HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Nachweis lebender zirkulierender Tumorzellen mittels viraler Transduktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Pietsch
aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2015

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein
Korreferent: Prof. Dr. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2015

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.
Johann Wolfgang von Goethe

Menschen mit einer neuen Idee gelten so lange als Spinner, bis sich die Sache durchgesetzt hat.
Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Tumoren beim Menschen 1

1.2 Karzinogenese 2

1.3 Metastasierung 4

1.3.1 Invasions- und Metastasierungskaskade 6

1.3.2 Epithelial-mesenchymale Transition 7

1.4 Minimale Resterkrankung bei soliden, malignen Tumoren 9

1.5 Prognostische Bedeutung der minimalen Resterkrankung 10

1.6 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) 11

1.7 Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs 12

1.7.1 Die Rolle von EpCAM bei der Isolierung und Detektion von CTCs 13

1.7.2 Anreicherung von CTCs durch immunomagnetische Selektion 14

1.7.3 Anreicherung der CTCs über die Dichte der Zellen 14

1.7.4 Anreicherung von CTCs basierend auf der Zellgröße 15

1.7.5 Mikrofluidik-basierte Systeme 16

1.7.6 Detektion über Immunfluoreszenzfärbung 17

1.7.7 PCR-basierte Detektionsverfahren 18

1.7.8 Alternative Detektionsverfahren für CTCs 18

1.7.8.1 Humane Adenoviren 19

1.8 Ziele dieser Arbeit 22

2 Material 23

2.1 Verbrauchsmaterialien 23

2.2 Chemikalien, gebrauchsfertige Reagenzien und Puffer 24

2.3 Angesetzte Lösungen und Puffer 25

2.4 Zellkulturmedien, Zusätze, Puffer 26

2.5 Kits 26

2.6 Enzyme 27

2.7 Oligonukleotide 27

2.8 Antikörper 29

2.9 Agarose-Gele und DNA-Leitern 29

2.9.1 Agarose-Gele 29
2.9.2 DNA-Leitern 30
2.10 Bakterienstämme 30
2.11 Plasmide 30
2.12 Adenoviren 31
2.13 Zelllinien 31
2.14 Oligonukleotid-Arrays und Zubehör 31
2.15 Geräte 32
2.15.1 Waagen 32
2.15.2 Zentrifugen 32
2.15.3 Inkubatoren, Brutschränke, Sterilbänke 32
2.15.4 PCR-Zykler 32
2.15.5 Mikroskope 32
2.15.6 Sonstige Laborgeräte 33
2.16 Software 33
3 Methoden 35
3.1 Zellbiologische Methoden 35
3.1.1 Kultivierung von humanen Zelllinien 35
3.1.2 Passagieren von Zelllinien 35
3.1.3 Kryokonservierung von Zelllinien 35
3.1.3.1 Einfrieren von Zelllinien 36
3.1.3.2 Auftauen von Zelllinien 36
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer 36
3.2 RNA-/DNA-Analytik 37
3.2.1 RNA-Isolation 37
3.2.2 cDNA-Synthese 37
3.2.3 Isolation genomischer DNA aus Zellkulturzelllinien 38
3.2.4 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 39
3.2.5 Überprüfung der Qualität des WGA-Produkts mittels Fragmentlängenanalyse 39
3.2.6 Quantitative Real-time-PCR 39
3.2.7 *Short Tandem Repeat*-Analyse 41
3.2.8 Mykoplasmen-PCR 43

3.2.9 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Agarose-Gel 43
3.3 Immunbiologische Methoden 44
3.3.1 Durchflusszytometrie 44
3.3.1.1 Messung der CAR-Proteinexpression 44
3.4 Mikrobiologische Methoden 45
3.4.1 Bakterienstämme 45
3.4.2 Medium und Aufzucht von *E. coli* 46
3.4.3 Plasmide 46
3.5 Klonierung 47
3.5.1 Restriktionsverdau 47
3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 47
3.5.3 Dephosphorylierung 48
3.5.4 Ligation 48
3.5.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen 48
3.5.6 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation 49
3.5.7 Plasmidisolation 50
3.6 Herstellung rekombinanter Adenoviren 51
3.6.1 Klonierung von *EGFP* in den Transfervektor pShuttle-CMV 53
3.6.2 Klonierung rekombinanter adenoviraler EGFP-Expressionsvektoren 54
3.6.3 Transfektion rekombinanter adenoviraler DNA in HEK293-Zellen 56
3.6.4 Produktion der Viruspartikel 57
3.6.5 Gefrier-Tau-Zyklus 58
3.6.6 Aufreinigung der Viruspartikel 58
3.6.7 Titerbestimmung 59
3.6.7.1 Physikalische Titerbestimmung 59
3.6.7.2 Biologische Titerbestimmung 60
3.7 Isolierung von PBMCs 61
3.7.1 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut 62
3.7.2 Isolierung von PBMCs aus Buffy-Coat-Präparaten 62
3.7.3 Aufarbeitung von frischen Blutproben 62
3.7.4 Aufarbeitung von frischen DLA-Proben 63
3.8 Messung der Transgen-Expression mittels Luziferase-Assay 65

3.9 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay 67
3.10 Infektion von Zelllinien mit Ad5EGFP und Ad5/3GFP.....68
3.11 Transiente Virusinfektion.....69
3.12 Zellsortierung mittels FACS für Einbringungsversuche.....69
3.13 Infektion von Blut- und DLA-Proben.....70
3.14 CD45-Färbung der mit Ad5/3GFP infizierten DLA- und Blutproben 70
3.15 Einzelzellisolierung aus DLA- und Blutproben.....71
3.16 MSE-PCR.....71
3.16.1 Proteinase K-Verdau 72
3.16.2 *Mse*I-Verdau und Preannealing.....72
3.16.3 Ligation.....73
3.16.4 Primäre PCR 73
3.16.5 Kontroll-PCR 74
3.17 Molekularzytogenetik.....75
3.17.1 Vergleichende genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays.....75
3.17.1.1 Multiplex-PCR zur Kontrolle der Qualität von Einzelzellamplifikaten 76
3.17.1.2 Aufreinigung der amplifizierten DNA für die Array-CGH 77
3.17.1.3 Fluoreszenzmarkierung der genomischen Einzelzell-DNA 77
3.17.1.4 Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten DNA und Bestimmung der spezifischen Aktivität.....78
3.17.1.5 Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten DNA auf die Hybridisierung 79
3.17.1.6 Hybridisierung 79
3.17.1.7 Waschen des DNA-Microarrays.....80
3.17.1.8 Scannen des DNA-Microarrays.....80
3.17.1.9 Auswertung der gewonnenen aCGH-Daten 80
3.18 Statistische Auswertung 81

4 Ergebnisse 82

4.1 CAR-Expression in Tumorzelllinien.....82
4.2 Einfluss der EMT auf die *CAR*-Expression.....83
4.3 Einfluss der Viruskonzentration auf die Zellviabilität.....84
4.4 Transiente Infektion 86
4.5 Effizienz der adenoviralen Infektion.....90

4.6 Spezifität des adenoviralen Detektionssystems Ad5/3 93

4.7 Sensitivität des adenoviralen Detektionssystems Ad5/3GFP 95

4.8 Anwendung des virusbasierten Detektionssystems an DLA-Patientenproben 96

4.9 Vergleich der Detektionsraten des adenoviralen Systems mit CellSearch® 98

4.10 Anwendung des adenoviralen Detektionssystems an Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom 101

4.11 Überprüfung der Qualität des WGA-Produkts 102

4.12 Genomische Analyse GFP-positiver Einzelzellen aus DLA- und Blutproben mittels aCGH 104

4.13 Gesamtgenomische Fragmentlängen-Analyse der WGA-Produkte 109

5 Diskussion 112

5.1 Untersuchungen zur Verwendung des adenoviralen Vektors Ad5 für die CTC-Detektion 114

5.2 Auswirkung der Viruskonzentration auf die Zellviabilität 115

5.3 Kultivierung von Tumorzellen nach adenoviraler Infektion 117

5.4 Vergleich der Effizienz der Infektion von Ad5EGFP und Ad5/3GFP 119

5.5 Spezifität und Sensitivität der adenoviralen Infektion mit Ad5/3GFP 120

5.6 Anwendung des adenoviralen Systems bei klinischen Proben von Tumorpatienten 121

5.7 Experimente zur genetischen Analyse der Ad5/3-angereicherten Zellen mittels aCGH 125

5.8 Ausblick 131

6 Zusammenfassung 134

7 Abstract 136

8 Literaturverzeichnis 138

9 Abkürzungsverzeichnis 166

Anhang 169

Eidesstattliche Erklärung 172

1 EINLEITUNG

1.1 Tumoren beim Menschen

Der Begriff „Tumor“ bezeichnet eine Neoplasie aus Organ- oder Gewebszellen, welche durch unkontrollierte Proliferation gekennzeichnet ist, so dass die Homöostase (Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod) eines Gewebes gestört ist (Mommers et al., 1999). Grundsätzlich unterscheidet man gutartige, sogenannte benigne Tumoren, von bösartigen, sogenannten malignen Tumoren. Benigne Tumoren wachsen lokal, grenzen sich von umliegendem Gewebe ab und haben nicht die Fähigkeit, ins benachbarte Gewebe einzuwandern. Maligne Tumoren, die auch mit dem Begriff „Krebs“ bezeichnet werden, wachsen ungeordnet und bestehen meist aus undifferenzierten Zellen, welche die Fähigkeit aufweisen, in umliegende oder entfernte Gewebe einzudringen (Alberts et al., 2002; Vogelstein and Kinzler, 1993). In vom Primärtumor entfernten Geweben können sie erneut zu einem Tumor auswachsen und sogenannte Metastasen bilden. Tumoren können in jeder Art von Geweben entstehen. Je nach Entstehungsort werden sie unterschiedlich eingeteilt. Karzinome, die über 80 % aller malignen Tumoren ausmachen, entstehen aus Zellen des Epithels (Valastyan and Weinberg, 2011).

Im Jahr 2008 war Krebs in den Industrienationen der Welt die häufigste Todesursache (*World Health Organization*, WHO). Nach Schätzungen der *International Agency for Research of Cancer* (IARC) gab es 2008 weltweit 12.7 Millionen neue Krebserkrankungen und 7.6 Millionen krebsbedingte Todesfälle (American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition.* 2011). In Europa kam es im Jahr 2008 zu ca. 3.2 Millionen Neuerkrankungen und 1.7 Millionen krebsbedingten Todesfällen (Ferlay et al., 2010). In Deutschland war Krebs 2012 nach den kardiovaskulären Erkrankungen weiterhin die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt). Laut der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID) und dem Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) kam es in Deutschland im Jahr 2010 zu rund 252,400 Neuerkrankungen bei Männern und 224,900 bei Frauen. Die relative

5-Jahres-Überlebesrate der Patienten, die 2009 und 2010 erkrankten, lag für Männer bei 61 % und für Frauen bei 67 %.

