oder „2c-Wert“ festgelegt. Die Ergebnisse der DNS-Zytometrischen Messungen wurden in zwei zueinander korrespondierenden Histogrammen dargestellt.

3.2.2.3 Interpretation der DNS-Histogramme

3.2.2.3.1 Interpretation der DNS-Histogramme nach Auer

Die Ploidie jeder der elf Mammazelllinien wurde in einem Histogramm zur Darstellung gebracht. Die quantitative Auswertung der Histogramme wurde in Anlehnung an die Klassifikation von Auer et al. 1980 durchgeführt. Nach dieser können vier prognostisch relevante Ploidie-Typen (I-IV) unterschieden werden (**Abbildung 3**):

Typ I-Histogramme weisen einen einzigen Gipfel im diploiden Bereich (1,5c – 2,5c) auf, wobei definitionsgemäß weniger als 10% der Zellen einen DNS-Wert über 2,5c haben.

3. MATERIAL UND METHODEN

Histogramme, die dem **Typ II** zugeordnet werden, zeigen eine Säule in der tetraploiden Region (3,5c – 4,5c) (1. Variante) oder zwei klar abgrenzbare Spitzen bei 2c und 4c (2. Variante). Die Anzahl der Zellen zwischen diesen beiden Säulen bzw. oberhalb der tetraploiden Region liegt dabei unter 10%. Sie entsprechen den Zellen in der Synthesephase. Histogramme vom **Typ III** sind durch DNS-Werte charakterisiert, die sich zwischen dem diploiden und tetraploiden Bereich befinden. Sie grenzen sich von Typ II dadurch ab, dass nur bei einem kleinen Anteil der Zellen (<5%) die DNS-Werte über 4c liegen. Die Histogramme der Typen I, II und III entsprechen alle einer Verteilung im diploiden/tetraploiden Bereich und werden deshalb als euploid zusammengefasst. Den euploiden Histogrammen steht das aneuploide entgegen, welches durch den **Typ IV** vertreten wird. Aneuploide DNS-Histogramme zeichnen sich durch die sog. "Manhattan Skyline" aus. Dieses Histogramm-Bild entsteht durch Zellen mit unterschiedlicher Ploidie, die nebeneinander mit zahlreichen DNS-Werten oberhalb der tetraploiden Region (> 5%) angeordnet sind.

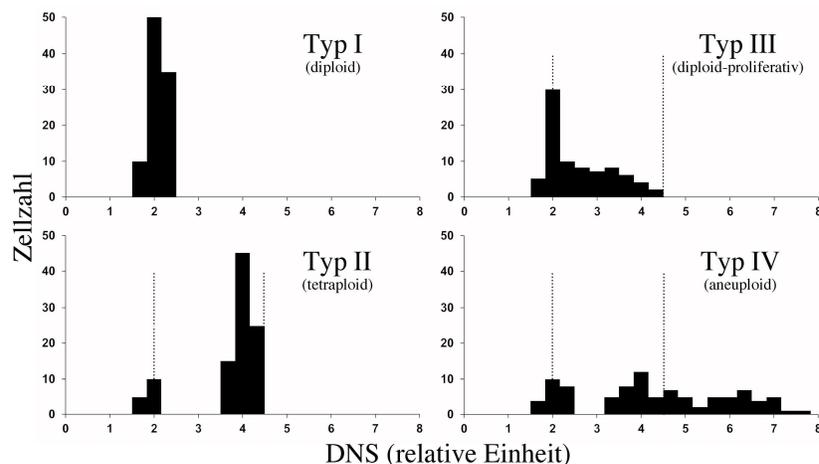


Abbildung 3: Die vier DNS-zytometrischen Histogramme nach Auer (1980) ^[7]

3.2.2.3.2 Berechnung des stemline scatter index (SSI)

Der Stammlinien Verteilungs-Index (*stemline scatter index*, SSI) repräsentiert die genomische Instabilität einer Zelllinie. Er ist definiert als die Summe aus den Prozentwerten der S-Phase, *5c exceeding rate* (5cER) und dem Variationskoeffizienten der Zelllinie. In Anlehnung an Kronenwett et al. [106] können durch den SSI als objektiven Messwert

3. MATERIAL UND METHODEN

diploide und tetraploide Tumore in klinisch niedrigmaligne und hochmaligne Unterformen unterteilt werden. Bei einem SSI-Grenzwert von 8,8% ($P = 0,03$) können nicht-signifikante Instabilitätswerte der DNS-Histogramme ($SSI < 8,8\%$) von denjenigen mit signifikanter Instabilität ($SSI > 8,8\%$), also stabile aneuploide von instabilen aneuploiden Zelllinien, getrennt werden (**Abbildung A1**).

$$SSI = S\text{-Phase} + 5cER + CV$$

<i>SSI</i>	=	<i>stemline scatter index</i> , als Maß der genomischen Instabilität
<i>S-Phase</i>	=	Prozentsatz der Zellen, deren DNS-Werte sich in der Region der Synthesephase befinden
<i>5cER</i>	=	<i>5c exceeding rate</i> , der Prozentsatz der Zellen, deren DNS-Werte zweimal den Modalwert plus 1c überschreiten
<i>CV</i>	=	Variationskoeffizienten der betreffenden Tumorstammlinie

3.2.3 Durchfluss-Zytometrie

3.2.3.1 Durchfluss-Zytometrischer Messvorgang

Mittels der Durchflusszytometrie lässt sich eine simultane Messung multipler physikalisch-morphologischer und molekular-biologischer Eigenschaften auf Einzelzell-Ebene durchführen.

Hierzu werden lebende Zellen in einer Lösung suspendiert und im Durchflusszytometer hydrodynamisch fokussiert, sodass eine perlenschnurartige Anordnung von Einzelzellen entsteht, die einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl passieren. Sobald eine Einzelzelle durch den Fokus des Lasers tritt, werden die physikalischen Messgrößen der Lichtstreuung der Zelle in einem engen Winkel zum Laserstrahl als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter, FSC*) und in einem Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (*side scatter, SSC*) detektiert (**Abbildung 4**). Dabei wird das FSC-Signal proportional zur Zellgröße gestreut und zusätzlich von der Oberflächenbeschaffenheit der Zelle beeinflusst. Das SSC-Signal hingegen lässt Rückschlüsse auf die intrazelluläre Beschaffenheit, Granularität und Komplexität zu. Neben den physikalischen und morphologischen können auch molekulare und phänotypische Eigenschaften der Zelle durch die Anwendung eines 488nm-Argon-Lasers bestimmt werden. Durch den Laser werden die direkt in oder an die Zelle konjugierten Fluorochrome angeregt, Lichtenergie absorbiert und Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Die Lichtenergie wird durch Photonen-Emission unter

3. MATERIAL UND METHODEN

Abgabe von Fluoreszenzlicht frei, welches eine längere Wellenlänge als das zuvor absorbierte Licht aufweist (*Stokes-Shift*) und proportional zur Menge des Fluorochroms ist. Dieses Fluoreszenzsignal wird wie das SSC-Signal in einem Winkel von 90° erfasst und durch Farbteilerspigel und Bandpassfilter optisch nach Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe aufgetrennt. Weiter detektieren sog. Photomultiplier die Lichtsignale und wandeln sie in elektrische Signale um, die als digitaler Datensatz gespeichert und analysiert werden können. Häufig und auch in dieser Arbeit wird die Durchflusszytometrie synonym mit dem Ausdruck FACS (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) verwendet. Hierbei gilt es zu beachten, dass das eigentliche Sortieren der Zellen, das sich im Namen der Methode FACS verbirgt, nicht von klassischen Durchflusszytometern sondern meist nur von *Highspeed-Cell-Sortern* möglich ist.

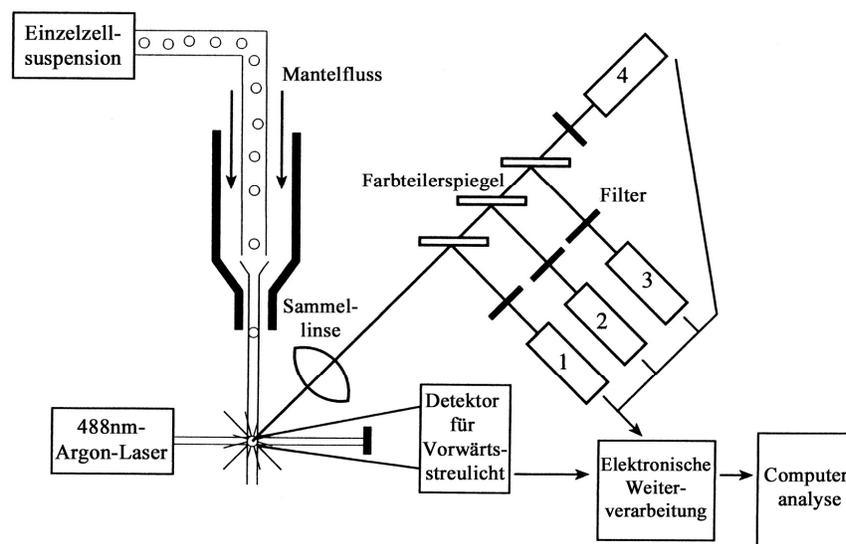


Abbildung 4: Darstellung eines durchflusszytometrischen Messvorgangs

Die gefärbte Einzelzellsuspension gelangt mittels Mantelstrom in die Flusskammer und wird hydrodynamisch fokussiert. Die Einzelzellen passieren einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl, wodurch die Fluorochrome angeregt werden. Detektiert werden das Vorwärts- (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC) (1) sowie das Fluoreszenzlicht (2-4). Das Fluoreszenzlicht wird durch Farbteilerspigel und Bandpassfilter optisch nach Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe getrennt, von Photomultipliern detektiert, in elektrische Signale überführt und als digitaler Datensatz gespeichert.

Abbildung modifiziert nach Brown and Wittwer (2000) [27]

3. MATERIAL UND METHODEN

3.2.3.2 Antikörperauswahl

Antikörper (auch Immunglobuline genannt) sind Teil des immunologischen Systems und werden bei Anwesenheit einer fremden Substanz, einem so genannten Antigen, normalerweise vom Organismus produziert, um diesen vor Infektionen zu schützen. Dabei ist der zur Synthese gebrachte Antikörper spezifisch und von hoher Affinität für das entsprechende Antigen, das zur Gruppe der Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren gehören kann. Das Immunglobulin besteht aus vier schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die leichten und schweren Ketten fügen sich zu der so genannten F_{ab} (*antigen-binding fragment*, auf Deutsch: Antigenbindendes Fragment)-Domäne zusammen, die über flexible Verknüpfungen mit der F_c (*crystallisable fragment*, auf Deutsch: kristallisierbares Fragment)-Domäne verbunden sind. Am Ende der F_{ab} -Domäne erfolgt die Antigenbindung. Auf großen Molekülen erkennt ein Antikörper spezielle Gruppen oder eine Gruppierung von Aminosäuren, die Antigen-Domäne oder das Epitop.

Werden Oberflächen-Zellantigene mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, absorbieren die Fluorochrome das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht in spezifischen Wellenlängen. Die Fluoreszenzintensität spiegelt dabei proportional die Anzahl der markierten Bindungsstellen auf der Zelloberfläche wider, sodass die Stärke des Fluoreszenzsignals als quantitatives Maß für die detektierten Oberflächenmoleküle dient.

Als Fluoreszenzkonjugationen zur Antikörpermarkierung wurden die Standardfluoreszenzfarben FITC (Fluoreszeinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin) und APC (Allophycocyanid) verwendet. Die eingesetzten Fluorochrome weisen dabei die gleiche Anregungswellenlänge (488nm-Argon-Laser), jedoch andere Emissionsspektren (FITC bei 519nm, PE bei 578nm, APC bei 660nm) auf.

Die ausgewählten Antikörper sind gegen Oberflächenmoleküle von Tumorstammzellen gerichtet (**Tabelle 1**). Die Antikörper anti-CD24, anti-CD29 und anti-CD49f sind weitestgehend Mammakarzinom-spezifisch, während die Antikörper anti-CD133, anti-CD326 und anti-CD44 Tumorentitäten übergreifend sind.

Da es in Abhängigkeit von Zelltyp und Färbeprotokoll zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers kommen kann, werden diese falsch positiven Signale mit Hilfe einer parallel-analysierten Isotypenkontrolle herausgefiltert. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper des gleichen Subtyps wie der spezifische Antikörper. Er ist jedoch gegen ein Antigen

3. MATERIAL UND METHODEN

gerichtet, dass bei Säugern gewöhnlich nicht vorkommt. Bei der Auswertung wird die Isotypenkontrolle als „Leerwert“ von den anderen Proben abgezogen.

3.2.3.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Zellkulturen und Fluoreszenzlabeling

Für die Vorbereitung der Zellen auf die Durchflusszytometrie wurden die Zellen wie zur Subkultivierung beschrieben aus der Zellkulturflasche gelöst und in eiskaltes PBS mit 0,5% (w/v) BSA geerntet. Die Zellsuspension wurde bei 200 x g für 5min. bei 4°C pelletiert, der Überstand dekantiert, das Pellet resuspendiert und bei selber Einstellung erneut zentrifugiert. Zur Vermeidung von Zellklümpchen wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb gefiltert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 13 mL PBS gelöst und zu 1 mL auf 13 Eppendorfgefäße verteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 80 µL FACS-Pufferlösung resuspendiert und die sechs Antikörper (**Tabelle 1**) sowie die entsprechenden Isotypkontrollen (**Tabelle 2**) unter Lichtabschluss in spezifischen Konzentrationen in Einzelfärbungen den vorbereiteten Zellsuspensionen zugegeben. Die Negativkontrolle erhielt keinen Zusatz von Antikörpern. Nach 15 min. Inkubationszeit bei 4°C wurden diese in PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach Dekantation des Überstandes und Resuspension des Pellets in 1 mL Pufferlösung wurden die Zellen innerhalb von max. 1 Std. der Analyse am FACS-Gerät *FC500* unterzogen. Bis zur Messung wurden die Proben im Dunkeln auf Eis gelagert. Bei jedem Messvorgang wurden pro Einzelfärbung 5.000-10.000 Zellen für jede Zelllinie erfasst. Es erfolgten sowohl mind. vier technische als drei biologische Messwiederholungen pro Zelllinie, d.h. die Zelllinien wurden in verschiedenen Passagezahlen gemessen, um ein konstantes Ergebnis über die gesamte Kultivierung zu erhalten.

3.2.3.4 Interpretation der Durchfluss-Zytometrischen-Daten

Die Lichtimpulse werden in elektrische Impulse und schließlich in Eingangsnummern konvertiert. Die zytometrischen Daten werden in einem Standardformat (FCS) gespeichert, welches die Messdaten-Informationen über die gemessene Probe, das Messgerät, den Datensatz und die Ergebnisse der Datenanalyse beinhaltet.

Jede einzelne Zelle wird nach fünf Parametern (FCS, SSC, FITC, PE und APC) analysiert. Der erstellte Datensatz kann in verschiedenen Formaten dargestellt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

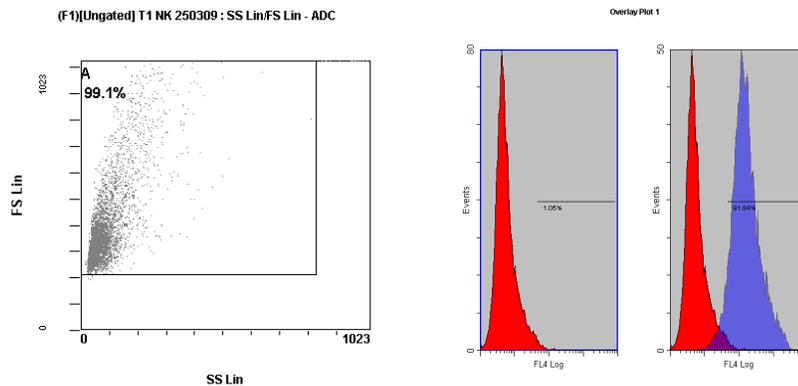


Abbildung 5: Exemplarisches durchflusszytometrisches Histogramm der Mammakarzinom-Zelllinie T1

Links: Dargestellt sind Vorwärts- (FS) und Seitwärtsstreulicht (SS), welche die physikalischen und morphologischen Zelleigenschaften wie Zellgröße und -granularität widerspiegeln.

Rechts: Fluoreszenzlabeling der Zelllinie mit einem APC-konjugierten CD29-Antikörper (blau) sowie der entsprechenden Isotypenkontrolle (rot).

Die Auswertung wurde mit dem Programm CXP vorgenommen. Für die Einparameterdarstellung wird auf der X-Achse die Intensität der Zellfluoreszenz und auf der Y-Achse die Anzahl positiver Zellen aufgetragen. Bei der korrelierten Zweiparameterdarstellung können neben der Korrelation von FSC mit SCC auch Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen untereinander oder mit Streulichteigenschaften korreliert werden. Zur Ermittlung der Marker-positiven Subpopulation werden durch sogenanntes „Gating“ Zelltrümmer sowie mit Hilfe der Isotypenkontrolle unspezifische Bindungen mit einem Cut off bei 1% ausgeschlossen (**Abbildung 5**).

3.2.4 Analyse von Netzwerken und Signalwegen

Zur Analyse von Assoziationen der Tumorzellmarker untereinander und mit verschiedenen Signalwegen und Netzwerken wurde die Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software (www.ingenuity.com, Version 9.0 – 3211) verwendet. Diese bezieht ihre Daten von einer umfangreichen, manuell fortlaufend gepflegten Datenbank, der *Ingenuity Pathways Knowledge Base* (IPKB). Auf Grundlage verschiedener Algorithmen werden Beziehungen, Mechanismen, Funktionen und Interaktionen innerhalb eines analysierten Datensets identifiziert, um so eine vertiefende Interpretation von Untersuchungsergebnissen zu ermöglichen. Die von IPA generierten Netzwerke werden mittels eines Scores eingestuft,

3. MATERIAL UND METHODEN

der durch den negativen Logarithmus des P-Werts berechnet wird. Hierüber wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der die Fokusproteine durch Zufall zusammen in einem bekannten Netzwerk vorkommen. Ein Score > 5 wurde als statistisch signifikantes Netzwerk angesehen.

3.2.5 Statistische Evaluationsmethoden

Die statistische Daten-Analyse zur durchflusszytometrischen Phänotypisierung wurde mit der Statistiksoftware SPSS (Statistical Package for Social Sciences), Version 19 (IBM., Chicago) und mit Excel für Windows (Microsoft Office Suite), Version 2010, durchgeführt. Um Expressionsprofile von Tumorstammzellmarkern in Mammazelllinien zu detektieren, wurden pro Zelllinie und Tumorstammzellmarker vier biologische Wiederholungen der durchflusszytometrischen Messung in vier verschiedenen Zellpassagen durchgeführt. Folgend wurden hieraus der Mittelwert \pm Standardabweichung kalkuliert, um den prozentualen Anteil Marker-positiver Zellpopulationen jeder Zelllinie zu erhalten.

Assoziationen zwischen Markerexpression und klinischen Parametern wie Progressionsgrad (Normal-Tumor-Metastase), UICC-, TNM-Status und Grading, wurden durch die Anwendung des Chi χ^2 und des Fisher's Exact Tests analysiert. Signifikante Expressionsunterschiede verschiedener Studiengruppen bzw. Assoziationen zwischen Markerexpression und Alter wurden mittels nicht-parametrischer Tests detektiert (Mann-Whitney-U-Test für 2 ungepaarte Gruppen und Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei ungepaarte Gruppen, beide nicht normalverteilt). Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ angesehen.

4. ERGEBNISSE

Die Grundlage dieser Arbeit bildete eine Auswahl kommerziell erhältlicher Zelllinien, die anhand der klinischen Daten der Donorpatientinnen in vier Gruppen eingeteilt wurden: A = Normalgewebe; B = Karzinomzelllinien ohne Lymphknotenbefall, TNM-Stadium I und IIA; C = Karzinomzelllinien mit Lymphknotenbefall, TNM-Stadium IIIA; D = Karzinomzelllinien mit Fernmetastasen, TNM-Stadium IV (**Tabelle 3**).

4.1 DNS-Bild-Zytometrie

Von den elf humanen Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien wurden Zytospins verschiedener Zellpassagen angefertigt. Nach Anfärbung der DNS mittels Feulgen-Färbung wie in 3.2.2.1 beschrieben, wurde die Ploidie mittels statischer Bildzytometrie ermittelt.