1.2 Karzinogenese

Die Karzinogenese (Tumorentstehung) ist ein mehrstufiger Prozess auf zellulärer Ebene, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression (Weinstein, 1988). Der gesamte Prozess kann sich über einen Zeitraum von Jahrzehnten erstrecken (Hammoud et al., 2013). Dabei haben erworbene Mutationen in der Erbsubstanz (DNA, *deoxyribonucleic acid,* Desoxyribonukleinsäure) somatischer Zellen eine besondere Bedeutung. Hierbei unterscheidet man sogenannte *passenger*-Mutationen, die keinen Einfluss auf die Zellproliferation nehmen, der Zelle somit auch keinen Wachstumsvorteil bieten (Greenman et al., 2007; Vogelstein et al., 2013) und wohl nicht zur Entwicklung eines malignen Tumors beitragen (Stratton et al., 2009) von sogenannten *driver*-Mutationen. Diese Mutationen geben der Zelle einen Wachstumsvorteil und wirken entscheidend an der Karzinogenese mit (Vogelstein et al., 2013). Wird solch eine Mutation nicht durch die zellulären Reparaturmechanismen beseitigt, bzw. die betroffene Zelle nicht durch den programmierten Zelltod (Apoptose) aus dem Gewebe eliminiert, kann sich diese Mutation manifestieren (Loeb and Loeb, 2000). Damit sich ein maligner Tumor entwickeln kann oder es gar zur Ausbildung von Metastasen kommt, reichen einzelne Mutationen sehr wahrscheinlich nicht aus. Im Laufe der Zeit und vieler weiterer Zellteilungen können weitere Mutationen hinzukommen. Man nimmt heute an, dass für die Karzinogenese vieler Tumorarten Mutationen in wenigstens vier Genen notwendig sind (Renan, 1993). Hierfür sprechen u. a. Experimente beim Kolonkarzinom (Fearon and Vogelstein, 1990). Sequenzierungsstudien offenbarten, dass solide Tumoren des Pankreas, der Prostata, der Brust und des Kopf-Hals-Bereichs im Durchschnitt 45, 41, 33 bzw. 66 Mutationen aufweisen (Vogelstein et al., 2013). Durch die Akkumulation von Mutationen erlangt die betroffene Zelle erst die nötigen Fähigkeiten, um einen malignen Phänotyp auszubilden. Solch eine mutierte Zelle kann u. a. der Apoptose entkommen, unkontrolliert proliferieren, Angiogenese zur Nährstoffversorgung der Zellmasse induzieren, invadieren und Metastasen ausbilden (Hanahan and Weinberg, 2011). Bei der Karzinogenese spielen drei Gruppen von Genen eine wesentliche Rolle: 1) Die Tumorsuppressor-Gene, deren Expression in Tumorzellen häufig reprimiert ist, 2) die Onkogene, die in einer malignen Tumorzelle oft überexprimiert sind,

und 3) die Reparatur- oder Stabilitätsgene, die durch Mutationen inaktiv sind (Vogelstein and Kinzler, 2004; Vogelstein et al., 2000). Tumorsuppressor-Gene und Proto-Onkogene kodieren für Proteine, die u. a. das Zellwachstum kontrollieren und den Zellzyklus regulieren. Hierdurch wird u. a. das unkontrollierte Wachstum gefördert. Die Stabilitätsgene sorgen für die genomische Stabilität in einer Zelle. Bei Tumorsuppressor-Genen führen Mutationen zu einer verringerten oder gestörten Funktion des Genprodukts und werden als *loss of function* bezeichnet. In über 50 % der humanen Tumoren ist das Tumorsuppressor-Gen *TP53* (Tumorprotein p53) mutiert oder sogar verloren gegangen (Feki and Irminger-Finger, 2004; Hollstein et al., 1994; Hussain and Harris, 2006; Muller et al., 2011). Dieses Gen ist u. a. in Tumoren des Kolon, des Ösophagus, der Lunge, des Pankreas, der Haut, des Gehirns und der Brust verändert (Greenblatt et al., 1994). In normalen Zellen ist *TP53* für den Zellzyklusarrest und die Regulierung der Apoptose zuständig (Brown et al., 2011; Muller et al., 2011; Shangary and Wang, 2008). Ist die Funktion dieses Gens gestört, können DNA-Schäden in Zellen nicht mehr repariert bzw. geschädigte Zellen nicht mehr durch die Apoptose abgebaut werden. Als Folge häufen sich immer mehr Mutationen in den betroffenen Zellen an und diese gewinnen immer mehr Wachstums- und Überlebensvorteile gegenüber den gesunden benachbarten Zellen. Zusätzlich führen *TP53* Mutationen zu einer gesteigerten Invasivität der betroffenen Zellen und somit zu einer erhöhten Metastasierung (Wang et al., 2009). Ein weiteres Beispiel für ein häufig mutiertes Tumorsuppressor-Gen ist das *APC*-Gen (*adenomatous polyposis coli*) (Boynton et al., 1992; Powell et al., 1992). In über 50 % der kolorektalen Karzinome liegt eine Mutation im *APC*-Gen vor (Powell et al., 1992). Mutationen im *APC*-Gen können dazu führen, dass β-Catenin in der Zelle nicht mehr abgebaut wird und es somit zu einer Akkumulation von β-Catenin im Zellkern kommt (Goss and Groden, 2000; Korinek, 1997; Munemitsu et al., 1995). Dort trägt es zur Aktivierung von Genen bei, die am Zellzyklus beteiligt sind und somit die Proliferation vorantreiben können (Shtutman et al., 1999).

Mutationen in Onkogenen können diese konstitutiv aktivieren, wodurch das Genprodukt zu Zeitpunkten und in zellulären Zusammenhängen aktiv ist, zu und in denen das Gen normalerweise inaktiv wäre. Ein in vielen Tumoren dereguliertes Onkogen ist *MYC* (Vita and Henriksson, 2006), das bei der Zellproliferation eine entscheidende Rolle spielt (Bretones et al., 2015) und in vielen epithelialen Tumoren amplifiziert bzw. überexprimiert ist (Deming et al., 2000; Liao and Dickson, 2000; Ross et al., 2013; Schleger et al., 2002). In

bis zu 50 % der Mammakarzinome kann eine *MYC*-Amplifikation vorliegen (Deming et al., 2000) und in bis zu 43 % der Pankreaskarzinome kann eine Überexpression von *MYC* detektiert werden (Schleger et al., 2002). Mutationen in den *RAS*-Genen *KRAS*, *NRAS* und *HRAS* kommen in bis zu 30 % aller humanen Tumoren vor (Fernández-Medarde and Santos, 2011). Pankreaskarzinome weisen sogar in 90 % der Fälle eine Mutation in *KRAS* auf (Downward, 2003). Punktmutationen im intrazellulären Signalüberträger *RAS* bewirken ein konstitutiv aktives RAS-Protein (Bos, 1989; Neumann et al., 2009; Schubbert et al., 2007). Dies wirkt über den MAPK-Signalweg positiv auf die Zellproliferation und kann somit die Entwicklung von Tumoren fördern (Bos, 1989; Lisiansky et al., 2012; Nash et al., 2010).

Auftretende Mutationen oder Chromosomenschäden werden durch die sogenannten Reparatur- oder Stabilitätsproteine repariert. Werden die Gene dieser Proteine durch Mutationen inaktiviert, führt dies zu einem Funktionsverlust des Proteins und damit zu einer Akkumulation von DNA-Schäden und zur chromosomalen Instabilität (Broustas and Lieberman, 2014). Zwei bekannte Vertreter dieser Gruppe sind *BRCA1* und *BRCA2*. Beide Gene spielen u. a. bei der Entwicklung von Mamma- und Ovarialkarzinomen eine sehr große Rolle (Esteller et al., 2000; Welcsh and King, 2001).

1.3 Metastasierung

Das entscheidende Merkmal epithelialer, maligner Tumoren ist die Metastasierung. Diese bezeichnet die Neubesiedlung eines Gewebes oder Organs durch einzelne Tumorzellen, die aus einem entfernten Primärtumor (PT) über die Blut- oder Lymphgefäße eingewandert sind. Bei einer Metastase handelt es sich nicht um eine neue Krebserkrankung des Patienten, sondern um eine Ausdehnung der primären Krebserkrankung. Primärtumoren können in der Regel durch chirurgische Resektionen gut entfernt werden (Valastyan and Weinberg, 2011). In diesem Zusammenhang ist wichtig zu betonen, dass die wenigsten Patienten aufgrund der Primärtumoren versterben. Rund 90 % der krebsbedingten Todesfälle sind der systemischen Ausbreitung, den Metastasen zuzuschreiben (Chaffer and Weinberg, 2011; Gupta and Massagué, 2006). Dabei können sich Metastasen auch noch Jahrzehnte nach Entfernung des Primärtumors entwickeln (Hanahan and Weinberg, 2011). Metastasen siedeln sich in anderen Organen oder Geweben an und können dort aufgrund ihrer großen räumlichen Ausdehnung oder hohen Anzahl zum Organversagen führen. Weitere Folgen können Infektionen und Blutungen sein (Inagaki et al., 1974; Klastersky et al.,

1972), aber auch Kachexie (Loberg et al., 2007; Tisdale, 2010). Die Metastasierung ist deshalb maßgebend für das Überleben des Patienten. Trotz der großen klinischen Bedeutung fehlen noch immer die entscheidenden Erkenntnisse über die genetischen oder biochemischen Faktoren, die den Metastasierungsprozess entscheidend vorantreiben und auch für ein Therapieversagen verantwortlich sind. Basierend auf der „Seed-and-Soil"-Theorie von Stephen Paget überleben die abgewanderten Tumorzellen nur dort, wo sie günstige Bedingungen finden und wachsen auch nur dann zu Metastasen aus (Paget, 1889). Viele Karzinomarten präferieren bestimmte Organe und Gewebe, in die sie metastasieren. Brustkrebszellen metastasieren bevorzugt in Knochen, Lunge, Gehirn und Leber (Patanaphan et al., 1988), wohingegen das kolorektale Karzinom in die Leber und Lunge metastasiert (Steeg, 2006). Prostatakarzinome metastasieren hauptsächlich in Knochen, Pankreaskarzinome präferentiell in die Leber (Hess et al., 2006). Ein recht neues Modell zur Beschreibung der Ansiedlung von metastasierten Zellen ist das Konzept der prä-metastatischen Nische. Dabei beschreibt die prä-metastatische Nische das Mikroumfeld, in dem metastasierte Tumorzellen gute Lebens- und Wachstumsbedingungen vorfinden. Die Tumorzellen müssen in dieser Nische anwachsen und überleben können, um von einer Mikro- zu einer Makrometastase auszuwachsen (Psaila and Lyden, 2009). Interessanterweise ist die Ausbildung der prä-metastatischen Nische offenbar ein Prozess, der aktiv von Tumoren vorangetrieben wird. Dabei können sich hämatopoetische Vorläuferzellen offenbar noch vor der Ankunft der Tumorzellen in den metastatischen Zielorganen ansiedeln und die prä-metastatischen Nischen ausbilden, die dort für ein optimales Mikromilieu sorgen (Kaplan et al., 2005). Diese werden durch inflammatorische Botenstoffe oder Wachstumsfaktoren, die durch den Primärtumor induziert oder sezerniert werden, an diese Stelle rekrutiert (Hiratsuka et al., 2006, 2002; Sceneay et al., 2013). In diesen neugebildeten Nischen werden durch die eingewanderten Zellen und die lokalen Stroma- und Endothelzellen zahlreiche Wachstumsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Enzyme, welche die Matrix degradieren, bereitgestellt (Hiratsuka et al., 2002; Kaplan et al., 2005).

Neben den genannten Faktoren spielt auch die anatomische Blutversorgung bei der tumortypischen Organverteilung eine wichtige Rolle. So metastasieren gastrointestinale Tumoren häufig in die Leber, da deren abgewanderten Tumorzellen aufgrund des Pfortadersystems zunächst die Leber passieren (Gupta and Massagué, 2006). Die neugebildeten Blutgefäße der Tumoren sind im Vergleich zu normalen Blutgefäßen meist

sehr durchlässig (Carmeliet and Jain, 2011), was den Übertritt von Tumorzellen aus dem Gewebe in den Blutstrom erleichtern kann.

1.3.1 Invasions- und Metastasierungskaskade

Eine klinisch detektierbare Makrometastase stellt den Endpunkt einer Reihe von komplexen Ereignissen dar (Nguyen et al., 2009; Valastyan and Weinberg, 2011). Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, müssen Zellen zunächst den Primärtumor verlassen und in das umliegende Gewebe einwandern. Dieser Vorgang wird als lokale Invasion bezeichnet. Hierbei müssen die Tumorzellen in einem ersten Schritt die Basalmembran durchbrechen. Mithilfe von MMPs (Matrix Metalloproteinasen) wird die Collagen IV-haltige Basalmembran für die metastasierenden Tumorzellen durchlässig gemacht (Groblewska et al., 2012). Nach heutiger Auffassung müssen die Tumorzellen den reversiblen zellbiologischen Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) einleiten, um sich aus dem epithelialen Zellverband lösen und in das umliegende Gewebe einwandern zu können (1.3.2). Aus dem umliegenden Gewebe gelangen die Zellen dann zu Blut- oder Lymphgefäßen, in welche sie übertreten können. Durch diesen Prozess der Intravasation gelangen die Zellen in ein Mikromilieu, in dem sie zunächst überleben müssen. Metastasierende Tumorzellen sind in der Blutzirkulation Scherkräften, Immunzellen und Anoikis, begründet durch den Verlust des Kontaktes zur extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM), ausgesetzt (Guo and Giancotti, 2004; Steeg, 2006). Eine Interaktion mit Thrombozyten kann die Tumorzellen vor Immunzellen abschirmen und vor Scherkräften schützen (Egan et al., 2014; Nieswandt et al., 1999). Die Zellen, die überleben, arretieren an einer Gefäßwand, ggf. weit entfernt vom Primärtumor, und wandern aus dem Gefäß in das dort umliegende Gewebe ein (Kim et al., 1998). CD11b-positive Makrophagen unterstützen die Tumorzellen bei der Wanderung aus dem Gefäß in das umliegende Gewebe (Qian et al., 2009). Dieser Prozess wird als Extravasation bezeichnet. Dieser Vorgang ist in der Regel schwieriger als die Intravasation, da die Gefäße in den Zielorganen der Metastasierung intakt sind. In der Leber hingegen können über Blutgefäße eingewanderte Tumorzellen eine inflammatorische Antwort auslösen, die zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsproteinen führt. Hierdurch können zirkulierende Tumorzellen (CTCs, 1.6) besser an die Lebergefäße binden (Auguste et al., 2007). Durch das Bone Sialoprotein und das Chemokin Osteonectin werden Mamma- und Prostatatumorzellen in die Knochen gelockt (Ibrahim et al., 2000; Jacob et al., 1999). Einige

Tumoren können über die VEGFR-1-Tyrosinkinase die Expression der matrixdegradierenden MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9) in Lungenendothelzellen induzieren, was zu einer leichteren Invasion der Tumorzellen in das Gewebe führen kann (Hiratsuka et al., 2002). Unter für die Tumorzellen günstigen Bedingungen können diese in den Zielorganen überleben und zu einer klinisch detektierbaren Makrometastase auswachsen (Valastyan and Weinberg, 2011).

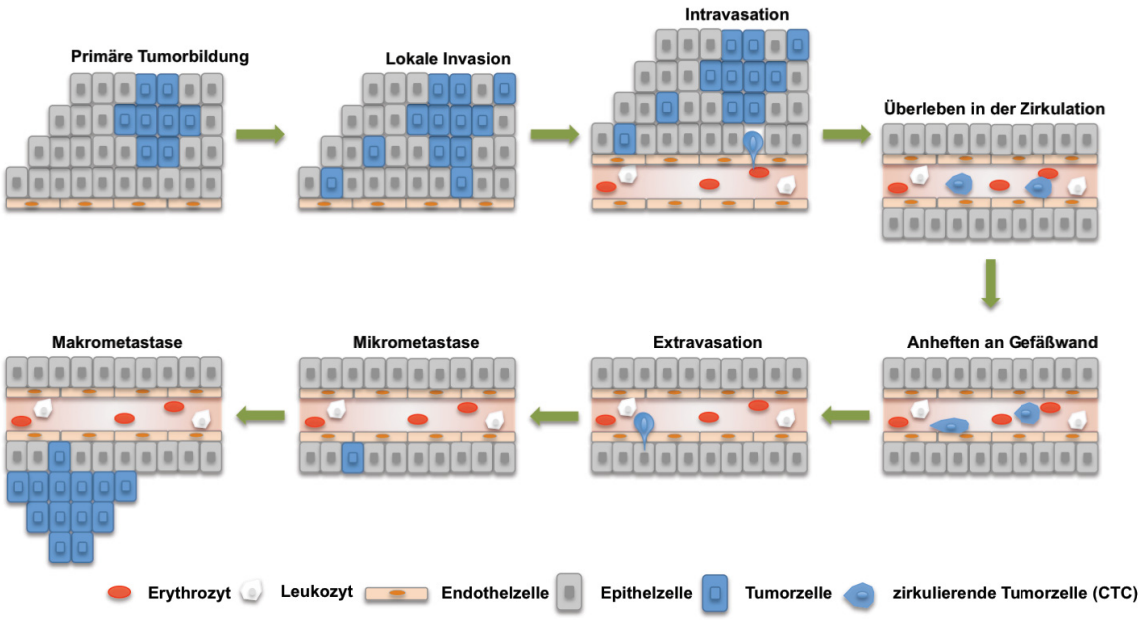


Abbildung 1.1: Invasions- und Metastasierungskaskade. Der Weg zu einer klinisch detektierbaren Makrometastase beginnt nach der primären Tumorbildung durch die lokale Invasion einzelner Tumorzellen in das umliegende Gewebe. Von dort aus gelangen die Zellen durch Intravasation in die Zirkulation. Wenn die Zellen überleben, wandern sie mit dem Blutstrom an vom Tumor weit entfernte Stellen im Körper und arretieren an der Gefäßwand. Daraufhin wandern die Zellen aus dem Gefäß aus (Extravasation) und bilden sich zu klinisch detektierbaren makroskopischen Metastasen aus, wenn die Bedingungen zum Überleben im neuen Mikro-Umfeld stimmen.

1.3.2 Epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet einen reversiblen Prozess, durch den epitheliale Zellen durch zellbiologische Veränderungen mesenchymale Eigenschaften erlangen. Dieser Vorgang spielt eine entscheidende Rolle während der Embryogenese und der Wundheilung (Hay, 2005; Kalluri and Weinberg, 2009). Doch auch bei der Metastasierung (1.3.1) ist dieser Prozess von großer Bedeutung. Beim Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp kommt es zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte und der Zellpolarität. Darüber hinaus erlangen die Zellen migratorische und invasive Eigenschaften, was zu einer erhöhten Motilität der Zellen führt (Kalluri and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Bei der EMT werden epitheliale Proteine, wie E-Cadherin und

Cytokeratine (CK) herunterreguliert und die Expression mesenchymaler Proteine wie Vimentin und N-Cadherin induziert (Sigurdsson et al., 2011). Die veränderten Gen-Expressionsmuster führen zunächst zur Schwächung der Zell-Zell-Kontakte, wodurch sich die Zellen aus dem Gewebeverband des Primärtumors lösen können (Chu et al., 2006). Die invadierenden Eigenschaften helfen bei der Auflösung der Basalmembran (BM) und der ECM (Jordà et al., 2005; Miyoshi et al., 2004). Die EMT verhilft den Tumorzellen somit zu migratorischen und invasiven Eigenschaften, wodurch die Zellen die Fähigkeit erlangen, aus dem Primärtumor in das umliegende Gewebe einzuwandern. Ausgestattet mit diesen neuen Eigenschaften können die Zellen Anschluss an das Gefäßsystem erlangen und somit in Regionen des Körpers vordringen, die weit entfernt vom Primärtumor liegen können. Wenn sich die Tumorzellen ansiedeln und beginnen auszuwachsen, wird der umgekehrte Vorgang der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) eingeleitet. Hierdurch nehmen die Tumorzellen wieder einen epithelialen Phänotyp an, proliferieren und können schließlich zu Metastasen auswachsen (Valastyan and Weinberg, 2011) (1.3.1). In Abbildung 1.2 ist schematisch der Ablauf der EMT (A) und der MET (B) dargestellt.