4.1.1 Nicht-maligne Mammazelllinien

Die Normalzelllinien N1 und N2 zeigen klare Gipfel im diploiden Bereich, der sich mit dem hellblauen Peak der gemessenen Referenzzellen direkt überlagert. Auch im tetraploiden Bereich ist eine klare Spitze abgrenzbar, die proliferierende Zellen repräsentiert (**Abbildung 6**). Es handelt sich bei beiden Zelllinien um Histogramme vom Typ III nach der Auer-Klassifikation, die sich durch eine euploide Stammlinie auszeichnen.

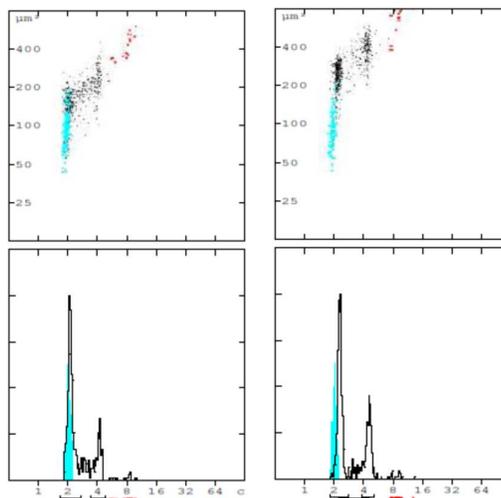


Abbildung 6: Grafische Darstellung der DNS-Zytometrischen Messung der Normalzelllinien N1 (links) und N2 (rechts).

Türkis-blau sind die Referenzzellen mit einem Peak bei 2c (unten) und einer gleichmäßigen Größenverteilung entsprechend der Messpopulation (oben) dargestellt. In schwarz sind die analysierten Zellen der Normal-

4. ERGEBNISSE

Zelllinien dargestellt. Beide Zelllinien zeigen ein euploides Ploidie-Muster (Typ III nach der Auer-Klassifikation).

4.1.2 Maligne Mammazelllinien

Trotz unterschiedlicher Tumor- und Progressionsstadien der Karzinomzelllinien T1-T6 und der Metastasenzelllinien M1-3 lassen sich Ähnlichkeiten in der Histogramm-Morphologie der verschiedenen Karzinomzelllinien erkennen, sodass diese hier gesammelt betrachtet werden.

Die Zelllinien T1, T6, M1 und M2 zeigen alle ein ähnliches Verteilungsmuster mit zwei Stammlinien bei 3c und 6c.

Die Histogramme der Zelllinien T2, T3, T5 und M3 haben jeweils zwei Stammlinien 4c und 8c. Zwischen diesen beiden Stammlinien finden sich bei allen Zelllinien nur wenige Zellen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt. Zellen im diploiden Bereich lassen sich entweder gar nicht oder nur sehr unterrepräsentiert finden.

Die Zelllinie T4 zeigt ein Histogramm mit einer breiten Stammlinie im tetraploiden Bereich (4c), die von weiteren Zellen unterschiedlichen DNA-Gehalts meist über 4c gesäumt wird (**Abbildungen 7 – 9**). Alle diese Histogramme entsprechen dem Typ IV der Auer-Klassifikation und werden somit als aneuploid gewertet.

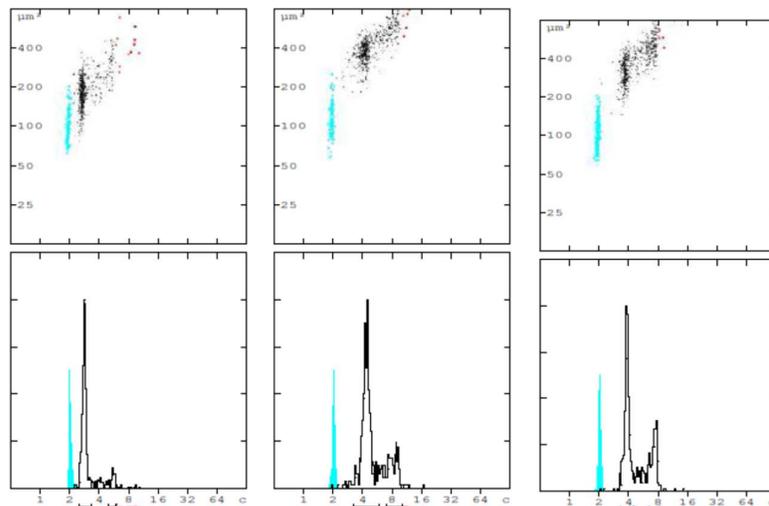


Abbildung 7: Grafische Darstellung der DNS-zytometrischen Messung der Tumorzelllinien T1 (links), T2 (Mitte) und T3 (rechts), die ein frühes Tumorstadium ohne regionäre Metastasierung repräsentieren.

Türkis-blau sind die Referenzzellen mit einem Peak bei 2c (unten) und einer gleichmäßigen Größenverteilung entsprechend der Analysepopulation (oben) dargestellt. In schwarz sind die analysierten Zellen der malignen

4. ERGEBNISSE

Zelllinien dargestellt. Alle Zelllinien weisen einen aneuploiden Ploidie-Status auf (Typ IV nach der Auer-Klassifikation).

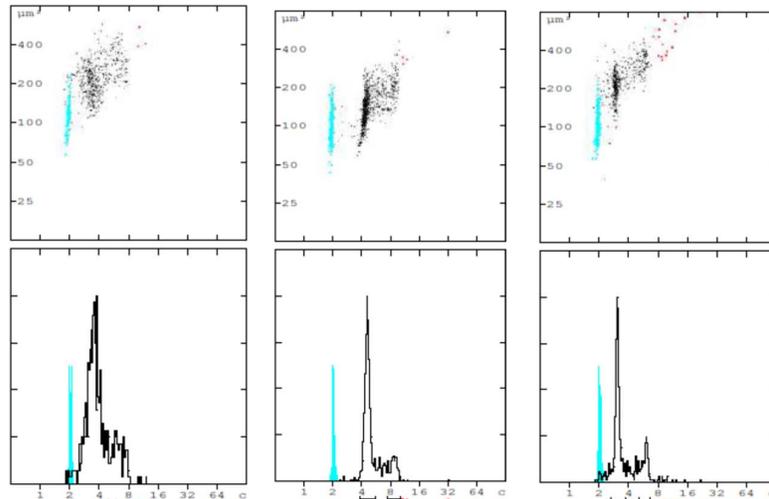


Abbildung 8: Grafische Darstellung der DNS-zytometrischen Messung der Tumorzelllinien T4 (links), T5 (Mitte) und T6 (rechts), die ein spätes Tumorstadium mit regionärer Lymphknotenmetastasierung repräsentieren.

Türkis-blau sind die Referenzzellen mit einem Peak bei 2c (unten) und einer gleichmäßigen Größenverteilung entsprechend der Analysepopulation (oben) dargestellt. In schwarz sind die analysierten Zellen der malignen Zelllinien dargestellt. Alle Zelllinien zeigen einen aneuploiden Ploidie-Status (Typ IV nach der Auer-Klassifikation).

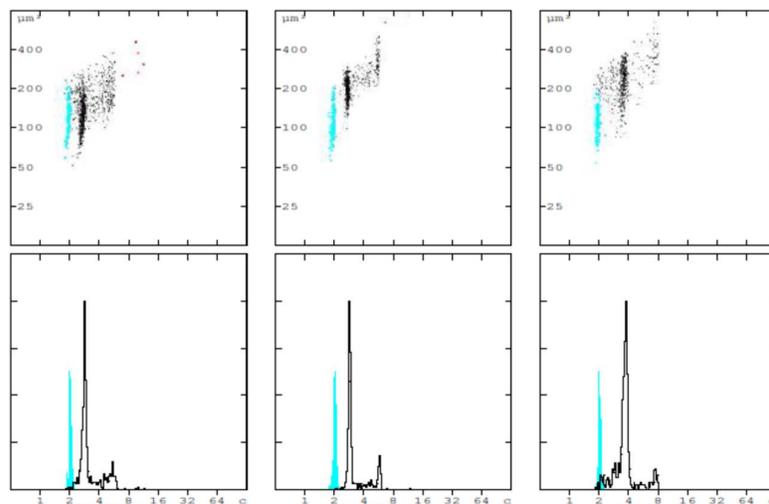


Abbildung 9: Grafische Darstellung der DNS-zytometrischen Messung der Metastasenzelllinien M1 (links), M2 (Mitte) und M3 (rechts),

4. ERGEBNISSE

Türkis-blau sind die Referenzzellen mit einem Peak bei 2c (unten) und einer gleichmäßigen Größenverteilung entsprechend der Analysepopulation (oben) dargestellt. In schwarz sind die analysierten Zellen der malignen Zelllinien dargestellt. Alle Stammlinien zeigen einen aneuploiden Ploidie-Status (Typ IV nach der Auer-Klassifikation).

4.1.3 Ploidieklassifikation und genomische Instabilität

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der DNS-zytometrischen Messungen. Der Stammlinien Verteilungs-Index (*stemline scatter index*, SSI) ist definiert als die Summe aus den Prozentwerten der S-Phase, *5c exceeding rate* (5cER) und dem Variationskoeffizienten der Zelllinie. Er ist ein Maß für die genomische Instabilität der analysierten Zellpopulation, welche bei einem SSI-Wert über 8,8% als genomisch instabil angenommen wird (**Abbildung A1**). Der SSI-Wert weist bei allen Zelllinien auf eine genomische Instabilität hin. Bis auf die aus normalem Drüsengewebe isolierten Zelllinien N1 und N2 weisen die Histogramme aller anderen Zelllinien auf einen aneuploiden Ploidie-Status hin.

Tabelle 5: Ergebnisse der DNS-zytometrischen Messung und Übersicht über die Ploidieklassifizierung der Normal- und Mammakarzinom-Zelllinien

Legende: SSI = *stemline scatter index* = Summe aus den Prozentwerten der S-Phase, *5c exceeding rate* (5cER) und dem Variationskoeffizient der Zelllinie, Genomische Instabilität bei SSI > 8,8 [%], Auer-Klassifikation siehe Kapitel 3.2.2.3.1

Zelllinien		SSI	Genomische		
Name	Stammlinie (c)		Instabilität bei SSI > 8,8%	Auer-Klassifikation	Ploidie-Status
N1	2,08	28.6	instabil	III	Euploid
N2	2,24	18.8	instabil	III	Euploid
T1	2,78	9.9	instabil	IV	Aneuploid
T2	4,27	30.5	instabil	IV	Aneuploid
T3	3,77	16.8	instabil	IV	Aneuploid
T4	3,51	26.4	instabil	IV	Aneuploid
T5	4,49	18.4	instabil	IV	Aneuploid
T6	3,04	20.8	instabil	IV	Aneuploid
M1	2,79	16.1	instabil	IV	Aneuploid
M2	2,81	11	instabil	IV	Aneuploid
M3	3,68	13.8	instabil	IV	Aneuploid

4. ERGEBNISSE

4.2 Tumorstammzellmarker-Expression

Mittels Durchflusszytometrie wurden elf humane Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression mittels Mammakarzinom-spezifischer (CD24, CD29, CD49f) und Tumorentitäten übergreifender Marker (CD133, CD326, CD44) phänotypisiert (**Tabelle 1**).

Pro Zelllinie wurden drei biologische Wiederholungen durchgeführt, um die Marker-Expression in verschiedenen Passagen zu analysieren und Variabilität zu minimieren. Die gemessenen Expressionen wurden als Mittelwert (absolute Zahl in Prozent) angegeben und zusätzlich semi-quantitativ nach einem Scoring (0 = ≤ 1%; + = 2-30%; ++ = 31-70%; +++ = 71-100%) eingeteilt. Die Expressionsprofile der Zelllinien und verschiedenen Tumorstammzellmarker sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6: Darstellung der Expressionsprofile der Tumorstammzellmarker in Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien

Legende für das angewandte Scoring: 0= ≤ 1%; += 2-30%; ++=31-70%; +++=71-100%. Die Werte sind errechnete Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten.

	CD133	CD326	CD44	CD24	CD29	CD49f
N1	1% (0)	2% (+)	4% (+)	2% (+)	88% (+++)	95% (+++)
N2	1% (0)	2% (+)	2% (+)	89% (+++)	90% (+++)	87% (+++)
T1	1% (0)	1% (0)	98% (+++)	3% (+)	93% (+++)	94% (+++)
T2	6% (+)	97% (+++)	94% (+++)	80% (+++)	98% (+++)	98% (+++)
T3	12% (+)	98% (+++)	97% (+++)	99% (+++)	99% (+++)	99% (+++)
T4	75% (+++)	41% (++)	87% (+++)	97% (+++)	35% (++)	69% (++)
T5	81% (+++)	83% (+++)	84% (+++)	53% (++)	96% (+++)	88% (+++)
T6	64% (++)	71% (+++)	82% (+++)	73% (+++)	90% (+++)	90% (++)
M1	98% (+++)	95% (+++)	94% (+++)	100% (+++)	89% (+++)	98% (+++)
M2	2% (+)	96% (+++)	20% (+)	98% (+++)	99% (+++)	99% (+++)
M3	57% (++)	35% (++)	2% (+)	91% (+++)	81% (+++)	21% (+)

In den verschiedenen Zelllinien werden fast alle Tumormarker in über 50% der Zellen exprimiert. Die Mamma-spezifischen Marker (CD24, CD29, CD49f) werden sogar bei über 75% der Zellen detektiert. Hierbei korreliert die Expression von CD29 positiv mit der Expression von CD49f ($\rho = 0,642$; $P = 0,033$). Die Tumorentitäten übergreifenden Stammzellmarker CD326 und CD44 sind hingegen bei den Normalzelllinien und frühen Tumorstadien (T1-T3) entweder gar nicht oder nur in geringem Maße ausgeprägt (< 30 %).

4. ERGEBNISSE

Die Expression von CD326 korreliert positiv mit der Expression von CD29 ($\rho = 0,659$; $P = 0,027$) und CD49f ($\rho = 0,627$; $P = 0,039$) (**Tabelle 6**).

Tabelle 7: Darstellung der Expressionsprofile der Tumorstammzellmarker im Mittel in den analysierten Zellpopulationen

Legende: Gruppe A = N1 und N2 (Normalzelllinien), Gruppe B = T1, T2, T3 (Karzinomzelllinien ohne Lymphknotenbefall, TNM-Stadium I und IIA), Gruppe C = T4, T5, T6 (Karzinomzelllinien mit Lymphknotenbefall, TNM-Stadium IIIA), Gruppe D = M1, M2, M3 (Metastasenzelllinien, TNM-Stadium IV). Dargestellt sind die errechneten Mittelwerte der denjeweiligen biologischen Gruppen angehörigen Zelllinien mit Standardabweichung.

Legende für das angewandte Scoring: 0= ≤1%; += 2-30%; ++=31-70%; +++=71-100%.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
CD133	1% (0)	6% (+)	73% (+++)	52% (++)
CD326	2% (+)	65% (++)	62% (++)	78% (+++)
CD44	3% (+)	96% (+++)	84% (+++)	39% (++)
CD24	36% (++)	61% (++)	74% (+++)	98% (+++)
CD29	82% (+++)	97% (+++)	74% (+++)	90% (+++)
CD49f	88% (+++)	97% (+++)	81% (+++)	75% (+++)

In dem Expressionsmuster der Tumorstammzellmarker lassen sich zwischen Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien verschiedener Tumorstadien Unterschiede aufzeigen. Für die Oberflächenmarker CD326 (Chi² Test, $P = 0.038$) und CD44 (Chi² Test, $P = 0.017$) lässt sich eine höhere Expression in malignen, verglichen mit benignen Zelllinien, nachweisen. Die Expression des Oberflächenmarkers CD133 korreliert mit dem UICC Status der verwendeten Zelllinien, wobei in den höheren UICC Stadien eine stärkere CD133 Expression vorliegt (Chi² Test, $P = 0.05$). Zudem trennt CD133 zwischen Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen und Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Zelllinien mit einer niedrigen CD133 Expression (U-Test, $P = 0.022$) (**Tabelle 7, Abbildung 10**).

4. ERGEBNISSE

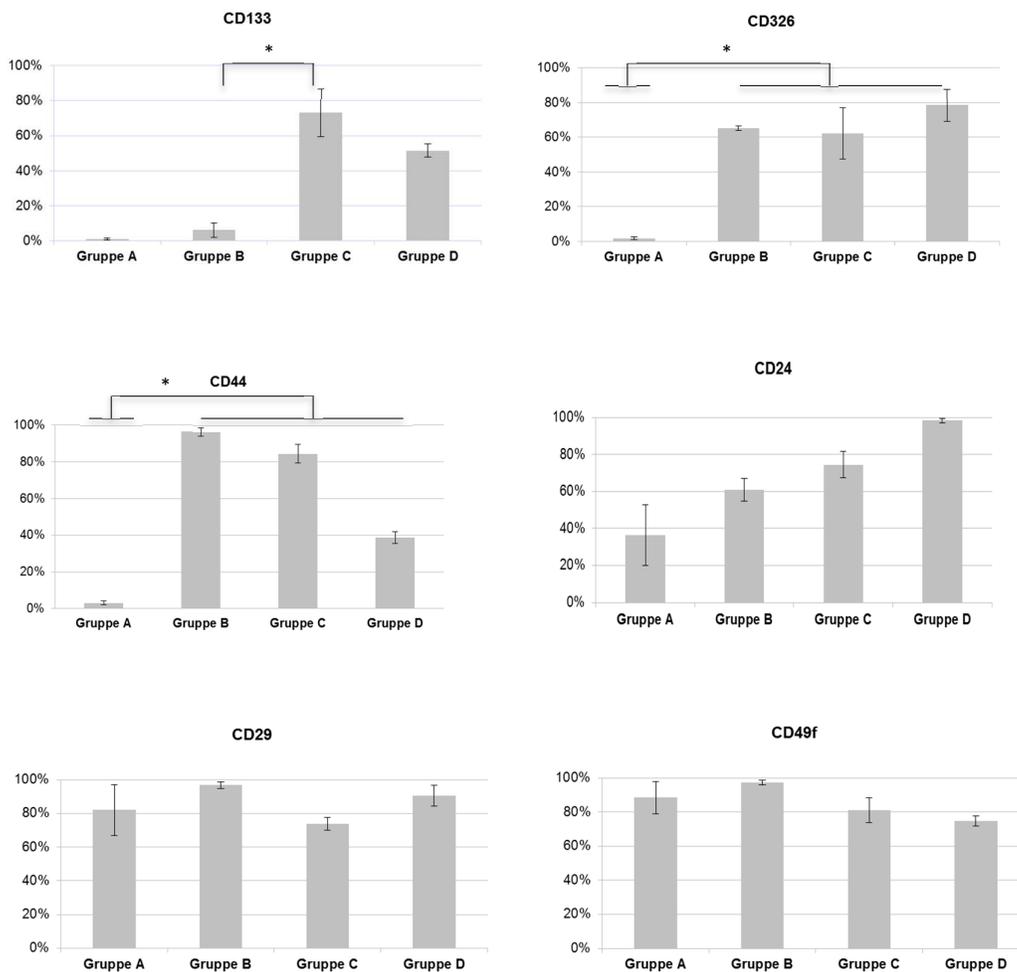


Abbildung 10: Expression der Oberflächenantigene CD133, CD326, CD44, CD24, CD29, CD49f im Mittel in den analysierten Zellpopulationen

*Legende: Gruppe A = N1 und N2 (Normalzelllinien), Gruppe B = T1, T2, T3 (Karzinomzelllinien ohne Lymphknotenbefall, TNM-Stadium I und IIA), Gruppe C = T4, T5, T6 (Karzinomzelllinien mit Lymphknotenbefall, TNM-Stadium IIIA), Gruppe D = M1, M2, M3 (Karzinomzelllinien mit Metastasierung, TNM-Stadium IV). Dargestellt sind die errechneten Mittelwerte der den jeweiligen biologischen Gruppen angehörigen Zelllinien mit Standardabweichung. * $P < 0.05$.*

4.2.1 Expression des Oberflächenantigens CD133

Die Expression von CD133 ist in den Zelllinien N1, N2, T1 und M2 nur bei einem sehr geringen Prozentsatz von Zellen (1-2%) vorhanden. Von den Zelllinien der frühen Tumorstadien (Frühkarzinome: T1-T3), über diejenigen mit stattgehabter Lymphknotenmetastasierung (Spätkarzinome: T4-T6) bis hin zu den Spätstadien mit

4. ERGEBNISSE

systemischer Beteiligung (Metastasen: M1-M3) lässt sich eine stetige Expressionszunahme mit zunehmendem Progressionsgrad beobachten: von im MW 1% CD133 positiven Zellen in Normal-Zelllinien (Gruppe A), über im MW 6% bei Frühkarzinom-Zelllinien (Gruppe B), 73% bei Spätkarzinom-Zelllinien (Gruppe C) und im MW 52% bei Metastasen-Zelllinien (Gruppe D) (**Tabelle 7, Abbildung 10**). Statistisch ist dennoch kein signifikanter Unterschied der CD133 Expression in Abhängigkeit vom Progressionsgrad (Normal vs. Früh-/Spätkarzinome vs. Metastase oder Normal vs. Früh-/Spätkarzinome oder Früh-/Spätkarzinome vs. Metastase oder A vs. B vs. C vs. D) zu detektieren. Lediglich ein Trend lässt sich erkennen: Die CD133 Expression ist zwar unterschiedlich zwischen benignen (MW = 1%, SD = 1%) und malignen Zelllinien (MW = 44%, SD = 32%), liegt jedoch knapp über der Signifikanzgrenze (P = 0.057).

Im Gegensatz dazu ist die Expression von CD133 signifikant unterschiedlich hinsichtlich des Nodal-Status der Zelllinien: Zelllinien ohne Lymphknotenmetastasierung (Frühkarzinome, Gruppe B) weisen eine durchschnittlich niedrigere CD133 Expression auf (MW = 6%, SD = 4%) als Zelllinien mit Lymphknotenmetastasierung (Spätkarzinome, Gruppe C; MW = 73%, SD = 14%; U-Test, P = 0.022).

Auch unter Einbeziehung des Scorings kann diese Beziehung gezeigt werden: Hierbei weisen Zelllinien ohne Lymphknotenmetastasierung mit 1-30% eine niedrige CD133 Expression auf (Score 1-2), während Zelllinien mit Lymphknotenmetastasierung eine CD133 Expression von 31-100% zeigen (Score 3-4) (Fishers Exact Test, P = 0.018). Zusätzlich lässt sich hier eine signifikant unterschiedliche CD133 Expression im Zusammenhang mit dem UICC Status detektieren: Hierbei weisen Zelllinien mit einem frühen UICC Status eine niedrige CD133 Expression auf (1% in UICC I, 6-12% in UICC II), während Zelllinien mit einem fortgeschrittenem UICC Status CD133 stärker exprimieren (64-81% in UICC III) (Chi² Test, P = 0.05, **Abbildung 11**).

4. ERGEBNISSE

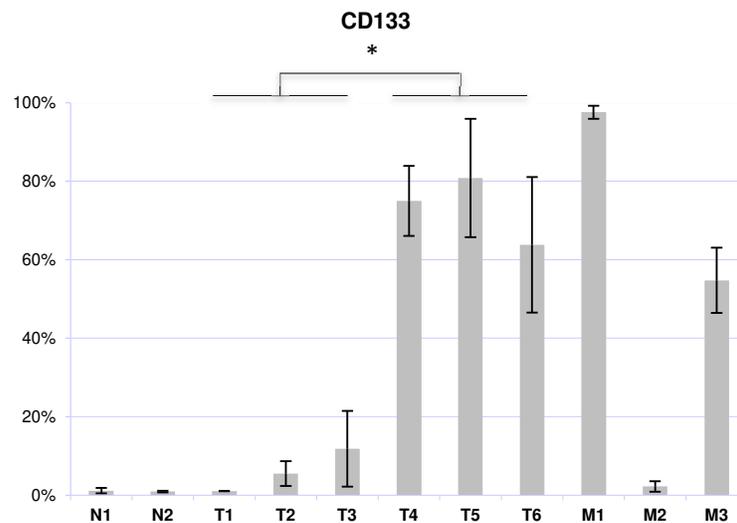


Abbildung 11: Expression des Oberflächenantigens CD133 in den analysierten Zelllinien in Relation zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verschiedener Passage-Zeitpunkte mit Standardabweichung. * $P < 0.05$.

4.2.2 Expression des Oberflächenantigens CD326

In den Normalzelllinien und der Frühkarzinom-Zelllinie T1 ist der Oberflächenmarker CD326 bei unter 2% der Zellen ausgeprägt, während bei den Frühkarzinom-Zelllinien T2 und T3 und den Metastasen-Zelllinien M1 und M2 eine Expression von über 95% erreicht wird (**Abbildung 12**). Zwischen den benignen Zelllinien der Gruppe A (MW = 2%, SD = 1%) und den malignen Zelllinien der Gruppen B, C und D (MW = 69%, SD = 35%) lässt sich zwar ein Expressionsunterschied feststellen (**Abbildung 10**), dieser wird bei Analyse der absoluten Expressionswerte statistisch jedoch nicht signifikant. Unter Einbeziehung des Scorings zeigt sich allerdings eine signifikant niedrigere CD326 Expression in benignen Zelllinien (Score 2) verglichen mit malignen Zelllinien (Score 3-4) (Chi² Test, $P = 0.038$) (**Tabelle 6**).

Betrachtet man die malignen Zelllinien detaillierter, ist CD326 innerhalb der einzelnen Tumorstadien sehr heterogen vertreten, wobei sich die Expression in den unterschiedlichen Populationen um das Zwei- bis Dreifache unterscheidet. So exprimieren beispielsweise 45% der Zellen den Marker CD326 in der Metastasen-Zelllinie M3, während in der Metastasen-Zelllinie M2 CD326 von 96% der Zellen exprimiert wird. In den Karzinomzelllinien der

4. ERGEBNISSE

Frühstadien wird dieser Unterschied sogar noch deutlicher: CD326 wird in der Zelllinie T1 von fast keiner Zelle exprimiert, bei den Zelllinien T2 und T3 jedoch von nahezu 100% der Zellen. Zwischen den einzelnen Tumorstammzell-Markern korreliert die Expression von CD326 jeweils positiv mit CD29 ($\rho = 0,659$; $P = 0,027$) und CD49f ($\rho = 0,627$; $P = 0,039$).

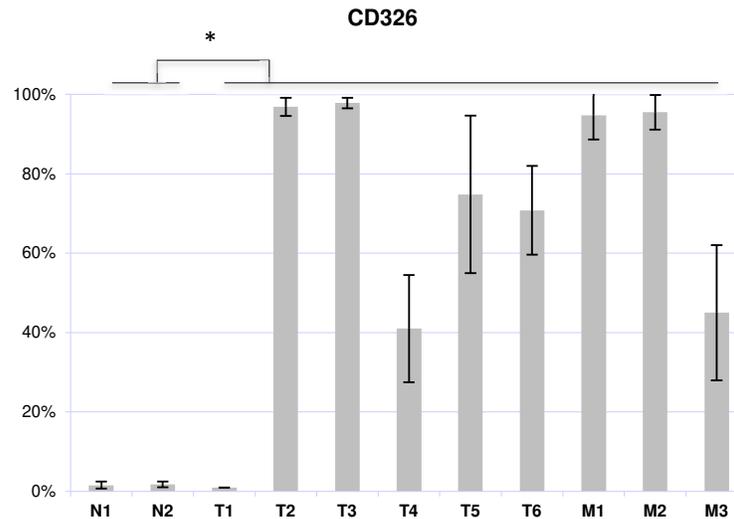


Abbildung 12: Expression des Oberflächenantigens CD326 in den analysierten Zelllinien in Relation zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verschiedener Passage-Zeitpunkte mit Standardabweichung. * $P < 0.05$.

4.2.3 Expression des Oberflächenantigens CD44

Der Oberflächenmarker CD44 ist bei nur ca. 3% der Normalzelllinien nachweisbar (**Abbildung 13**). So heben sich die Normalzelllinien der Gruppe A (MW = 3%, SD = 1%) von den Tumorzelllinien der Gruppen B, C und D (MW = 73%, SD = 36%) durch eine auffällige Mindereexpression des Oberflächenantigens ab (**Abbildung 10**), die statistisch mit dem U-Test bestätigt werden konnte ($P = 0.046$). Noch deutlicher wird der Zusammenhang unter Einbeziehung des Scorings: der Chi² Test zeigt eine Signifikanz von $P = 0.017$ für eine niedrigere CD44 Expression in benignen Zelllinien (Score 2) verglichen mit malignen Zelllinien (Score 3-4) (**Tabelle 6**).

In den Karzinomzelllinien ohne Fernmetastasierung (T1-T6) exprimieren mindestens 4/5 der Zellen CD44. Bei den Metastasen-Zelllinien lässt sich kein einheitliches Expressionsprofil erkennen.

4. ERGEBNISSE

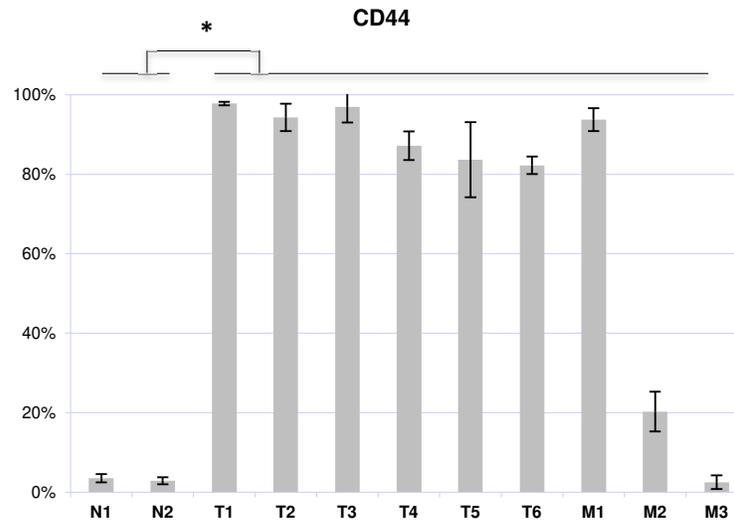


Abbildung 13: Expression des Oberflächenantigens CD44 in den analysierten Zelllinien in Relation zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verschiedener Passage-Zeitpunkte mit Standardabweichung. * $P < 0.05$.

4.2.4 Expression des Oberflächenantigens CD24

Der Oberflächenmarker CD24 zeigt ein sehr breit gefächertes Expressionsmuster (**Abbildung 14**) in den einzelnen Zelllinien, das sich innerhalb der unterschiedlichen Progressions-Gruppen uneinheitlich darstellt. In Zelllinien mit Fernmetastasierung liegt die Antigenexpression bei nahezu 100%. Betrachtet man die Expression des Oberflächenantigens CD24 im Mittel in den vier Progressions-Gruppen, so scheint sich über die einzelnen Tumorstadien eine leichte Expressionszunahme darzustellen, die jedoch nicht statistisch signifikant ist (**Abbildung 10**).

4. ERGEBNISSE

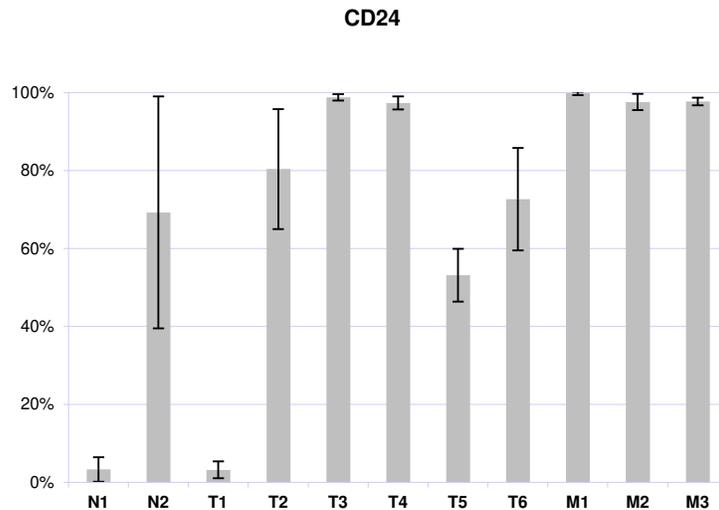


Abbildung 14: Expression des Oberflächenantigens CD24 in den analysierten Zelllinien in Relation zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verschiedener Passage-Zeitpunkte mit Standardabweichung.

4.2.5 Expression des Oberflächenantigens CD29

In allen Zelllinien liegt eine Expression des Antigens CD29 bei mindestens 30% der Zellen vor, zumeist kann dieses sogar bei über 90% der Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 15**). Dabei zeigt sich diese starke Expression sowohl in den Normalzelllinien als auch in den Metastasezelllinien. Die einzelnen Progressions-Stadien der Zelllinien (Gruppe A – D) zeigten im Mittel eine Expression von 87% (SD = 18%) (**Abbildung 10**). Es konnten keine statistisch signifikanten Assoziationen zu klinischen Parametern detektiert werden. Eine hohe CD29 Expression korreliert positiv mit einer hohen CD49f Expression ($\rho = 0,642$; $P = 0,033$).

4. ERGEBNISSE

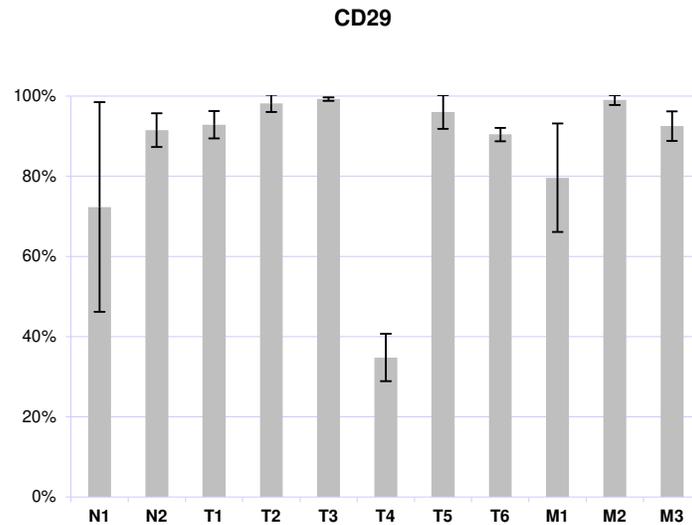


Abbildung 15: Expression des Oberflächenantigens CD29 in den analysierten Zelllinien in Relation zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verschiedener Passage-Zeitpunkte mit Standardabweichung.

4.2.6 Expression des Oberflächenantigens CD49f

Der Oberflächenmarker CD49f zeigt in fast allen Zelllinien eine Ausprägung bei mindestens 30% der Zellen (**Abbildung 16**). Die Karzinomzelllinie M3 bildet eine Ausnahme: Hier exprimieren nur 26% der Zellen dieses Antigen. Werden die Zelllinien aller Progressionsstadien (A bis D) in ihren gemittelten Expressionswerten miteinander verglichen, zeigt sich eine einheitliche Verteilung um einen Prozentwert von 85% (SD = 23%) (**Abbildung 10**). Es konnten keine statistisch signifikanten Assoziationen zu klinischen Parametern detektiert werden. Eine hohe CD49f Expression korreliert positiv mit einer hohen CD29 Expression ($\rho = 0,642$; $P = 0,033$).

4. ERGEBNISSE

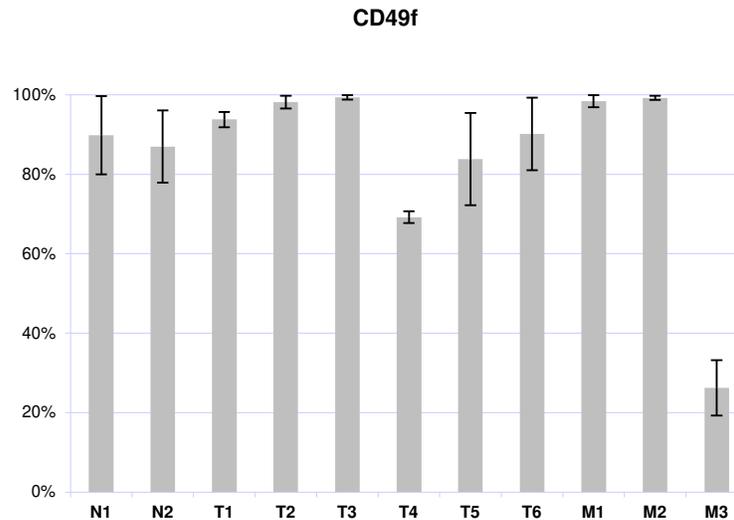


Abbildung 16: Expression des Oberflächenantigens CD49f in den analysierten Zelllinien in Relation zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verschiedener Passage-Zeitpunkte mit Standardabweichung.

4.2.7 Assoziation zwischen Expressionsprofil und Ploidie-Status

Die CD326 Expression ist nach Einbeziehung des Scorings signifikant mit dem Ploidie-Status assoziiert: So fällt die CD326 Expression bei aneuploiden Zelllinien stärker aus (Fishers Exact Test, $P = 0.038$).

Für eine höhere CD133 Expression lässt sich lediglich ein Trend bei aneuploiden Zelllinien erkennen ($P = 0.057$).

4.3 Analyse von Netzwerken und Signalwegen

Zur Analyse von möglichen Vernetzungen der analysierten Tumorstammzellmarker in gleichen biologischen Pathways wurden alle sechs Marker (CD24, CD29, CD49f, CD326, CD133, CD44) in IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) geladen und die Verbindung, Einbindung und Assoziation der Tumorstammzellmarker in Signalwegen und Netzwerken analysiert. Das generierte IPA-Netzwerk enthielt alle sechs Marker und lag mit einem Score von 17 über dem Signifikanzniveau. Die bedeutendsten vier Biofunktionen des Netzwerkes wurden mit Krebs ($P = 2,34E-03 - 1,08E-08$), organischen Verletzungen und Fehlbildungen

4. ERGEBNISSE

($P = 2,34E-03 - 1,08E-08$), Krankheiten des Respirationstraktes ($P = 2,30E-03 - 1,27E-07$) und der Tumormorphologie ($P = 2,01E-03 - 1,37E-07$) angegeben. Weiter war das Netzwerk signifikant mit Zell-Zell-Signalen und -Interaktionen ($P = 2,42E-03 - 1,33E-10$), zellulärer Bewegung ($P = 2,30E-03 - 1,37E-07$) sowie Zellaufbau und -organisation ($P = 2,42E-03 - 4,14E-07$) assoziiert. Die bedeutensten drei kanonischen Signalwege betrafen die Leukozytenextravasation ($P = 1,65E-05$), die Agrin-Interaktion neuromuskulärer Verbindungen ($P = 1,61E-04$) und die durch Caveolae vermittelte endozytäre Signalgebung ($P = 1,70E-04$). Bedeutende Transkriptionsregulatoren waren MYC, CTNNB1 (β -Catenin), TWIST2 und NOTCH1. Die Oberflächenmarker CD29 und CD49f wurden als zentrale Knotenpunkte des Netzwerks identifiziert. (**Abbildung A2**)

5. DISKUSSION

5.1 Ploidie und genomische Instabilität

Duesberg et al. [56] stellten die „Aneuploidie-Theorie der Tumorentstehung vor“, in der sie postulieren, dass Aneuploidie die primäre Ursache genomischer Instabilität ist, wobei eine fehlerhafte DNS-Replikation [99] und Zellteilung (Zentrosomen-Separation [38], chromosomale Segregation [88, 122]) zu der Entstehung eines abnormalen DNS-Gehaltes (Polyploidie oder Aneuploidie) und damit zur Tumorgenese führen. Es folgte eine Vielzahl von Studien, in denen die prognostische und prädiktive Aussagekraft der Ploidie für epitheliale Tumoren untersucht wurde [51, 67]. Das Mammakarzinom wurde als erster Tumortyp intensiv mittels DNS-Zytometrie beforscht. Intratumorale Heterogenität, genomische Instabilität und ein chromosomales Ungleichgewicht sind charakteristisch für frühe Stadien des Mammakarzinoms [142]. Obwohl in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen DNS-Aneuploidie und Tumorgenese, Tumorgrad und Prognose des Mammakarzinoms nachgewiesen wurde [9, 94, 106, 149, 211], ist der prognostische Stellenwert der DNS-Ploidie weiterhin umstritten.