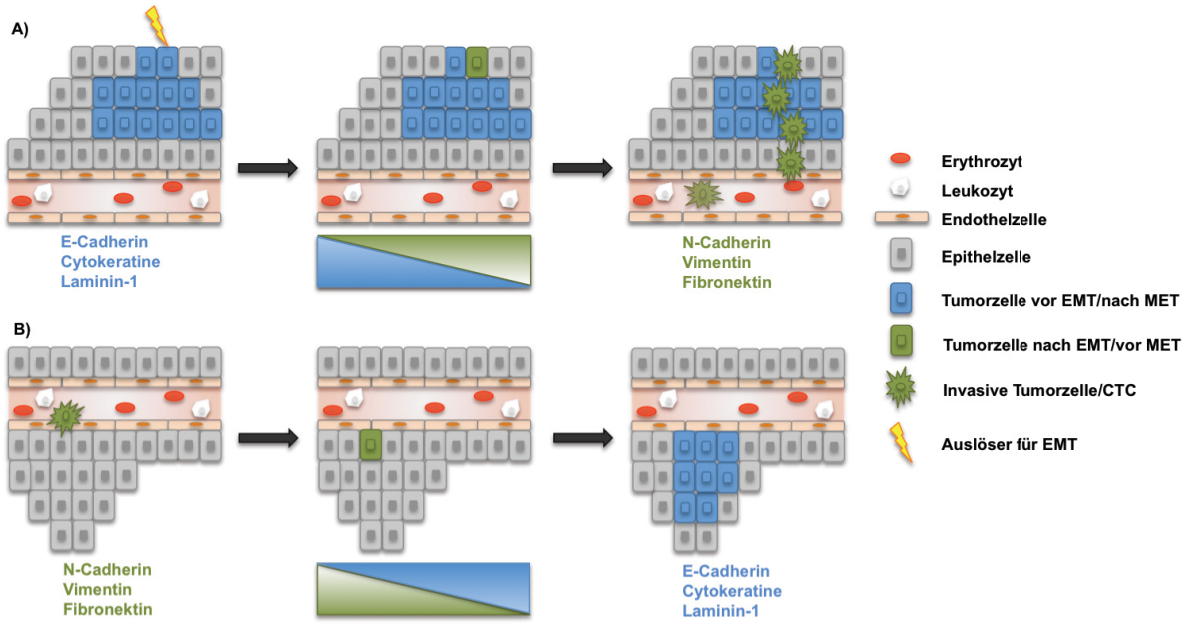


Abbildung 1.2: Rolle der EMT und MET während der Metastasierung. A) In einem Primärtumor wird in einer Zelle die EMT ausgelöst. In dieser Zelle wird die Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin herunterreguliert, wohingegen die Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin induziert wird. Diese Zelle erlangt mesenchymale Eigenschaften, so dass sie aus dem Primärtumor in das umliegende Gewebe migrieren und in die Zirkulation invadieren kann. **B)** Tumorzellen, die nach einer EMT in der Zirkulation überleben, wandern an anderer Stelle in das umliegende Gewebe wieder ein. Dort bilden diese Zellen eine Mikrometastase, die allmählich aufgrund einer MET wieder ihre epithelialen Eigenschaften zurückerlangen und zu einer Makrometastase auswachsen kann. EMT = Epithelial-mesenchymale Transition, MET = Mesenchymal-epitheliale Transition.

1.4 Minimale Resterkrankung bei soliden, malignen Tumoren

Der Begriff der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease,* MRD) wurde zunächst nur im Zusammenhang mit malignen hämatopoetischen Systemerkrankungen verwendet. Hier bezeichnet die MRD die nach dem Erreichen einer klinischen Remission im Körper des Patienten verbleibenden, residualen Zellen. Bei soliden, malignen Tumoren ist die operative Entfernung des Primärtumors die kurative Therapie der ersten Wahl. Obwohl ein Patient nach einer erfolgreichen Operation des Primärtumors aufgrund klinischer Nachweisverfahren (z. B. bildgebende Diagnostik) als tumorfrei gilt, kann es dennoch zur Metastasenbildung kommen (Ignatiadis and Reinholz, 2011; Riethdorf and Pantel, 2010). Dies deutet auf Tumorzellen hin, die nicht mit dem Primärtumor entfernt wurden und auch nicht mit den klinischen Methoden nachzuweisen waren. In den 1980er Jahren wurden erstmals mittels experimenteller Methoden epitheliale Zellen im Knochenmark von Karzinompatienten entdeckt (Dearnaley et al., 1981; Mansi et al., 1987; Schlimok et al., 1987). Somit wurde der Begriff der MRD auch auf solide Tumorerkrankungen übertragen. Da die MRD auf wenigen bis einzelnen Zellen beruht, kann sie nicht rein morphologisch detektiert und beurteilt werden (Moss, 1999). Methoden wie die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain* reaction, PCR), die auf der Analyse tumorassoziierter Gene beruht oder die Immunhistochemie, welche die Expression intrazellulärer Marker oder Oberflächenmarker untersucht, bieten sensitivere Möglichkeiten zur Detektion dieser MRD-Zellen. Derzeit gibt es noch keinen spezifischen Marker, der zuverlässig MRD-Zellen identifizieren und der auch für verschiedene Tumorarten angewendet werden kann. Als Indikatororgane haben sich mesenchymale Gewebe wie Knochenmark (KM), Lymphknoten (LK) und Blut etabliert, in denen die Tumorzellen aufgrund ihres epithelialen Phänotyps detektiert werden können. In den gängigen Immundetektionsfärbungen werden daher epithelspezifische Marker untersucht (Pantel et al., 1994), die von mesenchymalen Zellen üblicherweise nicht exprimiert werden. Am häufigsten werden hierbei Antikörper gegen Cytokeratine oder das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) verwendet (Schlimok et al., 1987). Solche Tumorzellen, die in Knochenmark und Lymphknoten detektiert werden können, werden als disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells,* DTCs) bezeichnet, und solche, die im Blut aufgespürt werden, als zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells,* CTCs).

1.5 Prognostische Bedeutung der minimalen Resterkrankung

Bei vielen soliden Tumorerkrankungen konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen im Blut, Knochenmark und in den Lymphknoten vorzufinden sind (Driemel et al., 2014; Hartkopf et al., 2012; Karhade et al., 2014; Seeberg et al., 2015). Zahlreiche Studien beschreiben, dass das Auftreten dieser Zellen in einigen Karzinomen mit einer schlechten Prognose einhergeht (Cohen et al., 2009; Cristofanilli et al., 2004, 2005; Krebs et al., 2011; Moreno et al., 2005; Okegawa et al., 2009; Uenosono et al., 2013). Am besten untersucht ist die MRD beim Mammakarzinom, für das DTC-Daten im Knochenmark von über 4.000 Patientinnen verfügbar sind (Braun et al., 2005). Das Auffinden EpCAM-positiver Zellen in tumorfreien Lymphknoten gilt als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben beim Pankreaskarzinom und dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (Hosch et al., 1997; Kubuschok et al., 1999). Ebenfalls konnte beim Ösophaguskarzinom festgestellt werden, dass eine EpCAM-Expression auf DTCs im Knochenmark mit einem schlechteren Überleben der Patienten korreliert (Driemel et al., 2014). Auch bei lymphatischen DTCs gibt es für das Mammakarzinom die überzeugendsten Daten an über 1.000 Patientinnen, die deutlich den prognostischen Einfluss von einzelnen DTCs zeigen (de Boer et al., 2009). MRD-Zellen können auch als CTCs identifiziert werden, deren Nachweis in der klinisch metastasenfreien Situation ebenfalls mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Lucci et al., 2012; Rack et al., 2014). Da die Blutuntersuchungen klinisch weniger aufwendig sind als Knochenmarks- oder Lymphknotenbiopsien, sind die CTCs in den Mittelpunkt des klinischen Interesses gerückt. Zur Zeit spielen sie aber weniger in der MRD, sondern vor allem in der metastasierten Situation, in der sie häufiger detektierbar sind, eine klinisch relevante prognostische Rolle. CTCs sind bei metastasierten Mammakarzinomen mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben (*progression-free survival*, PFS) und einem reduzierten Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) assoziiert (Botteri et al., 2010; Cristofanilli et al., 2004; Hayes et al., 2006; Rack et al., 2014). In metastasierten Prostata- und Kolonkarzinomen sind CTCs ebenfalls mit einem verkürzten Überleben assoziiert (de Bono et al., 2008; Cohen et al., 2009).

Auch wenn DTCs und CTCs noch keine entscheidende Rolle in der Diagnostik spielen, ist der aktuellen Fassung für die TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = *Nodal*, Lymphknoten, M = Metastase), die der standardisierten Darstellung der anatomischen Tumorausbreitung dient, die Kategorie cM0(i+) hinzugefügt worden, die den Nachweis von Krebszellen im Blut

oder Knochenmark bzw. eine Ansammlung von Krebszellen (≤ 0.2 mm) in nicht-regionalen Lymphknoten beschreibt. Bei diesen Patienten gibt es keinen klinischen oder symptomatischen Hinweise auf Metastasen (Lianidou et al., 2013).

1.6 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

CTCs sind Krebszellen, die sich vom Primärtumor entfernt haben und im Blut nachgewiesen werden können. Sie haben in den letzten Jahren im Forschungsfeld der Metastasierung an Bedeutung zugenommen. Es besteht die Hoffnung, dass CTCs als Surrogatmarker für die systemische Krebserkrankung den Erfolg einer Therapie anzeigen und zu einer Verbesserung der Therapie beitragen können. Des Weiteren erhofft man sich durch die Analyse der CTCs neue therapeutische Ziele und Mechanismen der Resistenzentwicklung zu entdecken, mehr über den Metastasierungsprozess in Krebspatienten zu erfahren, sowie einen Überblick über den Krankheitsverlauf zu erhalten (Alix-Panabières and Pantel, 2013). Im Gegensatz zu üblichen aufwendigen oder schmerzhaften Gewebe- oder Knochenmarksentnahmen bietet die Analyse der CTCs in Blutproben eine gute Alternative. Darüber hinaus ist solch eine *liquid biopsy* (flüssige Biopsie) für mehrfache Untersuchungen wiederholt verfügbar.

CTCs können durch passive Prozesse wie Einschwämmen und Abschilfern in die Blutzirkulation gelangen (Tjensvoll et al., 2014) oder durch aktive Prozesse die Fähigkeit erlangen, sich aus dem Zellverband des Primärtumors zu lösen und so die Blutzirkulation zu erreichen. Es wurde auch beschrieben, dass CTCs wieder in den Primärtumor oder in das Ursprungsorgan des Tumors zurückwandern und dort den Tumor mit eventuell aggressiveren metastatischen Zellen infiltrieren bzw. ein Rezidiv bilden. Dieser Vorgang wird als *tumor self-seeding* bezeichnet (Kim et al., 2009) und wurde bislang nur überzeugend in Xenograftmodellen beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass die meisten CTCs im Blutstrom absterben. Man vermutet, dass von den Zellen, die überleben, etwa 0.01 % in einer anderen Region des Körpers das Gewebe infiltrieren und dort potentiell zu einer Metastase heranwachsen können (Tjensvoll et al., 2014). In Patienten mit Karzinomen der Brust, des Kolons und der Prostata konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CTCs als prognostischer Marker herangezogen werden kann (de Bono et al., 2008; Cohen et al., 2009; Cristofanilli et al., 2004). Das Vorliegen von ≥ 1 CTC/7.5 ml Blut in Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren zeigt bereits ein vermindertes Gesamtüberleben an (Bidard