Auer et al. schlugen als erste Arbeitsgruppe morphometrische Parameter für eine DNS-zytometrische Einteilung des Mammakarzinoms vor [9]. Sie klassifizierten vier histologische Typen (Auer I bis IV) entsprechend des gemessenen DNS-Profiles der malignen Mammakarzinomzellen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Normalzelllinien (N1, N2) als Typ III (euploider Karyotyp), die Karzinomzelllinien als Typ IV nach Auer (aneuploider Karyotyp) klassifiziert. Aneuploidie ist also ein Charakteristikum der Karzinomzelllinien, das diese signifikant von normalen Zellen abgrenzt. Es wird angenommen, dass aneuploide Tumorzellen durch eine erhöhte genomische Instabilität charakterisiert sind und ein höheres Malignitätspotential aufweisen als diploide Tumoren [56, 135]. Daraus lässt sich ableiten, dass Tumorzellen mit einem aneuploiden DNS-Gehalt ein besonders aggressives Tumorwachstum zeigen und somit häufiger in späten Tumorstadien anzutreffen sind. Fallenius et al. [59] konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Auer-Klassifikation und dem Krankheitsverlauf der Mammakarzinom-Patienten zeigen. Hierbei zeigten nicht-aneuploide Mammakarzinome mit Lymphknotenmetastasierung eine bessere Prognose als aneuploide Mammakarzinome mit

5. DISKUSSION

Lymphknotenmetastasierung, sodass der Ploidiegrad in dieser Studienkohorte eine bessere prognostische Aussagekraft hatte als der Lymphknotenstatus.

Basierend auf der Auer-Klassifikation unterteilten Kronenwett et al. [107] anhand des Stammlinien Verteilungs-Index (*engl. stemline scatter index*, SSI) als objektiven Messwert für die genomische Instabilität diploide und tetraploide Mammakarzinome in klinisch niedrigmaligne und hochmaligne Unterformen. Der SSI ist hierbei definiert als die Summe aus den Prozentwerten der S-Phase, *5c exceeding rate* (5cER) und dem Variationskoeffizient der Zelllinie. Es zeigte sich eine bessere Prognose für Patienten mit genomisch stabilen Tumoren, deren SSI $\leq 8,8\%$ lag, als bei Patienten mit genomisch instabilen Tumoren, die Werte oberhalb von dieser Grenze zeigten [106]. In der vorliegenden Arbeit konnten keine niedrigmalignen und hochmalignen Unterformen zwischen den verschiedenen Tumorstadien detektiert werden. Alle verwendeten Zelllinien wiesen einen SSI $> 8,8\%$ und damit eine genomische Instabilität auf. Auch die beiden diploiden Zelllinien (N1, N2) wurden als genomisch instabil klassifiziert, was mit der stattgehabten Immortalisierung normaler Brustdrüsenzellen und damit einhergehenden Kernveränderungen in Zusammenhang stehen mag. In dieser Arbeit konnte eine signifikante Zunahme der genomischen Instabilität über die verschiedenen Tumorstadien nicht gezeigt werden. Spätkarzinomzelllinien zeichneten sich im Vergleich zu Frühkarzinomzelllinien nicht durch eine höhere genomische Instabilität aus. Dies könnte mit der geringen Anzahl an Zelllinien unterschiedlichen Malignitätsgrads in Zusammenhang stehen (jeweils drei Frühkarzinomzelllinien [TNM Stadium I und IIA], drei Spätkarzinomzelllinien [TNM Stadium IIIA], drei Metastasenzelllinien [TNM Stadium IV]). Eine andere Erklärung könnte sein, dass nicht allein das Ausmaß der genomischen Instabilität, sondern insbesondere die damit einhergehenden vielfältigen genetischen Veränderungen zu einem Überlebens- und Wachstumsvorteil führen und so das Tumorwachstum vorantreiben [53]. Habermann et al. [75] untersuchten potentielle Unterschiede in der Genexpression zwischen genomisch stabilen und instabilen Mammakarzinomen. Sie konnten eine 12-Gen-Expressionssignatur, die mit der genomischen Instabilität assoziiert war, definieren und ihre biologische und prognostische Aussagekraft demonstrieren. Die 12-Gen-Expressionssignatur war hierbei ein unabhängiger Prädiktor für den klinischen Verlauf bei Mammakarzinom-Patienten, was die bedeutende Rolle der genomischen Instabilität bei der Tumorprogression und Rezidiven unterstreicht.

5. DISKUSSION

Yildirim-Assaf et al. stellten eine weitere Histogramm-Klassifikation vor. Basierend auf Schwellenwerten in den Kategorien 5cER (> 10 aneuploide Tumorzellen) und 9cER (> 1 aneuploide Tumorzelle) konnten sie in einer Studie an 370 Mammakarzinomen unterschiedlicher Malignität Patientinnen mit einem Lymphknoten-negativen und Lymphknoten-positiven Mammakarzinom in Niedrig-Risiko- und Hoch-Risiko-Gruppen mit einer schlechteren Prognose unterteilen. Die Lymphknoten-negativen Mammakarzinom-Patienten mit einer hohen Aneuploidierate (> 5cER) wiesen hierbei eine vergleichbar ungünstige Prognose wie Patienten mit Lymphknoten-positive Mammakarzinomen auf [211]. Auch andere Studien weisen darauf hin, dass insbesondere bei Mammakarzinom-Patienten früher Tumorstadien mit einer geringen Tumorgröße und ohne Lymphknotenmetastasierung die Verwendung des Ploidiegehaltes als potenter Prognosefaktor hilfreich sein könnte [14, 94, 130, 150].

5.2 Tumorstammzellmarker-Profile

Tumorstammzellen repräsentieren eine Subpopulation von Tumorzellen innerhalb eines Tumors, die sich durch ihr tumorigens Potential auszeichnet. Diese Tumorstammzellen bestimmen die Tumorprogression und –migration sowie die Initiierung neuer Tumoren und Manifestation lebenslimitierender Metastasen [45, 156]. Die Tumorstammzellen weisen dabei mehrere Schlüsseleigenschaften normaler Stammzellen auf: Selbsterneuerung, unlimitierte Proliferation, eine seltene und langsame Replikation, Resistenz gegenüber verschiedener Noxen, hohe DNA-Reparaturfähigkeit und die Fähigkeit differenzierungsfähige Tochterzellen zu generieren. In den letzten Jahren fokussierte sich die Forschung auf die Charakterisierung dieser Tumorstammzellen, um die Therapiestrategien zur Behandlung des Mammakarzinoms auf die besonderen Zelleigenschaften dieser Subpopulation auszurichten [2, 55]. Eine effiziente und sensitive Methode für die Klassifizierung und Isolierung dieser Zellen liegt in der Anwendung der Durchflusszytometrie, mit Hilfe derer sich Zellen anhand eines bestimmten Musters von Oberflächenmarkern sortieren und phänotypisieren lassen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden sechs Oberflächenmarker eingesetzt, die bereits von verschiedenen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen erfolgreich bei der Isolierung von

5. DISKUSSION

Tumorstammzellen verwendet worden sind. Hierbei handelt es sich um drei Mamma-spezifische Marker (CD24, CD29 und CD49f) und drei Entitäten-übergreifende Marker (CD326, CD133 und CD44), deren Expression in elf Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien unterschiedlichen Progressionsgrads (Normalzelllinien, Karzinomzelllinien ohne Lymphknotenbefall, Karzinomzelllinien mit Lymphknotenbefall, Metastasenzelllinien) untersucht worden sind.

5.2.1 CD24, CD29 und CD49f

Shackleton et al. [165] und Stingle et al. [178] identifizierten unabhängig voneinander den Phänotyp sogenannter *mammary-repopulation units* (MRUs; auf Deutsch: Brustdrüsen induzierende Einheiten) als Lin^{neg}CD29^{hi}CD24^{pos} Zellen [165], bzw. CD49^{pos}CD24^{pos}Sca-1^{low} Zellen [178]. Mit Hilfe dieser Brustdrüsenstammzellmarker gelang die weitere Charakterisierung Tumor-initiiender Zellen aus Mammakarzinomen [198]. Vassilopoulos et al. [194] wiesen Subpopulationen von CD24^{pos}CD29^{pos} oder CD24^{pos}CD49f^{pos} in Mammakarzinom-Zelllinien nach, die sich *in-vivo* durch eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit, die Fähigkeit, Kolonien zu formen, und ein erweitertes Tumorigenerendes Potential auszeichneten. Im selben Jahr wurden außerdem tumorigene Zellen in *mouse mammary tumor virus* (MMTV; auf Deutsch: Tumovirus der Brustdrüse der Maus)-Wnt-1 Mäusen identifiziert, unter denen die Thy1^{pos}CD24^{pos} Zellen ein höheres Potential in der Regeneration von Tumoren als die Thy1^{neg}CD24^{neg} Zellen besaßen [44].

In der hier vorliegenden Arbeit konnten die Oberflächenmarker CD24, CD29 und CD49f in allen elf Zelllinien nachgewiesen werden. Auch Normalzelllinien exprimierten diese Markerproteine in hoher Konzentration. Vor dem oben geschilderten Hintergrund ist dies leicht nachvollziehbar: Es handelt sich um Marker, die initial zur Charakterisierung von Brustdrüsenstammzellen dienten und schließlich erfolgreich in der Isolation von Tumorstammzellen des Mammakarzinoms Verwendung fanden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Tumorstammzellen aus normalen Stammzellen hervorgehen und viele Eigenschaften dieser (Proliferation, Selbsterneuerung, unbegrenztes Wachstum) beibehalten [156].

In der hier vorliegenden Arbeit korreliert die Expression von CD29 mit CD49f ($\rho = 0,642$; $P = 0,033$). CD29 kann mit CD49f Heterodimere (Integrin $\alpha 6\beta 1$) bilden [120], welche als Adhäsionsrezeptoren für Membranproteine der Laminin- und Desintegrinfamilie fungieren.

5. DISKUSSION

Chang et al. konnten zeigen, dass Mammakarzinom-Stammzellen Laminin-511 produzieren, ein Ligand für Integrin $\alpha 6\beta 1$, wodurch die Reproduktion der Tumorstammzellen gefördert und damit die Tumorentstehung begünstigt wird [40]. Darüber hinaus spielt Integrin $\alpha 6\beta 1$ eine Rolle bei der Entstehung von Lungenmetastasen [82], wobei CD49f auch unabhängig von CD29 bei der Metastasierung des Mammakarzinoms eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint [210].

5.2.2 CD44 steigert das Malignitätspotential einer Zelle

Al-Hajj et al. [3] waren die Ersten, die mittels der Zelloberflächenmarker CD44 und CD24 zwischen tumorigenen und nicht-tumorigenen Stammzellen unterscheiden konnten. Bei Mammakarzinomzellen, welche eine CD44^{pos}/CD24^{neg} Subpopulation beinhalteten, konnte eine höhere Expression von proinvasiven Genen und eine erhöhte Tendenz zu invasivem Wachstum nachgewiesen werden [167]. Außerdem scheint dieser Phänotyp resistenter gegenüber konventioneller Radiotherapie zu sein. In einer Studie von Phillips et al. wurde der Effekt einer Radiotherapie mit einer Einzeldosis (10 Gy) oder fünf fraktionierten Einzeldosen (5 x 3 Gy) auf die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 untersucht. Während der fraktionierten Bestrahlung nahm die Anzahl der CD44^{pos}/CD24^{neg}-Subpopulation zu. Dieses ging mit einer durch die Radiotherapie-induzierten Zunahme der Jagged-1 Expression und nachfolgenden Aktivierung des Notch-1-Signalweges einher [147].

In der hier vorliegenden Arbeit konnten statistisch signifikant benigne Mammazelllinien mit einer niedrigen Expression des Oberflächenmarkers CD44 von malignen Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen Expression des Oberflächenmarkers CD44 abgegrenzt werden (P = 0,046 bzw. nach Scoring P = 0,017). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Oberflächenmarker CD44 bei der Konversion einer Mamma-Stammzelle zu einer Mammakarzinom-Stammzelle eine entscheidende Rolle spielen könnte [169]. Es wurde beobachtet, dass die CD44 Expression auf sog. *Cancer-associated Fibroblasts* (CAFs, auf Deutsch: Krebs-assoziierte Fibroblasten) eine funktionelle Rolle in der Vermittlung von Stammzeleigenschaften und der Therapie-Resistenz maligner Tumorzellen in ihrer Tumormikroumgebung spielt [100]. Die CD44 Expression von Tumorzellen scheint das Malignitätspotential einer Zelle erheblich zu steigern. Als Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure ist es an der Zelladhäsion [126], Migration [11], Invasion [129] und

5. DISKUSSION

Metastasierung [126, 167] von Mammakarzinomzellen beteiligt. Zudem scheint CD44 eine prognostische Aussagekraft zuzukommen [1, 52]. Durch die Inaktivierung von CD44 in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 konnte *in vitro* die Tumorzelladhäsion und –invasion reduziert sowie *in vivo* nach intrakardialer Injektion transfizierter MDA-MB-231 Zellen in Mäuse mittels Bildgebung und *post mortem* Gewebeuntersuchungen ein längeres Überleben und eine geringere Tumorlast nachgewiesen werden [126]. Die detektierte starke Ausprägung dieses Markers in fast allen in dieser Arbeit verwendeten Karzinomzelllinien geht einher mit diesen aktuellen wissenschaftlichen Beobachtungen.

5.2.3 CD326 fördert maligne Zelleigenschaften

CD326 wird als sog. Zelladhäsionsmolekül in hohem Maß von epithelialen Tumorzellen exprimiert, findet sich aber auch auf Progenitor- und Stammzellen [162, 198]. CD326^{pos} Zellen zeigen tumorigenes Potential im SCID-Maus-Tumormodell [123] und können über Transkriptionsfaktoren eine Stammzell-assoziierte Reprogrammierung zur Pluripotenz induzieren [83]. Eine Beteiligung von CD326 an der Zellzyklusregulation konnte ebenfalls gezeigt werden [43]. Darüber hinaus scheinen CD326-Fragmente, die durch Proteolyse, Proteincleavage oder Splicing entstehen, weitere regulatorische Rollen in der Zellproliferation zu übernehmen [76, 162, 163].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte für den Oberflächenmarker CD326 unter Einbezug des Scorings eine signifikant höhere Expression in malignen verglichen mit benignen Mammazelllinien ($P = 0,038$) sowie eine signifikante Assoziation der CD326 Expression mit dem Ploidie-Status ($P = 0,038$) gezeigt werden. Martowicz et al. konnten nachweisen, dass CD326 durch die Induktion einer Resistenz gegenüber der TGF- β (*Transforming growth factor- β* , auf Deutsch: Transformierender Wachstumsfaktor- β) vermittelten Suppression der Proliferation bei humanen Mammaepithelzellen *in vitro* zu einer verlängerten Proliferationszeit und *in vivo* zu einem hyperplastischem Wachstum führt [125]. CD326 könnte somit tumorigenes Potential in normalen Mammazellen induzieren und bei der Transformation von der Stammzelle zur Tumorstammzelle eine Rolle spielen. Beim Mammakarzinom ist CD326 mit der Tumorprogression [64], -invasion und –metastasierung [12, 80] assoziiert. In einer Studie von Gao et al. führte die Inaktivierung von CD326 in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zu einer Inhibierung des Ras/Raf/ERK Signalweges und der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9),

5. DISKUSSION

was *in vivo* zu einem reduzierten Wachstum und einer verminderten Metastasierung des Mammakarzinoms führte [64].

Zwischen den einzelnen Markern korreliert die Expressionen von CD326 positiv mit CD29 ($\rho = 0,659$ und $P = 0,027$) und mit CD49f ($\rho = 0,627$ und $P = 0,039$). In einer Studie von Ghebeh et al. hatten sowohl normale als auch maligne Mammazellen mit dem Phänotyp CD44^{high}/CD24^{low} das höchste Stammzell-/Progenitorzell-Potential, wenn sie mit den Oberflächenmarkern CD326/CD49f kombiniert wurden [68]. Zudem zeigte der CD44^{pos}CD24^{neg}ALDH1A1^{pos}CD326^{pos}CD49f^{pos}-Phänotyp bei Mammakarzinom-Patientinnen ein schlechteres Langzeitüberleben [200]. Eine CD326 Überexpression ist mit einer schlechteren Prognose für Mammakarzinom-Patientinnen assoziiert [66, 175]. Durch spezifische an CD326-Antikörpern gekoppelte Therapeutika könnte somit eventuell eine erhöhte pharmakokinetische und therapeutische Wirkung erzielt werden [172].

5.2.4 CD133 als möglicher Prognosefaktor

CD133 gehört zu der Familie der 5-Transmembranglycoproteine und wurde initial als Marker hämatopoetischer Stammzellen betrachtet [212]. Neben seinem physiologischen Vorkommen auf adulten Stamm- und Progenitorzellen [170] wurde eine Überexpression von CD133 im pathologischen Kontext bei vielen verschiedenen Tumorentitäten beschrieben [79, 108, 114, 139, 157, 168, 173, 203]. CD133 ist an der Tumorentstehung [128], Zellmigration [111], Vaskularisierung [118] und Metastasierung [30] des Mammakarzinoms beteiligt. In verschiedenen Studien gibt es Hinweise für seine prädiktive und prognostische Bedeutung in der Therapie des Mammakarzinoms [7, 98, 132].

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikant unterschiedliche CD133 Expression in Zusammenhang mit dem UICC Status der verwendeten Zelllinien, mit einer stärkeren Expression des Oberflächenmarkers CD133 in den höheren UICC Stadien ($P = 0,05$). Die CD133 Expression scheint also in bedeutendem Maß zur Malignität einer Zelle beizutragen. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch gestützt, dass als Trend ein Expressionsunterschied zwischen benignen Zellen mit einer niedrigeren und malignen Zellen mit einer stärkeren Expression von CD133 nahe der Signifikanzgrenze mit $P = 0,057$ gezeigt wurde. CD133 soll an der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt sein [111]. Die EMT ist ein biologischer Prozess, bei dem epitheliale Zellen multiple biochemische Veränderungen durchlaufen, die zu einem mesenchymalen Phänotyp führen

5. DISKUSSION

[91]. Die EMT stellt einen zentralen Mechanismus bei der Entstehung maligner Phänotypen epithelialer Tumorzellen dar [185]. Latorre et al. konnten zeigen, dass ein Ribonuklein-Komplex bestehend aus RNA MALAT1 und HuR (ELAVL1) durch die Bindung an die Promoterregion von CD133 dessen Expression reguliert. Hierdurch konnte in der luminalen nicht-metastasierten Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 die CD133 Expression hochreguliert werden, was mit einer gesteigerten Migration und einem mesenchymalen Phänotyp einherging [111]. Dies wiederum könnte die Transformation zu invasiven Phänotypen und die Metastasierung von Mammakarzinom-Zellen begünstigen. Darüber hinaus scheint CD133 an Resistenzmechanismen gegen verschiedene Therapien des Mammakarzinoms beteiligt zu sein [132, 161] und damit eine Rolle bei Tumorrezidiven zu spielen. Swaminathan et al. gelang es, durch eine spezifisch gegen CD133 gerichtete Therapie mit Paclitaxel Tumorrezidive im Mammakarzinom-Mausmodell zu verhindern, wohingegen eine freie Paclitaxel-Therapie zunächst zwar zu einer Inhibierung des Tumorwachstums führte, nach Therapieende jedoch erneut ein Tumorprogress zu verzeichnen war [179]. Ein weiterer Ansatz wäre der Einsatz von Inhibitoren der Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2, durch die in einer Studie von Bao et al. eine Sensibilisierung CD133^{pos} Zellen für die Strahlentherapie herbeigeführt werden konnte [15]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte zudem ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen und Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Zelllinien mit einer niedrigen CD133 Expression festgestellt werden ($P = 0,022$). Die deutliche CD133 Expressionszunahme bei Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien ließ sich auch unter Einbeziehung des Scorings zeigen ($P = 0,018$). So könnte eine hohe CD133 Expression bei Patientinnen mit Mammakarzinomen eines frühen Tumorstadiums ohne Lymphknotenmetastasierung auf eine ungünstige Prognose mit einem erhöhten Risiko für eine Tumorprogression mit Lymphknotenmetastasierung hindeuten. In einer retrospektiven Studie von Kim et al. wurde bei 291 Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom (TNM Status I, II, III), die in den Jahren 2005 bis 2010 eine Lymphonodektomie oder modifizierte radikale Mastektomie ohne neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, immunhistochemisch die CD133 Expression untersucht. Hierbei konnte eine Assoziation der CD133 Expression mit Lymphknotenmetastasen sowie

5. DISKUSSION

einem schlechteren krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben nachgewiesen werden [98].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zudem eine Korrelation einer erhöhten CD133 Expression mit einem aneuploiden DNS-Status ($P = 0,057$). Dies fügt sich in die Beobachtungen von Yildirim-Assaf et al., dass sich bei Lymphknoten-negativen Mammakarzinom-Patientinnen mit einer hohen Aneuploidierate (> 10 aneuploide Tumorzellen $>5c$) eine schlechtere Prognose als bei Lymphknoten-negativen Mammakarzinom-Patientinnen mit einer niedrigen Aneuploidierate (< 10 aneuploide Tumorzellen $>5c$) zeigte [211].