et al., 2010; Lucci et al., 2012; Rack et al., 2014; Thalgott et al., 2013). In der metastasierten Situation liegt die Schwelle für einen ungünstigen Krankheitsverlauf bei ≥ 3 CTCs pro 7.5 ml Blut für das kolorektale Karzinom bzw. bei ≥ 5 CTCs für Mamma- und Prostatakarzinome (Cohen et al., 2008; Danila et al., 2011). Diese CTC-Zahlen konnten in 26 - 49 % der Patienten mit metastasierten Tumoren detektiert werden (Danila et al., 2011). Es besteht nun die Hoffnung, dass CTCs nicht nur als prognostischer Marker dienen, sondern auch zur Therapieentscheidung und Therapieüberwachung eingesetzt werden können. Sollte beispielsweise während oder nach einer systemischen Therapie mehr CTCs im Blut des Patienten auftreten als zu Beginn der Therapie, könnte dies ein Therapieversagen bzw. die Entwicklung einer Therapieresistenz anzeigen. In diesem Fall könnte die Therapie umgestellt werden. Insbesondere molekulare Therapieverfahren orientieren sich bislang vor allem an den Eigenschaften des Primärtumors. Doch systemisch gestreute Krebszellen können bezüglich des therapeutischen Ziels veränderte Geno- und Phänotypen gegenüber dem Primärtumor aufweisen, die ein Therapieversagen zur Folge haben können (Klein, 2009; Pantel and Alix-Panabières, 2010). Die molekulare Analyse der CTCs könnte daher einen wichtigen Hinweis auf die Wahl und die Effektivität der geeigneten Therapie geben. Es gibt u. a. beim Brustkrebs Hinweise darauf, dass CTCs Resistenzen gegenüber gängigen Therapien anzeigen können (Aktas et al., 2009; Schneck et al., 2013). So konnte beim Brustkrebs gezeigt werden, dass bei HER2-negativen Primärtumoren CTCs positiv für HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2,* humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) sein konnten oder umgekehrt (Fehm et al., 2010; Liu et al., 2013; Pestrin et al., 2009). Ebenfalls wurden Unterschiede bezüglich des Hormonrezeptorstatus zwischen Primärtumoren und CTCs beschrieben (Banys et al., 2013). Dies könnte bei der zielgerichteten oder endokrinen Therapie des Brustkrebses zu einer eventuell unzureichenden oder gar falschen Therapie führen. Die molekulare Analyse der CTCs bietet die Möglichkeit, die biologischen Eigenschaften der systemischen Erkrankung aufzudecken und die Therapie möglicherweise anzupassen (Pantel and Alix-Panabières, 2010).

1.7 Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs

Die Detektion und molekulare Charakterisierung von CTCs ist einer der aktivsten Bereiche der translationalen Krebsforschung (Alix-Panabières and Pantel, 2013). Aufgrund ihrer geringen Anzahl im peripheren Blut von Krebspatienten und ihrer relativ unbekannten

Eigenschaften ist die Detektion und Isolierung dieser Zellen weiterhin limitiert (Yu et al., 2011). Deshalb werden sehr präzise und zuverlässige Methoden benötigt, um diese seltenen Zellen zu detektieren und zu isolieren. Im Laufe der letzten Jahre wurden viele verschiedene Methoden und Plattformen entwickelt, um CTCs anzureichern, zu zählen und für anschließende Charakterisierung und molekulare Analysen zu isolieren (Greene et al., 2012). Aufgrund der geringen Anzahl an CTCs führt der Weg an einer Anreicherung dieser Zellen in den meisten Fällen nicht vorbei. Zur Anreicherung und Detektion dieser Zellen werden in der Regel Antikörper gegen Marker eingesetzt, die nicht von Blutzellen exprimiert werden. Da es bislang noch keinen spezifischen CTC-Marker gibt, kommen vor allem epitheliale Marker zum Einsatz (1.4).

1.7.1 Die Rolle von EpCAM bei der Isolierung und Detektion von CTCs

Das epitheliale Protein EpCAM wurde 1979 erstmals bei Kolonkarzinomen als tumorassoziiertes Protein beschrieben (Herlyn et al., 1979). EpCAM ist in vielen normalen epithelialen Geweben exprimiert, jedoch nicht in Plattenepithelien und in adulten Hepatozyten (Went et al., 2004; Winter et al., 2003). Die Expression von EpCAM ist weitgehend auf epitheliale Gewebe beschränkt, so dass die meisten Blutzellen keine EpCAM-Expression zeigen (Balzar et al., 1999; Went et al., 2004). In vielen humanen Tumoren ist EpCAM überexprimiert (Went et al., 2004). EpCAM ist derzeit der am häufigsten genutzte Marker, um CTCs im Blut von Krebspatienten aufzuspüren. Viele etablierte Systeme nutzen EpCAM, um CTCs in einer Patientenprobe zu erfassen (Cristofanilli et al., 2004; Harb et al., 2013; Nagrath et al., 2007; Stott et al., 2010). Es zeigt sich aber auch, dass EpCAM kein zuverlässiger Marker ist. Steinert et al. konnten beweisen, dass CTCs des kolorektalen Karzinoms eine Herabregulation der EpCAM-Expression gegenüber dem Primärtumor aufweisen (Steinert et al., 2014). Zellen eines Subtyps des Mammakarzinoms zeigten einen mesenchymalen Phänotyp mit starker *TWIST1*- und *VIM*- (Vimentin) Expression und konnten aufgrund der fehlenden oder stark verminderter EpCAM-Expression im CellSearch®-System nicht oder nur partiell isoliert werden (Sieuwerts et al., 2009). In einem Xenograftmausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von EpCAM durch eine EMT herunterreguliert werden kann. EpCAM-positive Tumorzellen wiesen nach Injektion in die Blutzirkulation der Maus keine EpCAM-Expression mehr auf, wohingegen die Expression mesenchymaler Marker hochreguliert war (Gorges et al., 2012). Einen weiteren Einfluss auf

die Regulation der EpCAM-Expression kann die Methylierung des EpCAM-Promotors haben (Tai et al., 2007). Driemel et al. beobachteten, dass bei EpCAM-positiven Primärtumoren des Ösophagus EpCAM-negative DTCs zu finden sind. Darüber hinaus zeigte sich, dass EpCAM-positive Lungenkarzinom-Zellen nach Induktion der EMT eine Reduktion von *EpCAM* auf mRNA-Ebene aufwiesen (Driemel et al., 2014). Ist EpCAM auf CTCs herabreguliert, so führt dies dazu, dass eine Zellpopulation nicht isoliert wird und somit unentdeckt bleibt. Daher könnte eine weitergehende Erforschung und Charakterisierung solcher EpCAM-negativer CTCs zur Entdeckung neuer Tumormarker und ggf. auch neuer therapeutischer Zielstrukturen beitragen.

1.7.2 Anreicherung von CTCs durch immunomagnetische Selektion

Die immunomagnetische Selektion ist die am häufigsten verwendete Methode, um CTCs anzureichern. Hierbei werden Antikörper verwendet, die mit Magnetpartikeln konjugiert wurden. Entweder sind die Antikörper gegen Antigene auf den Blutzellen gerichtet, wie z. B. CD45, oder gegen Antigene auf den CTCs selbst, z. B. EpCAM (Ellis et al., 2003; Liu et al., 2011; Molloy et al., 2008). Somit können mithilfe eines Magneten CTCs von Blutzellen separiert werden. Die CTCs können anschließend gezählt werden oder für weitere Analysen aufbereitet werden (1.7.6).

Eine automatisierte Anreicherung bietet das von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zugelassene CellSearch®-System der Firma (Fa.) Veridex. Bei diesem Verfahren werden CTCs zunächst immunomagnetisch über EpCAM angereichert. Um die Zellen darstellen zu können, findet im Anschluss im selben System die Detektion der CTCs über die Expression von Cytokeratinen statt (1.7.6).

1.7.3 Anreicherung der CTCs über die Dichte der Zellen

Bei der Dichtegradientenzentrifugation werden die CTCs aufgrund ihrer Dichte angereichert. Hierbei wird häufig Ficoll verwendet, ein hydrophiles Saccharose-Epichlorhydrin-Kopolymer mit einer Dichte von 1.077 g/ml (Bohrer et al., 1979; Bøyum, 1976). PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) weisen eine Dichte von < 1.077 g/ml auf, wohingegen Erythrozyten und Granulozyten eine Dichte von > 1.077 g/ml haben (Morgan et al., 2007). Bei einer

Dichtegradientenzentrifugation wird eine Blutprobe vorsichtig auf das Ficoll geschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation sammeln sich CTCs aufgrund ihrer ähnlichen Dichte wie PBMCs zusammen mit diesen in einer Schicht oberhalb des Gradienten. Erythrozyten und Granulozyten migrieren aufgrund einer größeren Dichte durch den Gradienten und sammeln sich darunter am Boden des Reaktionsgefäßes (Bøyum et al., 1991; Morgan et al., 2007; Phillips et al., 2012). Der Nachteil des Ficoll-Gradienten liegt in der unspezifischen Anreicherung der Zellen, die sich bei unsachgemäßer Anwendung auch in anderen Schichten des Gradienten ansammeln können.

Beim OncoQuick®-Verfahren werden die CTCs aufgrund eines speziellen Trennmediums und einer porösen Trennscheibe zusammen mit Thrombozyten angereichert (Müller et al., 2005). Die Trennscheibe verhindert, im Gegensatz zur Verwendung von Ficoll, eine Kreuzkontamination der verschiedenen Zellschichten (Sun et al., 2011).

Eine interessante Möglichkeit CTCs über ihre Dichte anzureichern, bietet die Leukapherese, ein Verfahren, welches unter anderem zur Gewinnung von Blutstammzellen, die in der Behandlung von Leukämien Verwendung finden, genutzt wird (Greene et al., 2012). Mithilfe der Leukapherese können WBCs (*white blood cells*, weiße Blutkörperchen, Leukozyten) bzw. PBMCs aus dem Blut eines Patienten angereichert und isoliert werden. In herkömmlichen Anreicherungsverfahren wie der Dichtegradientenzentrifugation oder dem CellSearch®-System können nur geringe Mengen Blut eines Patienten eingesetzt werden (CellSearch® ≈ 7.5 ml). Ein Vorteil der Leukapherese gegenüber diesen Methoden besteht darin, dass das gesamte Blutvolumen eines Patienten mehrfach prozessiert werden kann (Eifler et al., 2011; Fischer et al., 2013). Aufgrund dessen kann die Anzahl der gewonnenen WBCs und somit auch die der CTCs erheblich gesteigert werden. Um mehr CTCs für klinische Untersuchungen der systemischen Erkrankung zu gewinnen, bietet die diagnostische Leukapherese (DLA) eine gute Möglichkeit. Hierbei werden bis zu 6 l Blut eines Patienten prozessiert. Im Durchschnitt werden 2.3 ml der DLA-Probe analysiert, was einem Blutvolumen von ca. 60 ml entspricht (Fischer et al., 2013).

1.7.4 Anreicherung von CTCs basierend auf der Zellgröße

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von CTCs bietet die Größenselektion, da CTCs mit einer Größe von 8-11 µm in der Regel größer als Blutzellen sind. Hierzu können filterbasierte Methoden eingesetzt werde. Das ISET-Verfahren (*Isolation by Size of Epithelial*

Tumor Cells) verwendet einen Filter mit einer Porengröße von 8 µm und ermöglicht die Färbung der Zellen direkt auf dem Filter oder auch die Isolierung der Zellen für anschließende molekulare Untersuchungen (Vona et al., 2000). Da es aber auch durchaus möglich ist, dass CTCs kleiner als normale Epithelzellen sind (Marrinucci et al., 2007), könnten solche CTCs mit dieser Methode nicht erfasst werden. Eine Weiterentwicklung, welche die unterschiedlichen Größen der CTCs berücksichtigt, wurde von der Gruppe um Mohamed entwickelt (Mohamed et al., 2009). Bei dieser Methode läuft die Blutprobe durch Kanäle, deren Durchmesser von anfangs 20 µm stufenweise bis auf 5 µm abnimmt. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass sie eine schnelle Isolierung der CTCs bieten. Ein Nachteil dieser Verfahren könnten die Scherkräfte während der Filtration sein, denen die Zellen ausgesetzt sind und die zur Zerstörung und damit Nichtnachweisbarkeit von CTCs führen können.

1.7.5 Mikrofluidik-basierte Systeme

Um CTCs effektiver erfassen zu können, werden in letzter Zeit Mikrofluidikansätze verfolgt, mit deren Hilfe im Zell-Maßstab Sortierungen und Anreicherungen erreicht werden können (Dong et al., 2013). Ein wichtiger Durchbruch auf diesem Gebiet war die Entwicklung des sogenannten CTC-Chips (Nagrath et al., 2007). Auf dem CTC-Chip der ersten Generation befanden sich mit Antikörpern beschichtete Microposts, welche die Oberfläche und somit die Interaktionsfläche der Zellen mit den Antikörpern vergrößern. Die Blutprobe eines Patienten wird unter konstanten Flussbedingungen an den antikörperbeschichteten Microposts vorbeigeführt. CTCs, die z. B. das Oberflächenmolekül EpCAM exprimieren, können so auf der Plattform arretieren und von den übrigen Zellen getrennt werden (Nagrath et al., 2007). Eine Weiterentwicklung dieser Mikrofluidikmethode ist der sogenannte *herringbone chip*. Dieser erhöht die Anzahl der Interaktionen der CTCs mit der antikörperbeschichteten Oberfläche durch passives Durchmischen der Zellen aufgrund eines veränderten Aufbaus des CTC-Chips (Stott et al., 2010). Vorteile dieser Methoden liegen darin, dass die Zellen nicht fixiert werden müssen und somit nach der Behandlung noch kultiviert werden können (Zhang et al., 2014). Nachteile dieser Methoden liegen im geringen prozessierbaren Probenvolumen von maximal 5 ml und in einer maximalen Durchflussgeschwindigkeit von 2.5 ml/h für eine gute Wiederfindungsrate (Nagrath et al., 2007; Stott et al., 2010).

Ein weiteres Verfahren, bei dem Mikrofluidik mit klassischer immunomagnetischer Anreicherung kombiniert wird, ist das automatisierte Isoflux-System der Fa. Fluxion (Harb et al., 2013). Der Mikrofluidikansatz sorgt dafür, dass mit Magnetpartikeln beladene Zellen effektiver dem magnetischen Feld ausgesetzt werden und so besser aus dem Blut isoliert werden können. Die angereicherten CTCs sind noch lebend und können in Zellkulturversuchen eingesetzt werden. Mit diesem Verfahren können verschiedene Antikörper zur CTC-Isolation eingesetzt und sogar kombiniert werden, wobei der Standard die EpCAM-basierte Isolation ist.

1.7.6 Detektion über Immunfluoreszenzfärbung

Da die Anreicherungen über die Größe oder Dichte sehr unspezifisch sind bzw. positiv oder negativ immunangereicherte Zellpopulationen immer Zellkontaminationen enthalten, werden mithilfe nachgeschalteter Verfahren die CTCs innerhalb der angereicherten Zellen bestimmt.

Das sehr häufig verwendete CellSearch®-System, an dessen Versuchsaufbau sich viele andere Verfahren orientieren, kombiniert die immunomagnetische Anreicherung von CTCs über EpCAM (1.7.2) mit der anschließenden Detektion der Expression von Cytokeratinen. Nach der Fixierung und immunomagnetischen Anreicherung über magnetische EpCAM-Partikel werden die Zellen permeabilisiert und gegen Cytokeratine gefärbt. Um restliche Leukozyten erkennen und von epithelialen Zellen differenzieren zu können, werden die Zellen mit einem CD45-Antikörper gegengefärbt (Yu et al., 2011). Durch eine zusätzliche Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) können falsch-positive Signale, die nicht von Zellen ausgehen, ausgeschlossen werden (Cristofanilli et al., 2004). Bei der anschließenden semiautomatischen Fluoreszenzmikroskopie müssen die vom System vorgeschlagenen CTCs vom Anwender noch einmal überprüft werden (Franken et al., 2012). Ein möglicher Nachteil dieser Methode ist, dass aufgrund der Fixierung keine lebenden Zellen detektiert werden können. Darüber hinaus werden Zellen von der anschließenden Analyse ausgeschlossen, die EpCAM-negativ sind (Sieuwerts et al., 2009) (siehe 1.7.1). Anreicherungen und molekulare Analysen von CTCs, die auf diesen Markern basieren, erfassen womöglich viele CTCs nicht. Dadurch könnten wertvolle Zellen und Informationen, die aus dieser Zellpopulation gezogen werden können, verloren gehen.

1.7.7 PCR-basierte Detektionsverfahren

Der sogenannte AdnaTest kombiniert die immunomagnetische Zellseparation mit einer anschließenden Gen-Expressionsanalyse der potentiell angereicherten CTCs in einer Multiplex-RT-PCR. An Magnetpartikel gekoppelte Antikörper binden an epitheliale und tumorassoziierte Marker von CTCs, so dass diese in einem Magnetpartikelkonzentrator von unmarkierten Blutzellen in einer Patientenprobe getrennt und isoliert werden können (Aktas et al., 2009). Nach der Lyse der CTCs wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und die Expression epithel- und tumorassoziierter Gene in einer Multiplex-PCR untersucht (Tewes et al., 2009; Zieglschmid et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Spezifität des AdnaTests sehr hoch ist, da in Kontrollproben ohne Tumorzellen keine Expression tumorassoziierter Transkripte nachgewiesen werden konnte (Zieglschmid et al., 2005). Die Expressionsanalyse tumorassoziierter Gene kann u. a. bei der Auswahl der richtigen Therapie helfen. Bei Mammakarzinom-Patientinnen konnte gezeigt werden, dass CTCs ein anderes Expressionsprofil aufwiesen als der Primärtumor. Bei Patienten mit HER2-negativen Primärtumoren wurden HER2-positive CTCs detektiert (Fehm et al., 2010). Die Umstellung auf eine anti-HER2-Therapie aufgrund solch eines Befundes könnte zu einer Verbesserung der Therapie des Patienten beitragen. Ein Nachteil des AdnaTests ist, dass die Zellen nach der Anreicherung für die weitere Analyse lysiert werden müssen und somit für Untersuchungen lebender Zellen nicht mehr zur Verfügung stehen.

1.7.8 Alternative Detektionsverfahren für CTCs

Viele der erwähnten Methoden verwenden EpCAM zur Anreicherung der CTC-haltigen Zellpopulation aus Patientenproben. EpCAM ist zwar auf den meisten Tumoren exprimiert, doch da auch Tumoren heterogen sind (Giaretti et al., 1996; Macintosh et al., 1998), ist es möglich, dass nicht alle CTCs EpCAM-positiv sind. Darüber hinaus kann die EMT oder die Methylierung des EpCAM-Promotors zu einer verminderten EpCAM-Expression führen (1.7.1). Anreicherungsmethoden, die ohne die Verwendung epithelialer Marker auskommen, sind zu unspezifisch, so dass diese Einschränkungen in den Methoden die Entwicklung markerunabhängiger Verfahren fordern. Neben den relativ neuen filterbasierten Systemen, die noch weiterentwickelt werden, gibt es derzeit virusbasierte Detektionssysteme, die auf diesem Forschungsgebiet etabliert werden. Viren finden bereits in der Gentherapie ein großes Anwendungsgebiet. Bei der Gentherapie haben die Viren die Aufgabe bestimmte

Zelltypen zu infizieren, vergleichbar mit der Detektion von gestreuten Tumorzellen im Blut. Zu den wichtigsten eingesetzten Virustypen gehören Adenoviren.

1.7.8.1 Humane Adenoviren

Humane Adenoviren, wie in Abbildung 1.3 dargestellt, sind nichtbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren. Das Capsid besteht hauptsächlich aus Hexonproteinen, Pentonbasisproteinen und Fiberproteinen, an deren Ende die sogenannte Knob-Domäne sitzt (Arnberg, 2012; Benihoud et al., 1999; Russell, 2000, 2009). Es wurden bisher 54 humanpathogene Adenoviren identifiziert und in sieben Subtypen (A-G) unterteilt (http://www.vmri.hu/~harrach/AdVtaxlong.htm). Sie rufen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts, der Harnwege und der Bindehaut des Auges hervor (Bergelson et al., 1997; Persson et al., 2009).

In der Gentherapie werden bevorzugt adenovirale Vektoren eingesetzt. Sie besitzen ein breites Wirtszellspektrum, was für ihre unterschiedlichen Anwendungsgebiete von Vorteil ist (Cupelli and Stehle, 2011). Sie können in hohen Titern hergestellt werden, können viel Fremd-DNA aufnehmen und infizieren im Gegensatz zu anderen Viren sowohl sich teilende als auch sich nichtteilende Zellen (Arnberg, 2012; Mathis et al., 2006). Darüber hinaus integrieren Adenoviren nicht in das Genom der Zelle, so dass das virale Genom episomal bleibt (Thomas et al., 2003). Somit wird das eingebrachte Transgen nur transient exprimiert (Robbins et al., 1998).