Adjuvante wie auch palliative Therapieentscheidungen für Patientinnen mit Mammakarzinom werden derzeit basierend auf den klassischen Prognosefaktoren wie Tumorstadium und -größe, axillarem Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, Hormonrezeptorexpression und Her-2/neu-Überexpression getroffen [101]. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte eine Erweiterung dieser Prognosefaktoren um die CD133 Expression denkbar sein. Hierbei ist die prognostische Bedeutung vor allem für Patientinnen mit Karzinomen eines frühen Tumorstadiums ohne Lymphknotenmetastasierung hervorzuheben. So könnte also durch die frühe Identifikation aggressiver Tumortypen durch eine CD133 Phänotypisierung eine optimierte, personalisierte Therapie stattfinden.

5.3 Analyse von Netzwerken und Signalwegen

Eine explorativen Netzwerk-Analyse der Fokusproteine zur Tumorstammzellphänotypisierung (CD24, CD29, CD49f, CD326, CD133, CD44) zeigte, dass alle sechs Marker in dem generierten IPA (Ingenuity Pathway Analysis)-Netzwerk enthalten waren. Das Netzwerk war signifikant mit Biofunktionen wie Krebs, organischen Verletzungen und Fehlbildungen, Krankheiten des Respirationstraktes und der Tumormorphologie assoziiert.

Bedeutende Transkriptionsregulatoren in diesem Netzwerk waren MYC, CTNNB1 (β -Catenin), TWIST2 und NOTCH1. Sie sind über verschiedene Signalwege an der Tumorgenese und Regulation von Tumorstammzellen beteiligt [181]. So zeigen *triple-negative* Mammakarzinome im Vergleich zu Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und

5. DISKUSSION

Her2/neu-Rezeptor- (*human epidermal growth factor receptor 2*, auf Deutsch: Epithelialer Wachstumsfaktor 2-Rezeptor) positiven Mammakarzinomen eine übersteigerte Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors MYC [184], welcher im Zusammenhang mit dem Fettmetabolismus und Tumorwachstum *triple-negativer* Mammakarzinome stehen soll [35]. Die Notch/CSL und Wnt/ β -Catenin Signalwege sind an der Entwicklung der fetalen und adulten Brustdrüse beteiligt und sollen bei der Therapieresistenz *triple-negativer* Mammakarzinome und bei der Entstehung von Tumorstammzellen eine Rolle spielen [155]. Liu et al. konnten zeigen, dass microRNA-1 durch eine Inhibierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs die Proliferation und Migration von Mammakarzinom-Stammzellen runterreguliert [119]. TWIST2 führt zu einem gesteigerten Wachstum des Mammakarzinoms, indem es die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) und Selbsterneuerung der Tumorstammzellen fördert [60].

Die Oberflächenmarker CD29 und CD49f wurden als zentrale Knotenpunkte des Netzwerks identifiziert. CD29 und CD49f sind heterodimere Transmembranproteine und wurden zunächst als Adhäsionsmoleküle mit der Fähigkeit, Verbindungen zu spezifischen Elementen der extrazellulären Matrix sowie zu benachbarten Zellen einzugehen, identifiziert. Aufgrund dieser Eigenschaften spielen sie neben ihrer physiologischen Bedeutung beim Zellwachstum, der Embryogenese und Angiogenese eine herausragende Rolle bei der Tumorentstehung und -progression, was sie zu einem potentiellen Angriffspunkt in der Tumorthherapie macht [18, 48]. Sowohl CD29 als auch CD49f sind an der Tumorpheriferation [204], dem Metastasierungsprozess [193, 210] und der Therapieresistenz [187] des Mammakarzinoms beteiligt. Passend hierzu war das IPA-Netzwerk signifikant mit Zell-Zell-Signalen und -Interaktionen, zellulärer Bewegung sowie Zellaufbau und -organisation assoziiert. Zur Identifikation und Isolation von Tumorstammzellen werden CD29 und CD49f häufig mit den andern in dieser Arbeit verwendeten Markern kombiniert [68, 193, 200]. Auf diese Weise wird versucht, eine möglichst präzise Identifikation und reine Isolierung von Mammakarzinom-Stammzellen zu erreichen.

5.4 Tumorstammzellen im Zelllinienmodell

Das Mammakarzinom umfasst zahlreiche Tumortypen verschiedener genetischer und genomischer Variabilität, mit mannigfaltigen histopathologischen Eigenschaften und

5. DISKUSSION

unterschiedlichen Krankheitsverläufen. Diese Komplexität und Heterogenität lässt sich in Gänze kaum in nur einem einzigen Tumormodell erfassen [192]. Mammakarzinom-Zelllinien werden bereits viele Jahre genutzt, um die Fehlsteuerung in der Proliferation, Apoptose und Migration des Mammakarzinoms sowie damit im Zusammenhang stehenden Genen und Signalwegen zu erforschen [81, 112]. Die Vorteile des Zellkultur-Systems liegen in einer einfachen Zugänglichkeit und Handhabung, in der schnellen Reproduzierbarkeit der Experimente sowie in einer guten Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Humane Zellen repräsentieren biologische Systeme humaner Krankheiten besser als Säugetierzellen. Zudem wird immer wieder scharf diskutiert, ob der Transformation humaner und tierischer Epithelzellen dieselben genetischen Veränderungen zugrunde liegen [154]. Neve et al. demonstrierten, dass 51 Mammakarzinom-Zelllinien die typischen genomischen Auffälligkeiten aufweisen, die in primären Mammakarzinomen beobachtet werden und die langjährige Kultivierung dieser Zelllinien nicht die genomischen Abberationen beeinträchtigt hat [134]. Des Weiteren konnten durch eine molekulare Charakterisierung in Mammakarzinom-Zelllinien verschiedene Subtypen identifiziert und diejenigen Zelllinien definiert werden, welche die Tumorerogenität im Mammakarzinom am besten widerspiegeln [93]. Unterschiede zwischen Mammakarzinom-Zelllinien und primären Mammakarzinomen könnten mit der Gewinnung der Zelllinien vornehmlich aus späten Tumorstadien und der Pleuraflüssigkeit von Mammakarzinom-Patientinnen zusammenhängen. Zudem findet in Mammakarzinom-Zelllinien die Zellproliferation unabhängig von der Mikroumgebung und Immunmodulation statt [196]. Sphäroidkulturen ermöglichen es, Tumorzellen in einer mikrostrukturierten dreidimensionalen (3D) Zellkultur unter organspezifischen Bedingungen zu kultivieren. Diese 3D-Zellkulturen sind in der Mammakarzinom-Forschung aufgrund der realitätsnahen Physiologie des Zellverbandes und hohen Ähnlichkeit zur Tumormorphologie *in vivo* gut etabliert [201]. Die Zellkultivierung in Sphäroidkulturen ist technisch jedoch anspruchsvoller als in Monolayerkulturen.

In mehreren Studien konnten sowohl in Monolayer- [31, 42, 49, 62] als auch in Sphäroidkulturen [74, 116, 121] Tumorstammzellen nachgewiesen werden. So isolierten Fillmore und Kupperwasser aus sechs kommerziellen Mammakarzinom-Zelllinien eine CD44^{pos}/CD24^{neg/low}/CD326^{pos} Subpopulation, von denen weniger als 100 Zellen ausreichten, um in NOD/SCID-Mäusen Mammakarzinome zu formen [62]. Boo et al.

5. DISKUSSION

kultivierten aus der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 Sphäroidkulturen und untersuchten diese mittels *next generation sequencing* (NGS) auf ihre microRNA und Tumorstammzell-Eigenschaften. Sie konnten in der MCF-7-Sphäroidkultur Mammakarzinom-Stammzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, einer gesteigerten Expression von Tumorstammzellmarkern und erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika nachweisen [22].

Für eine spezifisch gegen Mammakarzinom-Stammzellen gerichtete Therapie bedarf es einer genauen Charakterisierung ihres biologischen Verhaltens, um sie von somatischen Körper- und Stammzellen abgrenzen, gezielt ansteuern und ihre besonderen Resistenzmechanismen außer Kraft setzen zu können. Es stellt sich die Frage, wie gut humane Mammakarzinom-Zelllinien als Modellsystem für die Charakterisierung von Tumorstammzellen dienen. Um diese Frage besser beantworten zu können, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression typischer Tumorstammzellmarker (CD24, CD29, CD49f, CD326, CD133, CD44) mittels Durchflusszytometrie in elf Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien unterschiedlichen Progressionsgrads (Normalzelllinien, Karzinomzelllinien ohne Lymphknotenbefall, Karzinomzelllinien mit Lymphknotenbefall, Metastasenzelllinien) untersucht. In allen Mammakarzinom-Zelllinien ließen sich charakteristische Tumorstammzellmarker nachweisen. Zudem ließen sich durch die Oberflächenmarker CD326 und CD44 benigne und maligne Zellen signifikant voneinander abgrenzen. Die CD133 Expression zeigte eine positive Korrelation mit dem UICC Status und der Lymphknotenmetastasierung der verwendeten Zelllinien, mit einer hohen CD133 Expression in Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien und einer niedrigen CD133 Expression in Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Zelllinie. Im *in vitro* Modell der elf hier gewählten, kommerziellen Zelllinien konnte somit die Präsenz von Tumorstammzellen gezeigt werden. Um zu eruieren, wie gut Mammakarzinom-Zelllinien hierbei primäres Tumorgewebe repräsentieren, wurde in unserer Arbeitsgruppe mittels Immunhistochemie die Tumorstammzellmarker-Expression von CD326, CD44 und CD133 in normalem Gewebe und 405 primären Mammakarzinomen untersucht. CD326 ließ sich insbesondere in schlecht differenzierten Mammakarzinomen nachweisen; CD44 wurde stärker in Mammakarzinomen als in normalem Gewebe exprimiert und war mit der Tumorgröße, einem negativen Östrogenrezeptor-Status, einer

5. DISKUSSION

schlechteren Tumordifferenzierung und einer schlechteren Prognose assoziiert; CD133 war sowohl in normalem Gewebe als auch in fortgeschrittenen Mammakarzinomen exprimiert und korrelierte mit einer schlechteren Prognose [190]. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass etablierte Mammakarzinom-Zelllinien ein wertvolles *in vitro* Modell für die weitere Charakterisierung von Tumorstammzellen darstellen. Dabei haben pharmakologische Studien zur Vorhersage des Therapieansprechens und zur Testung der Therapiewirksamkeit einen besonderen Stellenwert [136]. Proliferativ aktive, somatische Tumorzellen und auch sensitive Stamm- und Progenitorzellen werden durch die gängigen Therapeutika in die Apoptose gezwungen. Tumorstammzellen hingegen können diesen durch vielfältige Resistenzmechanismen entgehen: Sie können in eine sog. Seneszenz oder Dormanz fallen und dadurch ohne aktiven Zellzyklus von Zytostatika nicht getroffen werden [33], sie können die DNS-Reparaturmechanismen erhöhen und so einen therapiebedingten DNS-Schaden schnell ausgleichen [15] oder auch durch multiple Zellmembran-Pump- und Transportmechanismen [54], der Aktivierung von Überlebens-Signalwegen [186] oder einer erhöhten enzymatischen Degradation [144] zytotoxische Therapeutika schnell aus der Zelle entfernen. Durch diese Wachstums- und Selektionsvorteile überleben Tumorstammzellen die Therapie und können schließlich zu einem lokalen Rezidiv und/ oder distanten Metastasen führen. Eine Inhibition der Resistenzmechanismen und damit ein Sensitiveren für spezifische Tumorstammzell-Adjuvantien muss im Fokus zukünftiger Therapeutika-Entwicklungen stehen [143]. Hierbei könnten die in dieser Arbeit verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien insbesondere für die Entwicklung und Testung spezifisch gegen CD326, CD44 und CD133 gerichteter Therapeutika eine Grundlage bieten. Schließlich sollte nach erfolgreichem *in-vitro* Experiment auch eine Translation der Ergebnisse auf ein primäres Zelllinienmodell, ein murines Modell und schließlich humane Proben stattfinden [192].

5.5 Aktuelle wissenschaftliche Daten

Die Charakterisierung der Tumorstammzellen spielt in der Wissenschaft weiterhin eine bedeutende Rolle für ein besseres Verständnis der Tumoreigenschaften und zur Etablierung einer spezifischen und effektiven Therapie [8, 10, 32]. In den letzten Dekaden wurden

5. DISKUSSION

verschiedene Biomarker zur Analyse von Tumorstammzellen identifiziert [199], wodurch es gelang, die Mammakarzinom-Stammzellen weiter zu charakterisieren [86, 166, 183, 217]. CD44 beeinflusst auf mannigfaltige Weise das tumorigene Potential einer Zelle [77]. Im Mammakarzinom ist es mit höheren Tumorstadien [158] und einer erhöhten Metastasierungsneigung assoziiert [153]. Alvarez-Elizondo et al. isolierten aus der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 verschiedene Tumorsubpopulationen, in denen die CD44⁺ALDH⁺-Tumorzellen in der mechanobiologischen Untersuchung ein hochinvasives Verhalten zeigten [5]. Yang et al. beobachteten die Veränderung luminaler Mammakarzinomzellen während der Metastasierung und stellten fest, dass die CD44 Expression während des Metastasierungsprozesses fluktuierte und von der Mikroumgebung des Tumors abhängig war [206]. Dies spricht für eine instabile Subpopulation CD44 positiver Tumorzellen im Mammakarzinom. Für die Analyse der Mammakarzinom-Stammzellen wird dieser Marker häufig mit anderen Markern wie beispielweise CD24, CD49f oder CD326 kombiniert [146, 215].

CD326 ist als multifunktionales Transmembranprotein an der Regulation der Zelladhäsion, Proliferation, Migration und an der epithelialen zur mesenchymalen Transition von Tumorzellen beteiligt [69]. Es spielt bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle [28, 216] und wurde in den letzten Jahren zur Isolation klinisch relevanter zirkulierender Tumorzellen genutzt [58]. Zhang et al. setzten an CD326-Aptamere gebundene RNA-Chimere ein, um bei Mäusen mit Mammakarzinom selektiv Gene, die an Tumorwachstum und -infiltration beteiligt sind, in CD326 positiven Tumorzellen auszuschalten. Dies resultierte in einem verminderten Tumorwachstum und machte die Tumorzellen für das Immunsystem zugänglicher [220].

Mehrere Studien untermauern den diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Wert des Biomarkers CD133 für das Mammakarzinom [29]. Es konnte gezeigt werden, dass die CD133 Expression bei Mammakarzinom Patientinnen ein unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Tumorprogression ist und mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit einhergeht [78, 89]. Yin et al. gelang es *in vitro* und *in vivo* RNA-Nanopartikel mit Hilfe eines CD133-Aptamers hoch spezifisch in CD133 positive Tumorzellen dreifach negativer Mammakarzinome einzuschleusen und so hoch effektiv das Tumorwachstum zu inhibieren [213].

5. DISKUSSION

In vitro Studien bereiten die Grundlage für die Untersuchung verschiedener Tumorentitäten *in vivo*, führen zu einem besseres Krankheitsverständnis und Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten, sodass immer wieder neue Tumorzelllinien, auch im Hinblick auf unterschiedliche ethnische Hintergründe, etabliert werden [4]. Paolillo et al. untersuchten die Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 in dynamischen 3D Zellkultur-Systemen, um auf diese Weise *in vivo* Bedingungen besser nachzuahmen [141]. Um den Einfluss der Mikroumgebung auf die Tumorzellen untersuchen zu können sind solche Zellsysteme von großem Wert. Kannan et al. veröffentlichten detaillierte Protokolle zur Gewinnung von Sphäroid-Kulturen aus normalem Brustdrüsengewebe und Mammakarzinomgewebe von Mäusen, aus Xenograft-Modellen und Mammakarzinom-Zelllinien [92]. Zelllinien stellen weiterhin ein bedeutsames Modell zur Charakterisierung der Tumorstammzellen und ihrer Eigenschaften dar. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten kommerziellen Mammakarzinom-Zelllinien Tumorstammzellen enthalten und somit eine wichtige Grundlage für weitere *in vitro* Analysen sein können. Die Oberflächenmarker CD326 und CD44 konnten signifikant benigne und maligne Zellen voneinander abgrenzen. Eine erhöhte CD133 Expression korrelierte mit einem höheren UICC Status der verwendeten Zelllinie. Außerdem konnte zwischen Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen und Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Zelllinien mit einer niedrigen CD133 Expression unterschieden werden. CD133 könnte die Identifikation aggressiver Tumortypen mit einem erhöhten Risiko der Lymphknotenmetastasierung erlauben und damit von herausragender prognostischer und therapeutischer Bedeutung sein.

5.6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien einen unterschiedlichen Ploidie-Status aufweisen.

In etablierten Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien lassen sich zudem charakteristische Tumorstammzellmarker nachweisen, die in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich exprimiert sind und vereinzelt miteinander korrelieren.

Interessanterweise erlaubt CD133 zwischen Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen und Lymphknotenmetastasen-negativen

5. DISKUSSION

Mammakarzinom-Zelllinien mit einer niedrigen CD133 Expression zu unterscheiden. Gleichzeitig ist eine höhere CD133 Expression sowie eine höhere CD326 Expression überwiegend in aneuploiden Zellpopulationen zu beobachten.

Allen untersuchten Tumorstammzellmarker gemeinsam waren Interaktionen im gleichen biologischen Netzwerk mit zentralen Transkriptionsregulatoren wie MYC, CTNNB1 (β -Catenin), TWIST2 und NOTCH1.

5.7 Ausblick

Im *in-vitro* Modell der elf hier gewählten, kommerziellen Zelllinien konnte die Präsenz von Tumorstammzellen gezeigt werden. Eine weitere molekulargenetische und zytogenetische Charakterisierung der Tumorstammzellen bezüglich des zytogenetischen Profils auf Einzelzellniveau, Wachstumsverhaltens unter verschiedenen Bedingungen und Verbänden sowie die Mechanismen zu Therapieresistenz und Metastasierung können zukünftig hieran erfolgen.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass den Oberflächenmarkern CD44 und CD326 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von normalen Gewebestammzellen zu Mammakarzinom-Stammzellen zukommt. Eine Kombination dieser Marker mit Mamma-spezifischen Markern (CD24, CD29 und 49f) könnte so eine gezielte Isolierung und Therapieausrichtung auf Mammakarzinom-Stammzellen möglich machen (**Abbildung 17**).

5. DISKUSSION

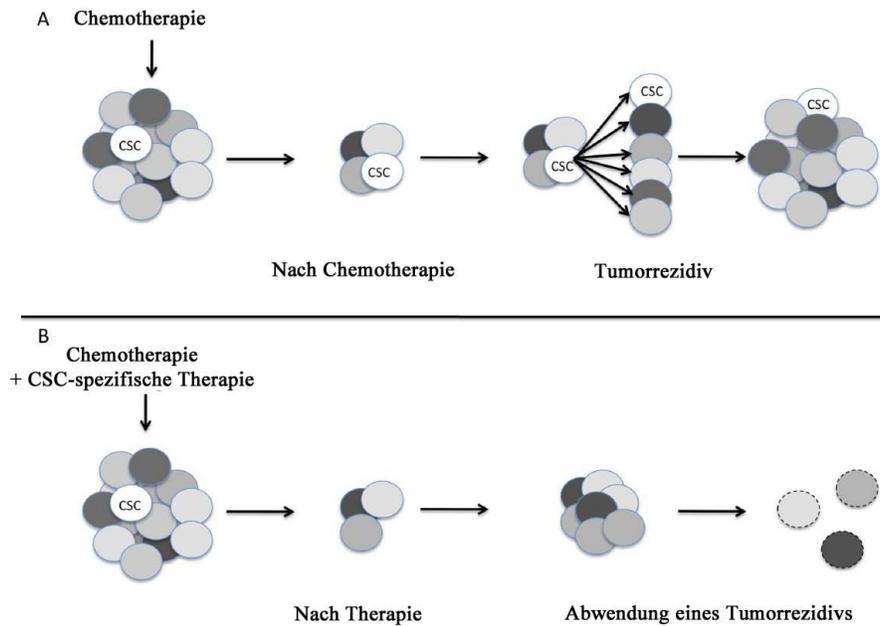


Abbildung 17: Der Einfluss von Tumorstammzellen auf die zukünftige Therapie des Mammakarzinoms

A) Wirkung der alleinigen Chemotherapie: Die Haupt-Tumormasse schrumpft. Chemoresistente Tumorstammzellen (CSC = cancer stem cells) überleben die Therapie, führen zur Selbsterneuerung und formen einen neuen Tumor. Somit sind Tumorstammzellen für Chemoresistenz und Tumorrezidive verantwortlich. B) Die voraussichtliche Wirkung einer Kombination aus Chemotherapie und einer gezielt gegen Tumorstammzellen gerichteten Therapie: Die kombinierte Therapie zerstört nicht nur die Haupt-Tumormasse, sondern auch die Tumorstammzellen. Die verbleibenden nicht-Tumorstammzellen ohne Möglichkeit der Selbsterneuerung gehen zugrunde, der Tumor ist damit vollständig zerstört.