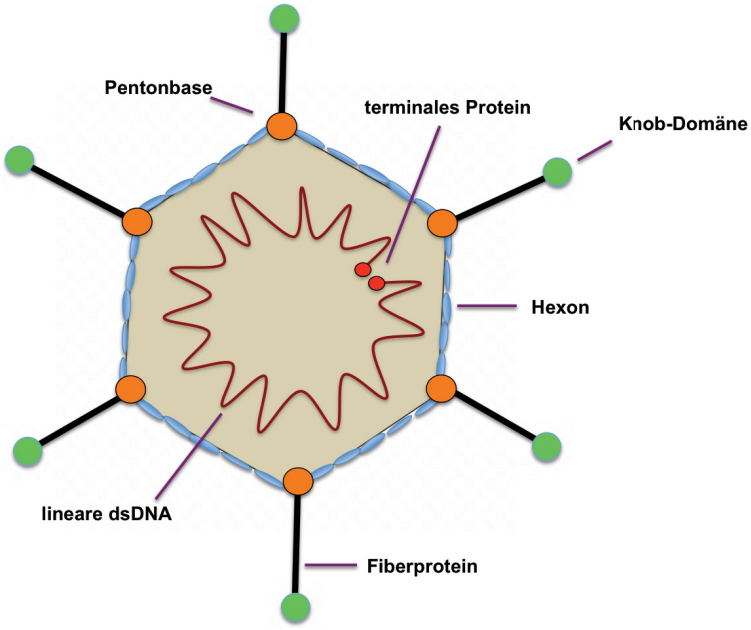


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Adenovirus. Das Capsid des Adenovirus hat keine Hülle und weist eine ikosaedrische Struktur auf. Es besteht hauptsächlich aus Hexonproteinen. Aus jeder Pentonbase

entspringt ein Fiberprotein, an dessen Ende die Knob-Domäne sitzt. Das Adenovirus besitzt ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül.

Die meisten in der Gentherapie verwendeten adenoviralen Vektoren basieren auf dem Adenovirus Typ 5 (Ad5). Dieses Virus gehört zur Spezies C und bindet wie die Viren der Spezies A, D, E und F der humanen Adenoviren mit seiner Knob-Domäne an den zellulären Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997; Roelvink et al., 1998). CAR ist ein Transmembranprotein, welches an den *tight* und *adherens junctions* von Epithelzellen lokalisiert ist und dort als Zelladhäsionsmolekül wirkt (Cohen et al., 2001; Morton et al., 2013). Somit besitzt das Ad5-Virus einen natürlichen Tropismus für epitheliale Zellen (Reeh et al., 2013). Diese Eigenschaften kann man sich bei der Detektion von CTCs zu Nutze machen, so dass CTCs markerunabhängig detektiert werden können. Zwar wurde in Tumoren der Brust und der Lunge eine Zunahme der CAR-Expression gezeigt (Martin et al., 2005; Wang et al., 2006), dennoch kann die Expression von CAR in einigen Tumorentitäten auf den Tumorzellen herunterreguliert sein, insbesondere wenn die Erkrankung weiter fortgeschritten ist (Anders et al., 2009; Korn et al., 2006; Matsumoto et al., 2005; Wunder et al., 2012). Um dieses Problem zu umgehen und die Effektivität der Infektion mit diesen Viren zu verbessern, wurde hierfür der Tropismus der Viren verändert. So wurde beispielsweise die Knob-Domäne des Ad5-Virus durch die Knob-Domäne des Adenovirus Typ 3 substituiert (Ad5/3) (Kanerva et al., 2002; Kawakami et al., 2003). Dieses tropismusmodifizierte Virus bindet über die Knob-Domäne von Ad3 an Desmoglein 2 (DSG2) (Sirena et al., 2004; Trinh et al., 2012; Wang et al., 2011, 2012). DSG2 ist ein Bestandteil der Desmosomen, die eine Struktur der Zell-Zell-Kontakte sind (Yashiro et al., 2006). Die Desmosomen und somit auch DSG2 kommen vornehmlich in Epithelzellen vor (Wang et al., 2012). Es konnte jedoch auch hier gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von DSG2 beim Magen- und Prostatakarzinom auftreten kann (Barber et al., 2014; Biedermann et al., 2005; Yashiro et al., 2006). Beim Ösophaguskarzinom hat die Expression von DSG2 hingegen keine prognostische Relevanz (Fang et al., 2014). Eine verstärkte DSG2-Expression wurde in invasiven Plattenepithelkarzinomen der Haut und in Prostatakarzinom-Zelllinien mit hohem metastatischen Potential gefunden (Kurzen et al., 2003; Trojan et al., 2005). Darüber hinaus gibt es widersprüchliche Arbeiten über CD46 (auch bekannt als Membran-Kofaktor-Protein, MCP) als weiteren möglichen Rezeptor für Ad3 (Sirena et al., 2004; Trinh et al., 2012; Tuve et al., 2006; Wang et al., 2011). CD46 ist ein Transmembranprotein, welches als

Kofaktorprotein wirkt und ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird (Seya et al., 1999). In Kolonkarzinomen ist CD46 hochreguliert (Shang et al., 2014) und Mammakarzinome exprimieren ebenfalls hohe CD46-Level (Madjd et al., 2005).

Da es möglich ist, dass CTCs sich in der Zirkulation in einem ruhenden Zustand befinden (Müller et al., 2005), könnten mit Adenoviren auch speziell solche ruhenden Tumorzellen detektiert werden, die durch konventionelle Chemotherapien nicht eliminiert werden können (Braun et al., 2000). Tatsächlich wurde bereits über erste Versuche der Detektion von CTCs mit viralen Vektoren berichtet. So hat die Gruppe um Kojima zur Detektion von CTCs ein GFP-tragendes Adenovirus verwendet. Hier wurde durch einen Telomerasepromotor gewährleistet, dass die Expression von GFP nur in Tumorzellen stattfindet (Kojima et al., 2009). Der Vorteil dieser Detektionsmethode liegt darin, dass die Expression des Transgens nur in lebenden Zellen stattfinden kann. Ein weiteres virus-basiertes Nachweissystem wurde von der Gruppe um Wang verwendet. Hier kam kein adenovirales System zur Anwendung, sondern ein Kuhpockenvirus (Wang et al., 2013). In diesen beiden neuartigen Verfahren wurden zur Detektion von CTCs also nicht die bekannten epithelialen Marker verwendet, sondern es wurden die natürlichen Eigenschaften von Viren ausgenutzt. Jedoch hatten beide bislang publizierten virusbasierten Systeme den Nachteil, dass die Viren replikativ sind, d. h. sich in den Zielzellen vermehren können. Infizierte Zellen werden somit durch den lytischen Zyklus der Viren im Zuge der Virusvermehrung zerstört. Damit sind die Kultivierungsversuche oder andere Experimente, bei denen vitale Zellen benötigt werden, ausgeschlossen. Durch rechtzeitige Fixierung kann mit diesen Ansätzen zunächst nur die Anzahl infizierter CTCs bestimmt werden.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) im Blut gelten als Vorläuferzellen der Metastasen. Daher ermöglicht deren Analyse einen direkten Zugang zur systemischen Erkrankung. CTCs eröffnen die Perspektive, den systemischen Verlauf einer Krebserkrankung möglichst früh, schon vor dem Auftreten einer manifestierten Metastase, zu erkennen. Darüber hinaus bietet die sequenzielle Analyse der CTCs die Möglichkeit, den Verlauf einer systemischen Therapie zu beobachten, zu bewerten und gegebenenfalls die bereits angewendete Therapie zu ändern. Durch molekulare Analysen von CTCs könnten die biologischen Eigenschaften dieser Zellen untersucht und somit neue therapeutische Ziele zur Bekämpfung der systemischen Tumorerkrankung entdeckt werden. Jedoch ist die Detektion und Isolation der CTCs nach wie vor sehr herausfordernd, was in der extremen Seltenheit dieser Zellen begründet ist. Keines der bislang etablierten Nachweissysteme kann als optimal bezeichnet werden und es ist nach wie vor kaum möglich, CTCs vital zu isolieren und *ex vivo* zu kultivieren. Darüber hinaus ist EpCAM, das am häufigsten verwendete epitheliale Antigen zur Isolation von CTCs aus dem Blut, häufig auf CTCs herunterreguliert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein neues, EpCAM-unabhängiges Isolationsverfahren für vitale CTCs zu etablieren. Dies sollte mithilfe von Adenoviren erreicht werden, die einen natürlichen Tropismus für epitheliale Zellen aufweisen. Hierfür wurden zwei humane Adenoviren, die aus der Gentherapie bekannt sind, verwendet. Das Ad5-Virus, welches Epithelzellen über CAR infiziert, und das tropismusmodifizierte Ad5/3-Virus. Zur Markierung der CTCs sollte über die viralen Vektoren EGFP bzw. GFP in den infizierten Zellen exprimiert werden. Da diese Proteine nur in lebenden Zellen exprimiert werden, sollten mithilfe der Adenoviren nur Zellen markiert werden, die zum Zeitpunkt der Infektion vital waren. Um eine weitere Kultivierung infizierter Zellen zu ermöglichen, sollten hier replikationsinkompetente Viren getestet werden, die keinen lytischen Zyklus aufgrund einer Virusvermehrung in den CTCs verursachen.

2 MATERIAL

2.1 Verbrauchsmaterialien

6-Well Platten	Corning
24-Well Platten	Corning
96-Well PCR-Platten	Bio-Rad
96-Well Platten	Corning
Bakterienkulturschalen	Greiner bio-one
Blutentnahmeröhrchen, heparinhaltig	BD
Blutentnahmeröhrchen, EDTA-haltig	BD
CellTrics® Filter, 50 µm	Partec
Chamber Slides	Nunc™
Kryogefäß	Nunc™
Deckgläser	Engelbrecht
Dispenser	Starlab
FACS-Röhrchen, 5 ml	BD
Mikro-Hämatokrit-Kapillare	BRAND
Injektionskanüle Gr.1, 20 G	Braun
Objektträger	Engelbrecht
Omnifix®-Spritze, 10 ml	Braun
Omnifix®-Feindosierungsspritze, 1 ml	Braun
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen, 2.5 µl	Biozym
Reaktionsgefäß, 0.2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 1.5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße ambra, 1.5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	BD
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt
Spritzenfilter, 0.2 µm	Merck Millipore
Spritzenfilter, 0.45 µm	Merck Millipore
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one

2.2 Chemikalien, gebrauchsfertige Reagenzien und Puffer

1-Butanol	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®
AB-Serum	Biotest
Acetonitril	Sigma-Aldrich®
Agar	Sigma-Aldrich®
Agarose	Sigma-Aldrich®
Ammoniumchlorid	Apotheke Universitätsklinikum Düsseldorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich®
Aqua dest. (Delta Select)	Braun
ATP, 100 mM	Roche
DMSO	Sigma-Aldrich®
dNTP Mix, 10 x	Agilent
dNTP Mix, 10 mM	Roche
dNTPs, 100 mM	GE healthcare
DPBS (PBS), 1 x	Gibco®
Ethanol, 99 %, unvergällt	Merck
Ethidiumbromid	Carl Roth®
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
FACS-Clean	BD
FACS-Flow	BD
FACS-Rinse	BD
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare
GelRed™, 10,000 x	Biotium
Glo Lysis Puffer, 1 x	Promega
Glukose	Sigma-Aldrich®
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	BD
Human Reference DNA Female	Agilent
Human Reference DNA Male	Agilent
Humanalbumin (Human Serum Albumin, HSA)	Octapharma
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich®
Kaliumacetat	Fluka®
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich®
Magnesiumacetat	Fluka®
Magnesiumchlorid hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat heptahydrat	Merck
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich®
Natriumchlorid	Polysciences
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich®
Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1	Agilent Technologies
Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2	Agilent Technologies
Paraformaldehyd (PFA)	Merck