Modifiziert nach Siclari et al. (2010) [171]

Zudem trennt der Oberflächenmarker CD133 zwischen Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen und Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Zelllinien mit einer niedrigen CD133 Expression. Ließe sich also bei Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Patientinnen eine stark erhöhte CD133 Expression detektieren, wäre dies als prognostisch ungünstig zu werten und ein höheres Risiko der Lymphknotenmetastasierung anzunehmen. Die Entscheidung zu einer adjuvanten oder palliativen Therapie beim Mammakarzinom richtet sich aktuell im Wesentlichen nach Prognosefaktoren wie Tumorstadium und -größe, axillarem Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, Hormonrezeptorexpression und Her-2/neu-

5. DISKUSSION

Überexpression. Eine Erweiterung dieser Prognosefaktoren um die CD133 Expression erscheint im Hinblick auf die oben dargestellten Ergebnisse denkbar. So könnte durch die Identifikation aggressiver Tumortypen mit CD133 eine optimierte, personalisierte Therapie stattfinden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Tumorstammzelltheorie liegt die Annahme zu Grunde, dass nur eine kleine Subpopulation von Zellen innerhalb des Tumors, die sogenannten Tumorstammzellen, tumorigenes Potential besitzen. Diese Tumorstammzellen bestimmen die Tumorprogression und -migration sowie die Initiierung neuer Tumoren und schließlich Manifestation lebenslimitierender Metastasen. Gängige Therapeutika greifen proliferierende, aktive Zellen an, sodass Tumorstammzellen in der Seneszenz unbeeinträchtigt bleiben und im Verlauf zu einer Reaktivierung und damit zu einem Tumorrezidiv führen können. Eine bessere Charakterisierung der Tumorstammzellen und ihrer Eigenschaften ist für die Etablierung einer optimalen Therapie unverzichtbar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von Tumorstammzellen in Mammakarzinom-Zelllinien verschiedener Tumorstadien. Hierfür wurden elf kommerziellen Zelllinien (zwei normale Mammazelllinien, neun Mammakarzinom-Zelllinien verschiedener Tumorstadien) mittels statischer Bildzytometrie auf ihren Ploidie-Gehalt und mittels Durchflusszytometrie auf sechs in der Literatur beschriebene Tumorstammzellmarker (CD24, CD29, CD49f, CD44, CD326, CD133) untersucht. Alle Mammakarzinom-Zelllinien zeigten einen aneuploider DNS-Status, während die beiden normalen Mammazelllinien diploid waren. In etablierten Mamma- und Mammakarzinom-Zelllinien ließen sich charakteristische Tumorstammzellmarker nachweisen. Diese waren in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich exprimiert. Für die Oberflächenmarker CD326 und CD44 ließ sich eine höhere Expression in malignen verglichen mit benignen Zelllinien nachweisen, wodurch benigne und maligne Zellen signifikant voneinander abgegrenzt werden konnten ($P = 0,038$ und $P = 0,017$). Die Expression des Oberflächenmarkers CD133 korrelierte mit dem UICC Status der verwendeten Zelllinien, wobei in den höheren UICC Stadien eine stärkere CD133 Expression vorlag. Zudem trennte CD133 zwischen Lymphknotenmetastasen-positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einer hohen und Lymphknotenmetastasen-negativen Mammakarzinom-Zelllinien mit einer niedrigen CD133 Expression ($P = 0,018$). Es konnte die Präsenz von Tumorstammzellen im *in-vitro* Modell der elf hier gewählten, kommerziellen Zelllinien gezeigt werden, sodass zukünftig eine weitere molekulargenetische und zytogenetische Charakterisierung der Tumorstammzellen hieran erfolgen könnte.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Adamczyk, A., Niemiec, J. A., Ambicka, A., Mucha-Małecka, A., Mituś, J., and Ryś, J. 2014. CD44/CD24 as potential prognostic markers in node-positive invasive ductal breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Journal of Molecular Histology* 45, 1, 35–45.
- [2] Ajani, J. A., Song, S., Hochster, H. S., and Steinberg, I. B. 2015. Cancer Stem Cells: The Promise and the Potential. *Seminars in Oncology* 42, 4, S3.
- [3] Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7, 3983–3988.
- [4] Ali, R., Al Zahrani, H., Barhoumi, T., Alhallaj, A., Mashhour, A., Alshammari, M. A., Alshawakir, Y. A., Baz, O., Alanazi, A. H., Khan, A. L., Al Nikhli, H., Al Balwi, M. A., Al Riyees, L., and Boudjelal, M. 2021. Isolation and Establishment of a Highly Proliferative, Cancer Stem Cell-Like, and Naturally Immortalized Triple-Negative Breast Cancer Cell Line, KAIMRC2. *Cells* 10, 6, 1303.
- [5] Alvarez-Elizondo, M. B. and Weihs, D. 2022. Breast cancer stem cells: mechanobiology reveals highly invasive cancer cell subpopulations. *Cellular and Molecular Life Sciences* 79, 3, 7.
- [6] Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.-P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D. G., and Easton, D. F. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics* 72, 5, 1117–1130.
- [7] Aomatsu, N., Yashiro, M., Kashiwagi, S., Takashima, T., Ishikawa, T., Ohsawa, M., Wakasa, K., Hirakawa, K., and Hoque, M. O. 2012. CD133 Is a Useful Surrogate Marker for Predicting Chemosensitivity to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PLoS ONE* 7, 9, e45865.
- [8] Arnold, C. R., Mangesius, J., Skvortsova, I.-I., and Ganswindt, U. 2020. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Frontiers in Oncology*. 10, 1129.
- [9] Auer, G. U., Caspersson, T. O., and Wallgren, A. S. 1980. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology* 2, 3, 161–165.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [10] Babaei, G., Aziz, S. G.-G., and Jaghi, N. Z. Z. 2021. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 133, 14, 110909.
- [11] Babina, I. S., McSherry, E. A., Donatello, S., Hill, A. D. K., and Hopkins, A. M. 2014. A novel mechanism of regulating breast cancer cell migration via palmitoylation-dependent alterations in the lipid raft affiliation of CD44. *Breast Cancer Research* 16, 1, 69.
- [12] Baccelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bauerle, T., Wallwiener, M., Holland-Letz, T., Hofner, T., Sprick, M., Scharpf, M., Marme, F., Sinn, H. P., Pantel, K., Weichert, W., and Trumpp, A. 2013. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology* 31, 6, 539–544.
- [13] Baeuerle, P. A. and Gires, O. 2007. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer* 96, 3, 417–423.
- [14] Bagwell, C. B., Clark, G. M., Spyrtatos, F., Chassevent, A., Bendahl, P. O., Stal, O., Killander, D., Jourdan, M. L., Romain, S., Hunsberger, B., and Baldetorp, B. 2001. Optimizing flow cytometric DNA ploidy and S-phase fraction as independent prognostic markers for node-negative breast cancer specimens. *Cytometry* 46, 3, 121–135.
- [15] Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 7120, 756–760.
- [16] Baumann, P. 2005. CD24 Expression Causes the Acquisition of Multiple Cellular Properties Associated with Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Research* 65, 23, 10783–10793.
- [17] Biesheuvel, C., Weigel, S., and Heindel, W. 2011. Mammography Screening: Evidence, History and Current Practice in Germany and Other European Countries. *Breast Care* 6, 2, 104–109.
- [18] Blandin, A.-F., Renner, G., Lehmann, M., Lelong-Rebel, I., Martin, S., and Dontenwill, M. 2015. β 1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Frontiers in Pharmacology* 6, 157, e0136324.
- [19] Bocker, W. 2002. WHO-Klassifikation der Tumoren der Mamma und des weiblichen Genitale: Pathologie und Genetik. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie* 86, 116–119.
- [20] Bol, M. G. W., Baak, J. P. A., Diermen, B. v., Janssen, E. A. M., Buhr-Wildhagen, S. B. K., and Kjellevoid, K.-H. 2003. Correlation of Grade of Urothelial Cell

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Carcinomas and DNA Histogram Features Assessed by Flow Cytometry and Automated Image Cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 25, 3, 147–153.
- [21] Bonnet, D. and Dick, J. E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 7, 730–737.
- [22] Boo, L., Ho, W. Y., Ali, N. M., Yeap, S. K., Ky, H., Chan, K. G., Yin, W. F., Satharasinghe, D. A., Liew, W. C., Tan, S. W., Ong, H. K., and Cheong, S. K. 2016. MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line. *International Journal of Biological Sciences* 12, 4, 427–445.
- [23] Borovski, T., Sousa E Melo, F. d., Vermeulen, L., and Medema, J. P. 2011. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Research* 71, 3, 634–639.
- [24] Boveri, T. 2008. Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science* 121, Supplement 1, 1–84.
- [25] Bozorgi, A., Khazaei, M., and Khazaei, M. R. 2015. New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. *Journal of Breast Cancer* 18, 4, 303.
- [26] Brakebusch, C. and Fässler, R. 2005. beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer metastasis reviews* 24, 3, 403–411.
- [27] Brown M., W. C. 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8 Pt 2):1221-9.
- [28] Brown, T. C., Sankpal, N. V., and Gillanders, W. E. 2021. Functional Implications of the Dynamic Regulation of EpCAM during Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Biomolecules* 11, 7, 956.
- [29] Brugnoli, F., Grassilli, S., Al-Qassab, Y., Capitani, S., and Bertagnolo, V. 2019. CD133 in Breast Cancer Cells: More than a Stem Cell Marker. *Journal of Oncology* 2019, 12, 1–8.
- [30] Brugnoli, F., Grassilli, S., Piazzini, M., Palomba, M., Nika, E., Bavelloni, A., Capitani, S., and Bertagnolo, V. 2013. In triple negative breast tumor cells, PLC- β 2 promotes the conversion of CD133^{high} to CD133^{low} phenotype and reduces the CD133-related invasiveness. *Molecular Cancer* 12, 1, 165.
- [31] Bünger, S., Barow, M., Thorns, C., Freitag-Wolf, S., Danner, S., Tiede, S., Pries, R., Görg, S., Bruch, H.-P., Roblick, U., Kruse, C., and Habermann, J. 2012. Pancreatic Carcinoma Cell Lines Reflect Frequency and Variability of Cancer Stem Cell Markers in Clinical Tissue. *European Surgical Research* 49, 2, 88–98.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [32] Butti, R., Gunasekaran, V. P., Kumar, T. V., Banerjee, P., and Kundu, G. C. 2019. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 107, 3983-, 38–52.
- [33] Cahu, J., Bustany, S., and Sola, B. 2012. Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death and Disease* 3, 12, e446.
- [34] Calman, K. et al.. 2002. *Improving outcomes in breast cancer: Manual update*. National Institute for Clinical Excellence, London.
- [35] Camarda, R., Zhou, A. Y., Kohnz, R. A., Balakrishnan, S., Mahieu, C., Anderton, B., Eyob, H., Kajimura, S., Tward, A., Krings, G., Nomura, D. K., and Goga, A. 2016. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nature Medicine* 22, 4, 427–432.
- [36] Campbell, L. L. and Polyak, K. 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6, 19, 2332–2338.
- [37] Campeau, P. M., Foulkes, W. D., and Tischkowitz, M. D. 2008. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Human Genetics* 124, 1, 31–42.
- [38] Cárcer, G. d. and Malumbres, M. 2014. A centrosomal route for cancer genome instability. *Nature Cell Biology* 16, 6, 504–506.
- [39] Chaffer, C. L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A. J., Wiggins, P. A., Rodrigues, L. O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L. M., Kuperwasser, C., Bierie, B., and Weinberg, R. A. 2011. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 19, 7950–7955.
- [40] Chang, C., Goel, H. L., Gao, H., Pursell, B., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Ingerpuu, S., Patarroyo, M., Cao, S., Lim, E., Mao, J., McKee, K. K., Yurchenco, P. D., and Mercurio, A. M. 2015. A laminin 511 matrix is regulated by TAZ and functions as the ligand for the $\alpha 6 \beta 1$ integrin to sustain breast cancer stem cells. *Genes and Development* 29, 1, 1–6.
- [41] Chan, K. S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., Gill, H., Presti, J., Chang, H. Y., van de Rijn, M., Shortliffe, L., and Weissman, I. L. 2009. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 33, 14016–14021.
- [42] Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.-H., Diebel, M. E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., and Wicha, M. S. 2009. Breast

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. *Cancer Research* 69, 4, 1302–1313.
- [43] Chaves-Pérez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harréus, U., and Gires, O. 2012. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 32, 5, 641–650.
- [44] Cho, R. W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G. Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J., and Clarke, M. F. 2008. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 2, 364–371.
- [45] Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., and Wahl, G. M. 2006. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research* 66, 19, 9339–9344.
- [46] Cohnheim, J. 1867. Ueber Entzündung und Eiterung. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 40, 1-2, 1–79.
- [47] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2002. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet* 360, 9328, 187–195.
- [48] Cox, D., Brennan, M., and Moran, N. 2010. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 10, 804–820.
- [49] Crowe, D. L., Han, J. S.. 2009. Tumor initiating cancer stem cells from human breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*. 34, 5, 1449–1453
- [50] Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., and Clarke, M. F. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 24, 10158–10163.
- [51] Danielsen, H. E., Pradhan, M., and Novelli, M. 2015. Revisiting tumour aneuploidy — the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nature Reviews Clinical Oncology* 13, 5, 291–304.
- [52] Dan, T., Hewitt, S. M., Ohri, N., Ly, D., Soule, B. P., Smith, S. L., Matsuda, K., Council, C., Shankavaram, U., Lippman, M. E., Mitchell, J. B., Camphausen, K., and Simone, N. L. 2014. CD44 is prognostic for overall survival in the NCI randomized trial on breast conservation with 25 year follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment* 143, 1, 11–18.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [53] Davoli, T., Xu, A. W., Mengwasser, K. E., Sack, L. M., Yoon, J. C., Park, P. J., and Elledge, S. J. 2013. Cumulative Haploinsufficiency and Triplosensitivity Drive Aneuploidy Patterns and Shape the Cancer Genome. *Cell* 155, 4, 948–962.
- [54] Dean, M. 2009. ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *J Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14, 1, 3–9.
- [55] Dick, J. E. 2009. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nature Biotechnology* 27, 1, 44–46.
- [56] Duesberg, P., Fabarius, A., and Hehlmann, R. 2004. Aneuploidy, the Primary Cause of the Multilateral Genomic Instability of Neoplastic and Preneoplastic Cells. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life* 56, 2, 65–81.
- [57] Elston, C. W. and Ellis, I. O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 5, 403–410.
- [58] Eslami-S, Z., Cortés-Hernández, L. E., and Alix-Panabières, C. 2020. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells* 9, 8, 1836.
- [59] Fallenius, A. G., Auer, G. U., and Carstensen, J. M. 1988. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 62, 2, 331–341.
- [60] Fang, X., Cai, Y., Liu, J., Wang, Z., Wu, Q., Zhang, Z., Yang, C. J., Yuan, L., and Ouyang, G. 2011. Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial–mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene* 30, 47, 4707–4720.
- [61] Fang, X., Zheng, P., Tang, J., and Liu, Y. 2010. CD24: from A to Z. *Cellular and Molecular Immunology* 7, 2, 100–103.
- [62] Fillmore, C. M. and Kuperwasser, C. 2008. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research* 10, 2, R25.
- [63] Fortunel, N. O. 2003. Comment on " 'Stemness': Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells" and "A Stem Cell Molecular Signature" (I). *Science* 302, 5644, 393b–393.
- [64] Gao, J., Liu, X., Yang, F., Liu, T., Yan, Q., and Yang, X. 2015. By inhibiting Ras/Raf/ERK and MMP-9, knockdown of EpCAM inhibits breast cancer cell growth and metastasis. *Oncotarget* 6, 29, 27187–27198.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [65] Gao, M.-Q., Choi, Y.-P., Kang, S., Youn, J. H., and Cho, N.-H. 2010. CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* 29, 18, 2672–2680.
- [66] Gastl, G., Spizzo, G., Obrist, P., Dünser, M., and Mikuz, G. 2000. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *The Lancet* 356, 9246, 1981–1982.
- [67] Gemoll, T., Auer, G., Ried, T., and Habermann, J. K. 2015. Genetic Instability and Disease Prognostication. In *Chromosomal Instability in Cancer Cells*, B. M. Ghadimi and T. Ried, Eds. Recent Results in Cancer Research. Springer International Publishing, Cham, 81–94.
- [68] Ghebeh, H., Sleiman, G. M., Manogaran, P. S., Al-Mazrou, A., Barhoush, E., Al-Mohanna, F. H., Tulbah, A., Al-Faqeeh, K., and Adra, C. N. 2013. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44^{high}/CD24^{low} phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. *BMC Cancer* 13, 1, 4320.
- [69] Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M., and Baeuerle, P. A. 2020. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer and Metastasis Reviews* 39, 3, 969–987.
- [70] Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. 2011. 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. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22, 8, 1736–1747.
- [71] Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Molecular pathology: MP* 52, 4, 189–196.
- [72] Gorges, T. M., Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, T. M., Krahn, T., and Ahsen, O. v. 2012. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 12, 1, 178.
- [73] Greaves, M. and Maley, C. C. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 7381, 306–313.
- [74] Grimshaw, M. J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J. A., Bohnenkamp, H. R., Chiapero-Stanke, L., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J. M. 2008. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 10, 3, 151.
- [75] Habermann, J. K., Doering, J., Hautaniemi, S., Roblick, U. J., Bündgen, N. K., Nicorici, D., Kronenwett, U., Rathnagiriswaran, S., Mettu, R. K. R., Ma, Y., Krüger, S., Bruch, H.-P., Auer, G., Guo, N. L., and Ried, T. 2009. The gene

7. LITERATURVERZEICHNIS

- expression signature of genomic instability in breast cancer is an independent predictor of clinical outcome. *International Journal of Cancer* 124, 7, 1552–1564.
- [76] Hachmeister, M., Bobowski, K. D., Hognl, S., Dislich, B., Fukumori, A., Eggert, C., Mack, B., Kremling, H., Sarrach, S., Coscia, F., Zimmermann, W., Steiner, H., Lichtenthaler, S. F., Gires, O., and St-Pierre, Y. 2013. Regulated Intramembrane Proteolysis and Degradation of Murine Epithelial Cell Adhesion Molecule mEpCAM. *PLoS ONE* 8, 8, e71836.
- [77] Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., and Syahir, A. 2021. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules* 11, 12, 1850.
- [78] Hefni, A. M., Sayed, A. M., Hussien, M. T., Abdalla, A. Z., and Gabr, A. G. 2022. CD133 is an independent predictive and prognostic marker in metastatic breast cancer. *Cancer Biomarkers* 35, 2, 207–215.
- [79] Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H. I. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 25, 15178–15183.
- [80] Hiraga, T., Ito, S., and Nakamura, H. 2016. EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. *International Journal of Cancer* 138, 7, 1698–1708.
- [81] Holliday, D. L. and Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 13, 4, 264.
- [82] Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J. M., Dumont-Cole, V. D., Kramer, K., Wexler, L. H., Narendran, A., Schwartz, G. K., Healey, J. H., Sandstrom, P., Jørgen Labori, K., Kure, E. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Sousa, M. de, Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Brady, M. S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A. J., Bissell, M. J., Garcia, B. A., Kang, Y., Rajasekhar, V. K., Ghajar, C. M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., and Lyden, D. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 7578, 329–335.
- [83] Huang, H.-P., Chen, P.-H., Yu, C.-Y., Chuang, C.-Y., Stone, L., Hsiao, W.-C., Li, C.-L., Tsai, S.-C., Chen, K.-Y., Chen, H.-F., Ho, H.-N., and Kuo, H.-C. 2011. Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) Complex Proteins Promote Transcription Factor-mediated Pluripotency Reprogramming. *Journal of Biological Chemistry* 286, 38, 33520–33532.
- [84] Huntly, B. J. P., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B. H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I. R., Akashi, K., and Gilliland, D. G.

7. LITERATURVERZEICHNIS

2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer cell* 6, 6, 587–596.
- [85] Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 1, 11–25.
- [86] Ibragimova, M., Tsyganov, M., and Litviakov, N. 2022. Tumour Stem Cells in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 9, 5058.
- [87] Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E., Dylla, S. J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J. L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M. G., Keating, A., Sawyers, C. L., and Weissman, I. L. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *The New England journal of medicine* 351, 7, 657–667.
- [88] Janssen, A., van der Burg, M., Szuhai, K., Kops, G. J. P. L., and Medema, R. H. 2011. Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations. *Science* 333, 6051, 1895–1898.
- [89] Joseph, C., Arshad, M., Kurozomi, S., Althobiti, M., Miligy, I. M., Al-izzi, S., Toss, M. S., Goh, F. Q., Johnston, S. J., Martin, S. G., Ellis, I. O., Mongan, N. P., Green, A. R., and Rakha, E. A. 2019. Overexpression of the cancer stem cell marker CD133 confers a poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 174, 2, 387–399.
- [90] Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., and Wolf, U. 2015. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012*. Gesundheitsberichterstattung für Deutschland, Berlin.
- [91] Kalluri, R. and Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119, 6, 1420–1428.
- [92] Nandi, A., and Chakrabarti, R. 2022. Assessment of Breast Cancer Stem Cell Activity Using a Spheroid Formation Assay. *Methods in Molecular Biology* 2429, 485–500.
- [93] Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.-L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K. A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Pollack, J. R., and Blagosklonny, M. V. 2009. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS ONE* 4, 7, e6146.
- [94] Karra, H., Pitkänen, R., Nykänen, M., Talvinen, K., Kuopio, T., Söderström, M., and Kronqvist, P. 2012. Securin predicts aneuploidy and survival in breast cancer. *Histopathology* 60, 4, 586–596.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [95] Karran, L., Jones, M., Morley, G., van Noorden, S., Smith, P., Lampert, I., and Griffin, B. E. 1995. Expression of a B-cell marker, CD24, on nasopharyngeal carcinoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 60, 4, 562–566.
- [96] Kemper, K., Grandela, C., and Medema, J. P. 2010. Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget* 1, 6, 387–395.
- [97] Key, T. J., Verkasalo, P. K., and Banks, E. 2001. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology* 2, 3, 133–140.
- [98] Kim, S. J., Kim, Y. S., Jang, E. D., Seo, K. J., and Kim, J. S. 2015. Prognostic Impact and Clinicopathological Correlation of CD133 and ALDH1 Expression in Invasive Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer* 18, 4, 347.
- [99] King, R. W. 2008. When $2+2=5$: The origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1786, 1, 4–14.
- [100] Kinugasa, Y., Matsui, T., and Takakura, N. 2014. CD44 Expressed on Cancer-Associated Fibroblasts Is a Functional Molecule Supporting the Stemness and Drug Resistance of Malignant Cancer Cells in the Tumor Microenvironment. *Stem Cells* 32, 1, 145–156.
- [101] Kreienberg, R., Albert, U.-S., Follmann, M., Kopp, I., Kühn, T., and Wöckel, A. 2013. Interdisciplinary GoR level III Guidelines for the Diagnosis, Therapy and Follow-up Care of Breast Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 73, 06, 556–583.
- [102] Kristiansen, G., Denkert, C., Schlüns, K., Dahl, E., Pilarsky, C., and Hauptmann, S. 2002. CD24 Is Expressed in Ovarian Cancer and Is a New Independent Prognostic Marker of Patient Survival. *The American Journal of Pathology* 161, 4, 1215–1221.
- [103] Kristiansen, G., Schlüns, K., Yongwei, Y., Denkert, C., Dietel, M., and Petersen, I. 2003. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *British Journal of Cancer* 88, 2, 231–236.
- [104] Kristiansen, G., Winzer, K.-J., Mayordomo, E., Bellach, J., Schlüns, K., Denkert, C., Dahl, E., Pilarsky, C., Altevogt, P., Guski, H., and Dietel, M. 2003. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 13, 4906–4913.
- [105] Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J. E., Wang, J., Hahn, W. C., Gilliland, D. G., Golub, T. R., and Armstrong, S. A. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 7104, 818–822.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [106] Kronenwett, U. 2006. Genomic Instability and Prognosis in Breast Carcinomas. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15, 9, 1630–1635.
- [107] Kronenwett, U., Huwendiek, S., Ostring, C., Portwood, N., Roblick, U. J., Pawitan, Y., Alaiya, A., Sennerstam, R., Zetterberg, A., and Auer, G. 2004. Improved grading of breast adenocarcinomas based on genomic instability. *Cancer Research* 64, 3, 904–909.
- [108] Kryczek, I., Liu, S., Roh, M., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Banerjee, M., Mao, Y., Kotarski, J., Wicha, M. S., Liu, R., and Zou, W. 2012. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *International Journal of Cancer* 130, 1, 29–39.
- [109] Lanigan, D., McLean, P. A., Curran, B., and Leader, M. 1993. Comparison of flow and static image cytometry in the determination of ploidy. *Journal of clinical pathology* 46, 2, 135–139.
- [110] Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 6464, 645–648.
- [111] Latorre, E., Carelli, S., Raimondi, I., D'Agostino, V., Castiglioni, I., Zucal, C., Moro, G., Luciani, A., Ghilardi, G., Monti, E., Inga, A., Di Giulio, A. M., Gorio, A., and Provenzani, A. 2016. The Ribonucleic Complex HuR-MALAT1 Represses CD133 Expression and Suppresses Epithelial–Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Research* 76, 9, 2626–2636.
- [112] Lee, A. V., Oesterreich, S., and Davidson, N. E. 2015. MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 107, 7, djv073.
- [113] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*, Version 4.4, 2021. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom> (Zugriff am 30.01.2023).
- [114] Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., and Simeone, D. M. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research* 67, 3, 1030–1037.
- [115] Li, L. and Neaves, W. B. 2006. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Research* 66, 9, 4553–4557.
- [116] Liu, J., Ma, L., Xu, J., Liu, C., Zhang, J., Liu, J. I., Chen, R., and Zhou, Y. 2013. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *International Journal of Oncology* 42, 2, 453–459.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [117] Liu, S., Dontu, G., and Wicha, M. S. 2005. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 7, 3, 86.
- [118] Liu, T. J., Sun, B. C., Zhao, X. L., Zhao, X. M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X. Y., Zhao, N., and Liu, N. 2013. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 32, 5, 544–553.
- [119] Liu, T., Hu, K., Zhao, Z., Chen, G., Ou, X., Zhang, H., Zhang, X., Wei, X., Wang, D., Cui, M., and Liu, C. 2015. MicroRNA-1 down-regulates proliferation and migration of breast cancer stem cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* 6, 39, 41638–41649.
- [120] Lobb, R. R. and Hemler, M. E. 1994. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 94, 5, 1722–1728.
- [121] López, J., Poitevin, A., Mendoza-Martínez, V., Pérez-Plasencia, C., and García-Carrancá, A. 2012. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 12, 1, 2893.
- [122] Losada, A. 2014. Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nature Reviews Cancer* 14, 6, 389–393.
- [123] Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P. A., Munz, M., and Gires, O. 2009. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology* 11, 2, 162–171.
- [124] Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., and Huelsken, J. 2012. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481, 7379, 85–89.
- [125] Martowicz, A., Rainer, J., Lelong, J., Spizzo, G., Gastl, G., and Untergasser, G. 2013. EpCAM overexpression prolongs proliferative capacity of primary human breast epithelial cells and supports hyperplastic growth. *Molecular Cancer* 12, 1, 56.
- [126] McFarlane, S., Coulter, J. A., Tibbits, P., O'Grady, A., McFarlane, C., Montgomery, N., Hill, A., McCarthy, H. O., Young, L. S., Kay, E. W., Isacke, C. M., and Waugh, D. J. 2015. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget* 6, 13, 11465–11476.
- [127] Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., and Maley, C. C. 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer* 6, 12, 924–935.
- [128] Meyer, M. J., Fleming, J. M., Lin, A. F., Hussnain, S. A., Ginsburg, E., and Vonderhaar, B. K. 2010. CD44posCD49fhiCD133/2hi Defines Xenograft-Initiating

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Cells in Estrogen Receptor–Negative Breast Cancer. *Cancer Research* 70, 11, 4624–4633.
- [129] Montgomery, N., Hill, A., McFarlane, S., Neisen, J., O'Grady, A., Conlon, S., Jirstrom, K., Kay, E. W., and Waugh, D. J. J. 2012. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Research* 14, 3, 10869.
- [130] Moureau-Zabotto, L., Bouchet, C., Cesari, D., Uzan, S., Lefranc, J.-P., Antoine, M., Genestie, C., Deniaud-Alexandre, E., Bernaudin, J.-F., Touboul, E., and Fleury-Feith, J. 2005. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 91, 1, 61–71.
- [131] Mulholland, D. J., Xin, L., Morim, A., Lawson, D., Witte, O., and Wu, H. 2009. Lin-Sca-1+CD49^{high} Stem/Progenitors Are Tumor-Initiating Cells in the Pten-Null Prostate Cancer Model. *Cancer Research* 69, 22, 8555–8562.
- [132] Nadal, R., Ortega, F. G., Salido, M., Lorente, J. A., Rodríguez-Rivera, M., Delgado-Rodríguez, M., Macià, M., Fernández, A., Corominas, J. M., García-Puche, J. L., Sánchez-Rovira, P., Solé, F., and Serrano, M. J. 2013. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: Potential role in resistance to chemotherapy. *International Journal of Cancer* 133, 10, 2398–2407.
- [133] National Breast Cancer Centre. 2006. *Evidence Relevant to Guidelines for the Investigation of Breast Symptoms*, Camperdown, NSW.
- [134] Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W.-L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., and Gray, J. W. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* 10, 6, 515–527.
- [135] Nigg, E. A. 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature Reviews Genetics* 3, 10, 815.
- [136] Niu, N. and Wang, L. 2015. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics* 16, 3, 273–285.
- [137] Nowell, P. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 4260, 23–28.
- [138] Nunez, R. 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current issues in molecular biology* 3, 3, 67–70.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [139] O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. 2006. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 7123, 106–110.
- [140] Ono, Y. J., Tanabe, A., Tanaka, T., Tanaka, Y., Hayashi, M., Terai, Y., and Ohmichi, M. 2015. Met Signaling Cascade Is Amplified by the Recruitment of Phosphorylated Met to Lipid Rafts via CD24 and Leads to Drug Resistance in Endometrial Cancer Cell Lines. *Molecular Cancer Therapeutics* 14, 10, 2353–2363.
- [141] Paolillo, Colombo, Serra, Belvisi, Papetti, Ciusani, Comincini, and Schinelli. 2019. Stem-like Cancer Cells in a Dynamic 3D Culture System: A Model to Study Metastatic Cell Adhesion and Anti-cancer Drugs. *Cells* 8, 11, 1434.
- [142] Park, S. Y., Lee, H. E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R., and Polyak, K. 2010. Heterogeneity for Stem Cell-Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3, 876–887.
- [143] Pattabiraman, D. R. and Weinberg, R. A. 2014. Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 7, 497–512.
- [144] Pearce, D. J., Taussig, D., Simpson, C., Allen, K., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A., and Bonnet, D. 2005. Characterization of Cells with a High Aldehyde Dehydrogenase Activity from Cord Blood and Acute Myeloid Leukemia Samples. *Stem Cells* 23, 6, 752–760.
- [145] Perry, N., Broeders, M., Wolf, C. d., Törnberg, S., Holland, R., and Karsa, L. v. 2008. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition--summary document. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19, 4, 614–622.
- [146] Pershina, O., Ermakova, N., Pakhomova, A., Widera, D., Pan, E., Zhukova, M., Slonimskaya, E., Morozov, S. G., Kubatiev, A., Dygai, A., and Skurikhin, E. G. 2021. Cancer Stem Cells and Somatic Stem Cells as Potential New Drug Targets, Prognosis Markers, and Therapy Efficacy Predictors in Breast Cancer Treatment. *Biomedicines* 9, 9, 1223.
- [147] Phillips, T. M., McBride, W. H., and Pajonk, F. 2006. The Response of CD24-/low/CD44+ Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 24, 1777–1785.
- [148] Pike, M. C., Spicer, D. V., Dahmouh, L., and Press, M. F. 1993. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiologic reviews* 15, 1, 17–35.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [149] Pinto, A. E., Pereira, T., Silva, G. L., and André, S. 2015. Aneuploidy identifies subsets of patients with poor clinical outcome in grade 1 and grade 2 breast cancer. *The Breast* 24, 4, 449–455.
- [150] Pinto, A., nio E., André, Saudade, Pereira, T., Silva, G., and Soares, J. 2006. DNA Flow Cytometry but Not Telomerase Activity as Predictor of Disease-Free Survival in pT1–2/N0/G2 Breast Cancer. *Pathobiology* 73, 2, 63–70.
- [151] Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. 2003. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 1, 33–45.
- [152] Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., and Ailles, L. E. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3, 973–978.
- [153] Qiao, X., Zhang, Y., Sun, L., Ma, Q., Yang, J., Ai, L., Xue, J., Chen, G., Zhang, H., Ji, C., Gu, X., Lei, H., Yang, Y., and Liu, C. 2021. Association of human breast cancer CD44-/CD24- cells with delayed distant metastasis. *eLife* 10, 1154.
- [154] Rangarajan, A. and Weinberg, R. A. 2003. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews Cancer* 3, 12, 952–959.
- [155] Rangel, M. C., Bertolette, D., Castro, N. P., Klauzinska, M., Cuttitta, F., and Salomon, D. S. 2016. Developmental signaling pathways regulating mammary stem cells and contributing to the etiology of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 156, 2, 211–226.
- [156] Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 6859, 105–111.
- [157] Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and Maria, R. d. 2006. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 7123, 111–115.
- [158] Roosta, Y., Sanaat, Z., Nikanfar, A. R., Dolatkhah, R., and Fakhrjou, A. 2020. Predictive Value of CD44 for Prognosis in Patients with Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 21, 9, 2561–2567.
- [159] Ross, J. S., Linette, G. P., Stec, J., Ross, M. S., Anwar, S., and Boguniewicz, A. 2003. DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis in Breast Cancer. *Pathology Patterns Reviews* 120, 1, 72–84.
- [160] Russo, J., Hu, Y. F., Yang, X., and Russo, I. H. 2000. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 27, 17–37.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [161] Sansone, P., Ceccarelli, C., Berishaj, M., Chang, Q., Rajasekhar, V. K., Perna, F., Bowman, R. L., Vidone, M., Daly, L., Nnoli, J., Santini, D., Taffurelli, M., Shih, N. N. C., Feldman, M., Mao, J. J., Colameco, C., Chen, J., DeMichele, A., Fabbri, N., Healey, J. H., Cricca, M., Gasparre, G., Lyden, D., Bonafé, M., and Bromberg, J. 2016. Self-renewal of CD133hi cells by IL6/Notch3 signalling regulates endocrine resistance in metastatic breast cancer. *Nature Communications* 7, 1, 3983.
- [162] Schnell, U., Cirulli, V., and Giepmans, B. N. 2013. EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 8, 1989–2001.
- [163] Schnell, U., Kuipers, J., and Giepmans, B. N. G. 2013. EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Bioscience Reports* 33, 2, 314.
- [164] Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., and Morrison, S. J. 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 5, 822–829.
- [165] Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G. J., and Visvader, J. E. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 7072, 84–88.
- [166] Shan, N. L., Shin, Y., Yang, G., Furmanski, P., and Suh, N. 2021. Breast cancer stem cells: A review of their characteristics and the agents that affect them. *Molecular Carcinogenesis* 60, 2, 73–100.
- [167] Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., Goulet, R., Badve, S., and Nakshatri, H. 2006. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research* 8, 5, R59.
- [168] Shi, C., Tian, R., Wang, M., Wang, X., Jiang, J., Zhang, Z., Li, X., He, Z., Gong, W., and Qin, R. 2010. CD44+ CD133+ population exhibits cancer stem cell-like characteristics in human gallbladder carcinoma. *Cancer Biology and Therapy* 10, 11, 1182–1190.
- [169] Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., Halushka, M. K., Sukumar, S., Parker, L. M., Anderson, K. S., Harris, L. N., Garber, J. E., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Nikolsky, Y., Gelman, R. S., and Polyak, K. 2007. Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer cell* 11, 3, 259–273.
- [170] Shmelkov, S. V., St.Clair, R., Lyden, D., and Rafii, S. 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 4, 715–719.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [171] Siclari, V. A. and Qin, L. 2010. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 5, 1, 78.
- [172] Simon, M., Stefan, N., Borsig, L., Pluckthun, A., and Zangemeister-Wittke, U. 2014. Increasing the Antitumor Effect of an EpCAM-Targeting Fusion Toxin by Facile Click PEGylation. *Molecular Cancer Therapeutics* 13, 2, 375–385.
- [173] Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research* 63, 18, 5821–5828.
- [174] Smith, S. C. 2006. The Metastasis-Associated Gene CD24 Is Regulated by Ral GTPase and Is a Mediator of Cell Proliferation and Survival in Human Cancer. *Cancer Research* 66, 4, 1917–1922.
- [175] Soysal, S. D., Muenst, S., Barbie, T., Fleming, T., Gao, F., Spizzo, G., Oertli, D., Viehl, C. T., Obermann, E. C., and Gillanders, W. E. 2013. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2+, basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *British Journal of Cancer* 108, 7, 1480–1487.
- [176] Statistisches Bundesamt (Destatis). 2021. Die zehn häufigsten Todesfälle durch Krebs, Sterbefälle durch Krebs insgesamt 2021. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html> (Zugriff am 30.01.2023).
- [177] Stingl, J. and Caldas, C. 2007. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 7, 10, 791–799.
- [178] Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H. I., and Eaves, C. J. 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*. 439, 7079, 993–997.
- [179] Swaminathan, S. K., Roger, E., Toti, U., Niu, L., Ohlfest, J. R., and Panyam, J. 2013. CD133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer. *Journal of Controlled Release* 171, 3, 280–287.
- [180] Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S. A., Shimada, Y., and Wang, T. C. 2009. Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. *Stem Cells* 27, 5, 1006–1020.
- [181] Takebe, N., Miele, L., Harris, P. J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., Yang, S. X., and Ivy, S. P. 2015. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nature Reviews Clinical Oncology* 12, 8, 445–464.
- [182] Tang, D. G. 2012. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research* 22, 3, 457–472.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [183] Taurin, S. and Alkhalifa, H. 2020. Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses. *Neoplasia* 22, 12, 663–678.
- [184] The Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 7418, 61–70.
- [185] Thiery, J. P. 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2, 6, 442–454.
- [186] Todaro, M., Turdo, A., Bartucci, M., Iovino, F., Dattilo, R., Biffoni, M., Stassi, G., Federici, G., Maria, R. d., and Zeuner, A. 2013. Erythropoietin Activates Cell Survival Pathways in Breast Cancer Stem-like Cells to Protect Them from Chemotherapy. *Cancer Research* 73, 21, 6393–6400.
- [187] To, K., Fotovati, A., Reipas, K. M., Law, J. H., Hu, K., Wang, J., Astanehe, A., Davies, A. H., Lee, L., Stratford, A. L., Raouf, A., Johnson, P., Berquin, I. M., Royer, H. D., Eaves, C. J., and Dunn, S. E. 2010. Y-Box Binding Protein-1 Induces the Expression of CD44 and CD49f Leading to Enhanced Self-Renewal, Mammosphere Growth, and Drug Resistance. *Cancer Research* 70, 7, 2840–2851.
- [188] Tomasetti, C. and Vogelstein, B. 2015. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347, 6217, 78–81.
- [189] Tsuneki, M. and Madri, J. A. 2014. CD44 Regulation of Endothelial Cell Proliferation and Apoptosis via Modulation of CD31 and VE-cadherin Expression. *Journal of Biological Chemistry* 289, 9, 5357–5370.
- [191] Valent, P., Bonnet, D., Maria, R. d., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J. J., Stassi, G., Huntly, B., Herrmann, H., Soulier, J., Roesch, A., Schuurhuis, G. J., Wöhrer, S., Arock, M., Zuber, J., Cerny-Reiterer, S., Johnsen, H. E., Andreeff, M., and Eaves, C. 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer* 12, 11, 767–775.
- [192] Vargo-Gogola, T. and Rosen, J. M. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer* 7, 9, 659–672.
- [193] Vassilopoulos, A., Chisholm, C., Lahusen, T., Zheng, H., and Deng, C.-X. 2013. A critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brca1-associated mouse model of breast cancer. *Oncogene* 33, 47, 5477–5482.
- [194] Vassilopoulos, A., Wang, R.-H., Petrovas, C., Ambrozak, D., Koup, R., and Deng, C.-X. 2008. Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells. *International journal of biological sciences* 4, 3, 133–142.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [195] Vazin, T. and Freed, W. J. 2010. Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restorative Neurology and Neuroscience* 28, 4, 589–603.
- [196] Vincent, K. M., Findlay, S. D., and Postovit, L. M. 2015. Assessing breast cancer cell lines as tumour models by comparison of mRNA expression profiles. *Breast Cancer Research* 17, 1, 249.
- [197] Visvader, J. E. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 7330, 314–322.
- [198] Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer* 8, 10, 755–768.
- [199] Walcher, L., Kistenmacher, A.-K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blaudszun, A.-R., Yevsa, T., Fricke, S., and Kossatz-Boehlert, U. 2020. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology* 11, 394.
- [200] Wei, H., Fu, P., Yao, M., Chen, Y., and Du, L. 2016. Breast cancer stem cells phenotype and plasma cell-predominant breast cancer independently indicate poor survival. *Pathology - Research and Practice* 212, 4, 294–301.
- [201] Weiswald, L.-B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. 2015. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* 17, 1, 1–15.
- [202] Wicha, M. S., Liu, S., and Dontu, G. 2006. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Research* 66, 4, 1883–90; discussion 1895–6.
- [203] Wright, M. H., Calcagno, A., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V., and Varticovski, L. 2008. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Research* 10, 1, R10.
- [204] Xu, Y., Zhang, H., Lit, L. C., Grothey, A., Athanasiadou, M., Kiritsi, M., Lombardo, Y., Frampton, A. E., Green, A. R., Ellis, I. O., Ali, S., Lenz, H.-J., Thanou, M., Stebbing, J., and Giamas, G. 2014. The Kinase LMTK3 Promotes Invasion in Breast Cancer Through GRB2-Mediated Induction of Integrin β 1. *Science Signaling* 7, 330, 83.
- [205] Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., and Wang, X. W. 2007. Activation of Hepatic Stem Cell Marker EpCAM by Wnt -Catenin Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 67, 22, 10831–10839.
- [206] Yang, C., Cao, M., Liu, Y., He, Y., Du, Y., Zhang, G., and Gao, F. 2019. Inducible formation of leader cells driven by CD44 switching gives rise to collective invasion and metastases in luminal breast carcinomas. *Oncogene* 38, 46, 7113–7132.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [207] Yang, C.-H., Wang, H.-L., Lin, Y.-S., Kumar, K. P. S., Lin, H.-C., Chang, C.-J., Lu, C.-C., Huang, T.-T., Martel, J., Ojcius, D. M., Chang, Y.-S., Young, J. D., Lai, H.-C., and Seno, M. 2014. Identification of CD24 as a Cancer Stem Cell Marker in Human Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS ONE* 9, 6, e99412.
- [208] Yang, X.-R., Xu, Y., Yu, B., Zhou, J., Li, J.-C., Qiu, S.-J., Shi, Y.-H., Wang, X.-Y., Dai, Z., Shi, G.-M., Wu, B., Wu, L.-M., Yang, G.-H., Zhang, B.-H., Qin, W.-X., and Fan, J. 2009. CD24 Is a Novel Predictor for Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma after Surgery. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 17, 5518–5527.
- [209] Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Lau, C. K., Yu, W. C., Ngai, P., Chu, P. W., Lam, C. T., Poon, R. T., and Fan, S. T. 2008. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer cell* 13, 2, 153–166.
- [210] Ye, F., Qiu, Y., Li, L., Yang, L., Cheng, F., Zhang, H., Wei, B., Zhang, Z., Sun, L., and Bu, H. 2015. The Presence of EpCAM - /CD49f + Cells in Breast Cancer Is Associated with a Poor Clinical Outcome. *Journal of Breast Cancer* 18, 3, 242.
- [211] Yildirim-Assaf, S., Coumbos, A., Hopfenmuller, W., Foss, H.-D., Stein, H., and Kuhn, W. 2007. The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer. *Journal of clinical pathology* 60, 6, 649–655.
- [212] Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D. W. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 12, 5002–5012.
- [213] Yin, H., Xiong, G., Guo, S., Xu, C., Xu, R., Guo, P., and Shu, D. 2019. Delivery of Anti-miRNA for Triple-Negative Breast Cancer Therapy Using RNA Nanoparticles Targeting Stem Cell Marker CD133. *Molecular Therapy* 27, 7, 1252–1261.
- [214] Zeilstra, J., Joosten, S. P., Dokter, M., Verwiel, E., Spaargaren, M., and Pals, S. T. 2008. Deletion of the WNT Target and Cancer Stem Cell Marker CD44 in Apc(Min/+) Mice Attenuates Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Research* 68, 10, 3655–3661.
- [215] Zekri, A.-R. N., Bahnassy, A., Mourad, M., Malash, I., Ahmed, O., and Abdellateif, M. S. 2022. Genetic profiling of different phenotypic subsets of breast cancer stem cells (BCSCs) in breast cancer patients. *Cancer Cell International* 22, 1, 10.
- [216] Zeng, L., Deng, X., Zhong, J., Yuan, L., Tao, X., Zhang, S., Zeng, Y., He, G., Tan, P., and Tao, Y. 2019. Prognostic value of biomarkers EpCAM and α B-crystallin associated with lymphatic metastasis in breast cancer by iTRAQ analysis. *BMC Cancer* 19, 1, 87.

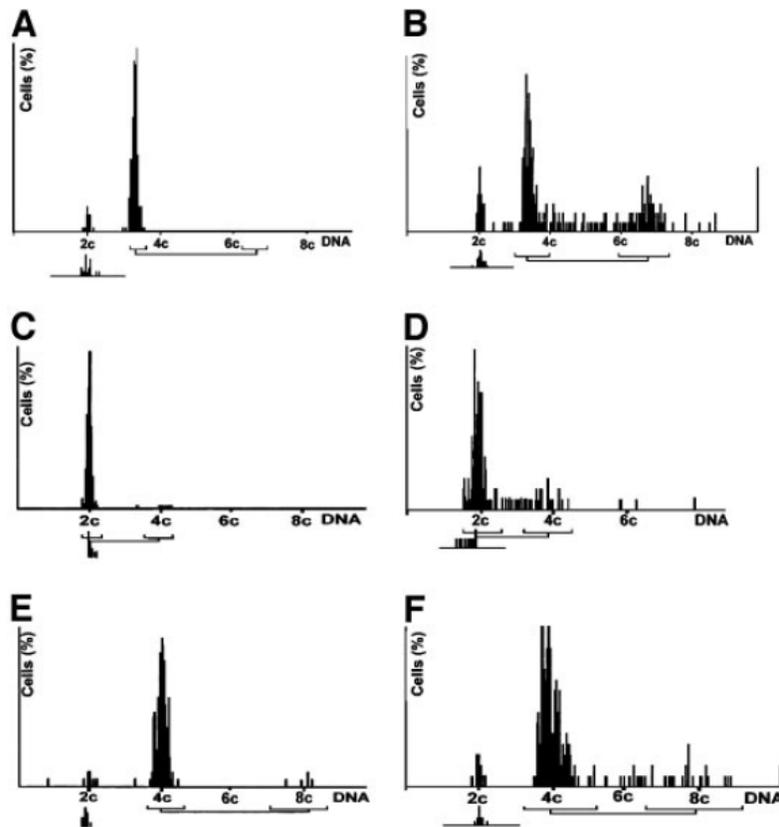
7. LITERATURVERZEICHNIS

- [217] Zeng, X., Liu, C., Yao, J., Wan, H., Wan, G., Li, Y., and Chen, N. 2021. Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. *Pharmacological Research* 163, 4, 105320.
- [218] Zhang, M., Behbod, F., Atkinson, R. L., Landis, M. D., Kittrell, F., Edwards, D., Medina, D., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S., Green, J. E., Michalowska, A. M., and Rosen, J. M. 2008. Identification of Tumor-Initiating Cells in a p53-Null Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Research* 68, 12, 4674–4682.
- [219] Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J. M., Yan, P. S., Huang, T. H.-M., and Nephew, K. P. 2008. Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Research* 68, 11, 4311–4320.
- [220] Zhang, Y., Xie, X., Yeganeh, P. N., Lee, D.-J., Valle-Garcia, D., Meza-Sosa, K. F., Junqueira, C., Su, J., Luo, H. R., Hide, W., and Lieberman, J. 2021. Immunotherapy for breast cancer using EpCAM aptamer tumor-targeted gene knockdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118, 9, 5039.

8. ANHANG

8.1 Abbildungen

8.1.1 Interpretation der DNS-Histogramme anhand der genomischen Instabilität



1) Abbildung A1: Interpretation der DNS-Histogramme anhand der genomischen Instabilität nach Kronenwett (2004).

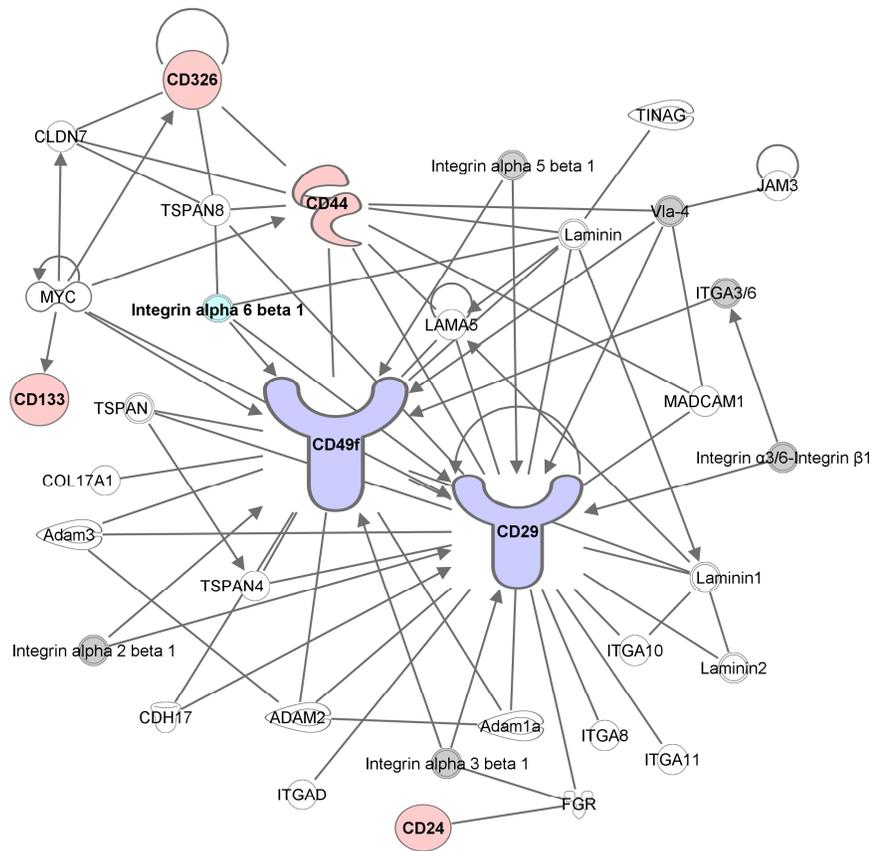
Zellkern-DNS-Gehalt der Zellen ist auf der horizontalen Achse aufgetragen und normiert auf den nukleären DNS-Gehalt von Leukozyten. (2c bezeichnet einen diploiden DNS-Gehalt).

A: tetraploid, genomisch stabil; B: tetraploid, genomisch instabil; C: diploid, genomisch stabil; D: diploid, genomisch instabil; E: aneuploid, genomisch stabil; F: aneuploid, genomisch instabil.

8. ANHANG

8.1.2 IPA (Ingenuity Pathway Analysis)

Path Designer Network 1



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.



2) **Abbildung A2:** Pathway Analyse mittels IPA (Ingenuity Pathway Analyses) der analysierten Tumorstammzellmarkern zur Detektion assoziierter Signalwege.

8. ANHANG

8.2 Tabellen

8.2.1 TNM-Klassifikation

1) Tabelle A1: TNM-Klassifikation für Brustkrebs

T Tumorgröße		N Befallene Lymphknoten		M (Fern-) Metastasen	
T0	kein Tumor nachweisbar	N0	keine	M0	keine nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ, nicht invasiv	N1	1–3 in der Achsel	M1	nachweisbar (meist Lunge, Leber, Knochen)
T1	bis 2 cm	N2	4–9 in der Achsel		
T1mic	Mikroinvasion bis 0,1 cm	N3	10 oder mehr in der Achsel oder unter/über dem Schlüsselbein		
T1a	< 0,5 cm				
T1b	> 0,5 cm bis 1 cm				
T1c	> 1 cm bis 2 cm				
T2	> 2 cm bis 5 cm				
T3	> als 5 cm				
T4	jede Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut				

8.2.2 Stadiengruppierung nach UICC bzw. AJCC

2) Tabelle A2: Stadiengruppierung nach UICC bzw. AJCC

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0,T1,T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

8.3 Protokolle der Färbungen

8.3.1 Feulgen-Färbung

Feulgen - Färbung

!!! Pararosanilin ist eine stark kanzerogene Substanz - direkten Kontakt meiden !!!

1. TAG: → Ansetzen des Schiff's Reagenz:

- 1) 150ml 1M HCL (Raumtemperatur) in eine 2 Liter Flasche mit dunklem Glas einfüllen. Dazu 5g Pararosanilin (Basic Fuchsin, Aldrich, 85,734-3) geben, die Flasche leicht schütteln, bis Pulver gelöst erscheint
- 2) dann eine Lösung aus 5g Kaliumpyrosulfit ($K_2S_2O_5$) und 850ml Aqua dest. hinzufügen, die Flasche wiederum leicht schütteln
- 3) erscheint die Lösung nun rot gefärbt zu sein, Flasche in Alufolie einpacken und im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen

2. TAG:

- 1) Alufolie entfernen, der angesetzten Lösung 3g Aktivkohle hinzufügen und die Flasche mindestens 4 Minuten gut schütteln
- 2) Die Lösung 2* filtrieren, zuletzt in eine 1 Literflasche mit weißem Glas
- 3) Ist die Lösung zuletzt rosafarben transparent, wurde das Schiff's Reagenz richtig angesetzt: Flasche gut in Alufolie einpacken und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahren

!!! Diese Lösung ist verwendbar bis zu maximal 3 Tagen, danach Ausfällung des Farbstoffs → DNS-Zytometrie ist danach nicht mehr möglich !!!

- 4) Zytospins über Nacht bei Raumtemperatur in 4% Formaldehyd

3. TAG: → Feulgen Färbung

- 1) Spülen: Präparate vorsichtig in Leitungswasser spülen, bis Küvetten keinen Formaldehyd-Geruch mehr abgeben
- 2) Saure Hydrolyse: in 5 M HCL für 60 Minuten bei Raumtemperatur
- 3) Spülen: dreimal vorsichtig in Aqua dest. spülen
- 4) Schiff's Reagenz: Inkubation für 120 Minuten in neu angesetzter $Na_2S_2O_5$ -Lösung
- 5) Spülen: vorsichtig Spülen bis Spülflüssigkeit sich nicht mehr verfärbt
- 6) Waschen: für 3*10 Minuten in neu angesetzter $Na_2S_2O_5$ -Lösung
- 7) Spülen: für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser
- 8) Dehydratation: für je 5 Minuten in aufsteigendem Ethanol-Absolut (70%, 95%, 95%, 100%, 100%)
- 9) Reinigung + Eindecken: aus Xylolbad heraus mit Entellan eindecken

8.3.2 Antikörper-Färbung

Antikörpermarkierung

- 1) Verbrauchtes Kulturmedium entfernen und Zellrasen 2 x kurz mit Trypsin/EDTA benetzen.
- 2) Nach ca. 3-5 min. Inkubation bei 37°C am Phasenkontrastmikroskop Kontrolle des Ablösevorgangs und Zellen durch Klopfen an der Kulturschale („shake off“) oder schonend mit einem Schaber vom Flaschenboden ablösen
- 3) Die Enzymwirkung durch Zugabe von 150 µL Trypsin-Neutralisierungslösung pro cm² inhibieren, die Zellen für einen Waschschrift in ein Zentrifugenröhrchen überführen und 5 min. bei 200 x g zentrifugieren
- 4) Zellpellet in eiskaltes PBS mit 0,5% (w/v) BSA resuspendieren, bei 200 x g für 5 min. bei 4°C pelletieren, den Überstand dekantieren, das Pellet resuspendieren und bei selber Einstellung erneut zentrifugieren (zur Vermeidung von Zellklümpchen Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb filtern!)
- 5) Nach Entfernung des Überstandes die Zellen in 13 mL PBS lösen und zu 1 mL auf 13 Eppendorfgefäße verteilen
- 6) Nach erneuter Zentrifugation Pellet in 80 µL FACS-Pufferlösung FACS Puffer (pH 7,2) resuspendieren

FACS Puffer (pH 7,2): 1 x PBS
 0,5% (w/v) BSA
 0,1 U/mL DNase

- 7) Die sechs Antikörper sowie die entsprechenden Isotypkontrollen unter Lichtabschluss in spezifischen Konzentrationen in Einzelfärbungen den vorbereiteten Zellsuspensionen zugeben

Name des Antikörpers	Zugabe von	Name des Isotypen	Zugabe von	Fluoreszenz-Konjugat
anti-CD133/2	10µl	IgG2b	10µl	PE
anti-CD326	5µl	IgG1 λ1	2µl	APC
anti-CD44	20µl	IgG2b, κ	1µl	FITC
anti-CD24	20µl	IgG2a, κ	20µl	FITC
anti-CD29	20µl	IgG1 κ	20µl	APC
anti-CD49f	20µl	IgG2a, κ	0,5µl	PE

- 8) Nach 15 min. Inkubationszeit bei 4°C in PBS waschen und zentrifugieren
- 9) Nach Dekantation des Überstandes und Resuspension des Pellets in 1 mL Pufferlösung innerhalb von max. 1 Std. Analyse am FACS-Gerät

!!! Bis zur Messung die Proben im Dunkeln auf Eis lagern !!!

9. DANKSAGUNG

Dem Direktor der Klinik für Chirurgie des UKSH Campus Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. T. Keck, möchte ich dafür danken, die Forschung in seinem Hause durchführen zu können.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. med. J. K. Habermann danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien sowie für die kompetente und freundliche Betreuung.

Herzlich danken möchte ich Dr. Stefanie Bünger für die kompetente Anleitung zur experimentellen Forschung, wertvollen Ratschlägen und freundlichen Unterstützung bei der Erstellung einer Publikation sowie den Mitarbeitern der Sektion Katja Klempt-Giessing, Gisela Grosser-Pape und Regina Kaatz für die Unterstützung der experimentellen Arbeit im Labor.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Ehemann Ingo für die liebevolle Motivation, Unterstützung und Geduld während der Arbeit und Abwesenheit im Labor.

Zudem möchte ich mich bei meinen Eltern, Hugo und Bettina sowie meinen Geschwistern Oliver, Dustin und Aylin bedanken. Es ist ein ganz besonderes Glück, so eine wundervolle Familie zu haben.

10. PUBLIKATIONEN

Tübing J und Alkemade H, Freitag-Wolf S, Bünger S, Ernst F, Schlesiger S, Oberländer M, Fritzsche B, Thorns C, Görg S, Thorns C, Rody A, Widengren J, Auer G, Ried T, Gemoll T and Habermann JK.

Stem cell markers predict prognosis in patients with breast cancer in general, and in subgroups of large, triple-negative, and hormone receptor positive carcinomas. *Manuskript* (2023)

Bünger S, **Tübing J**, Kruse C, Görg S, Bruch H-P, Roblick UJ, Habermann JK. Expression profiles of cancer stem cell markers in breast cell lines.

6th International Meeting of the Stem Cell Network NRW 2011 (Essen, 05. -06.04.2011).

Tübing J, Bünger S, Fritzsche B, Roblick UJ, Bruch H-P, Habermann JK. Welche Rolle spielen Tumorstammzellen in der Genese von Brustkrebs?

Vierter Doktorandentag der Universität zu Lübeck 2010 (Lübeck, 09.06.2010).

1. Posterpreis.