Propidiumiodid (PI)	Invitrogen®
Proteinase K	Roche
Salzsäure, 5 mol/l	Merck
SeaPlaque® Agarose	Lonza
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck
Stabilisation and Drying Solution	Agilent Technologies
Tris-EDTA (TE), 1 x, pH 8.0	Promega
Tris-Acetat	Fluka®
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 10 x	Sigma-Aldrich®
Trypanblau Färbelösung, 0.4 %	Gibco®
Trypton	BD
Tween-20	Sigma-Aldrich®
Wasser, nukleasefrei	Gibco®
X-tremeGENE HP Transfektion Reagent	Roche

2.3 Angesetzte Lösungen und Puffer

AB-Serum, 10 %	1 x DPBS, 10 % (v/v) AB-Serum
AB-Serum, 20 %	1 x DPBS, 20 % (v/v) AB-Serum
Ammoniumchloridlösung	8.29 mg/ml NH_4Cl, 1 mg/ml $KHCO_3$, 0.0375 mg/ml Na-EDTA, H_2O, pH 7.4
Ethanol, 70 %	70 % (v/v) Ethanol (unvergällt), H_2O
Ethidiumbromidfärbelösung	0.1 ‰ in H_2O
Glycerin, 10 %	10 % (v/v) Glycerin, H_2O
Igepal, 10 %	Igepal 1:10 mit H_2O verdünnen
Kryolösung	70 % (v/v) Wachstumsmedium, 20 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) DMSO
LB-Agar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 8 g Agar, H_2O, pH 7.3, autoklavieren, abkühlen lassen, Antibiotikum hinzufügen
LB-Medium nach Lennox	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, H_2O, pH 7.3, autoklavieren
MTT-Fixierungslösung	5 % (v/v) 1-Butanol, 95 % (v/v) SDS (10 %), 0.01 M HCL
MTT-Reagenz	5 mg/ml in 1 x DPBS, steril filtriert
One Phor All Buffer (OPA)	12.5 g Tris-Acetat, 50 ml Magnesiumacetat, 50 ml Kaliumacetat, auf 500 ml H_2O, steril filtriert
PBS-Puffer	1 x DPBS, 2 mM EDTA, 0.5 % HSA
PFA, 4 %	4 g PFA in 50 ml H_2O + 1 ml 1 M NaOH, bei 65°C lösen, 10 ml 10 x PBS hinzufügen und abkühlen lassen, pH-Wert auf 7.4 mit 1 M HCL einstellen und mit H_2O auf 100 ml auffüllen, durch 0.45 µm Filter filtrieren
SOC-Medium	0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 10 mM MgSO4 $7H_2O$, 20 mM Glukose
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 1 x	1:10 mit H_2O verdünnen

Tween, 10 %	Tween-20 1:10 mit H_2O verdünnen
Viruslysispuffer	0.5 % (w/v) SDS in 1 x TE

2.4 Zellkulturmedien, Zusätze, Puffer

Alle in der Zellkultur verwendeten Lösungen wurden von der Fa. Gibco® bezogen. Das in den Versuchen verwendete 1 x DPBS wird im Folgenden als PBS bezeichnet.

DMEM (1 x), GlutaMAX™-I, 1 g/l Glukose
DMEM (1 x), GlutaMAX™-I, 4.5 g/l Glukose
DPBS, 1 x
FBS
McCoy‘s 5A (1 x), L-Glutamin
MEM Vitamine
RPMI 1640 (1 x), GlutaMAX™-I
Trypsin 0.05 % (w/v)/EDTA 0.02 % (w/v)

2.5 Kits

AdEasy™ Adenoviral Vector System	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Amicon® Ultra 0.5 Kit	Millipore
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Expand Long Template PCR System	Roche
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit	Agilent Technologies
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoKine
QIAamp® DNA Blood Midi Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
SureTag DNA Complete Labeling Kit	Agilent Technologies
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
ViraBind™ Adenovirus Purification Kit	Cell Biolabs
Zenon® Alexa Fluor® 555 Mouse IgG1 Labeling Kit	Life Technologies®

2.6 Enzyme

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme.

Name	Erkennungssequenz	Firma
*Hind*III	A^AGCTT	Roche
*Bam*HI	G^GATCC	Roche
*Not*I	GC^GGCCGC	Roche
*Eco*RI	G^AATTC	Roche
*Pac*I	TTAAT^TAA	NEB
*Pme*I	GTTT^AAAC	NEB
*Mse*I	T^TAA	NEB
*Sal*I	G^TCGAC	Roche

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Enzyme.

Name	Firma
Antarktische Phosphatase (5 U/µl)	NEB
DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 x)	Thermo Scientific
Exo (-) Klenow Fragment	Agilent Technologies
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	Roche
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	Roche
Proteinase K	Roche
Protease	Qiagen

2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. Eurofins MWG Operon bezogen. Alle Primer für die Real-Time-PCR wurden mithilfe des *Universal Probe Library Assay Design Center*, Probe Finder Version 2.45 der Fa. Roche entwickelt.

Tabelle 2.3: In der quantitativen Real-Time RT-PCR eingesetzte Oligonukleotide. bp: Basenpaare; for: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer, #: Nummer.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Produkt (bp)	Sonde
CXADR for	TGTCGTAAAAAGCGCAGAGA	103	#10
CXADR rev	AGCTTCTGGCAGTGGACGTA		
HPRT1 for	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	102	#73
HPRT1 rev	CGAGCAAGACGTTCAGTCCT		
TBP for	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	78	#3
TBP rev	CACACGCCAAGAAACAGTGA		
GAPDH for	AGCCACATCGCTCAGACAC	66	#60
GAPDH rev	GCCCAATACGACCAAATCC		

Tabelle 2.4: In der primären, Kontroll- und Multiplex-PCR eingesetzte Oligonukleotide. bp: Basenpaare; for: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Produkt (bp)
LIB1	AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT	
ddMSE11	TAACTGACAGCdd	
CK19 for	GAAGATCCGCGACTGGTAC	621
CK19 rev	TTCATGCTCAGCTGTGACTG	
TP53 2/3 for	GAAGTGTCTCATGCTGGATC	301
TP53 2/3 rev	CAGCCCAACCCTTGTCCTTA	
CADPS for	CCCCACCCTTCTTCACTACA	175
CADPS rev	GTGTGCACATACCACCGAAG	
DNAH9 for	GGGTCTCATCACCAGCATTT	401
DNAH9 rev	GCCATCTTCCACATGGTCTT	
GRIK5 for	CTAGCTCCCACCAACCTCAG	232
GRIK5 rev	CTCGATGATCCCGTTGATCT	
LAMC1 for	TCTGCTTTGGGCATTCTTCT	111
LAMC1 rev	TTCTAACAGGTTGGGGGATG	
NEK9 for	GCAGGAGGGAACCTGTATGA	288
NEK9 rev	CAGGAAAGAAAGCCCACAGA	
PICK1 for	TCGTATGCTGGAGTCCTGTG	358
PICK1 rev	GGGATGGCTTTGTTGAGGTA	

Tabelle 2.5: Primerkonzentrationen für den Primer-Mix (10 x) der Multiplex-PCR.

Oligonukleotid	Konzentration
CADPS for CADPS rev	0.8 µM
DNAH9 for DNAH9 rev	0.8 µM
GRIK5 for GRIK5 rev	1 µM
LAMC1 for LAMC1 rev	2 µM
NEK9 for NEK9 rev	1 µM
PICK1 for PICK1 rev	0.8 µM

Darüber hinaus wurden bei der cDNA-Synthese Oligo(dT)$_{12\text{-}18}$-Primer der Fa. Invitrogen eingesetzt.

2.8 Antikörper

In Tabelle 2.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 2.6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Verwendung als	Firma
CAR, mouse, anti-human (1 mg/ml)	Primärantikörper	Abcam
CD45, mouse, anti-human (1 mg/ml)	Primärantikörper	Exbio
Alexa Fluor® 488, goat, anti-mouse (2 mg/ml)	Sekundärantikörper	Life Technologies™

Zum Konjugieren des CD45-Antikörpers mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 555 wurde das Zenon® Alexa Fluor® 555 Mouse IgG1 Labeling Kit der Fa. Life Technologies™ verwendet.

2.9 Agarose-Gele und DNA-Leitern

2.9.1 Agarose-Gele

0.8 %iges Agarose-Gel	1 x TBE-Puffer + 0.8 % Agarose, aufkochen, nach Elektrophorese Inkubation in Ethidiumbromid-Färbelösung (0.1 ‰ in H_2O) für 10 min, 60°C
1.5 %iges Agarose-Gel	1 x TBE-Puffer + 1.5 % Agarose, aufkochen, mit 0.1 ‰ GelRed™ versetzen
1.5 %iges Agarose-Gel	1 x TBE-Puffer + 1.5 % Agarose, aufkochen, nach Elektrophorese Inkubation in Ethidiumbromid-Färbelösung (0.1 ‰ in H_2O) für 10 min, 60°C

2.9.2 DNA-Leitern

In dieser Arbeit wurden die in Abbildung 2.1 dargestellten DNA-Leitern der Firmen Eurogentec und Fermentas verwendet.

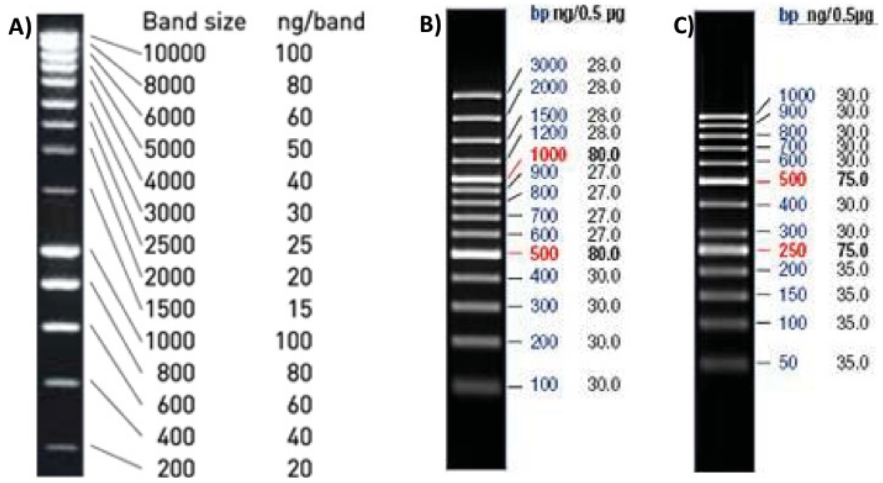


Abbildung 2.1: Darstellung der verwendeten DNA-Leitern in dieser Arbeit. A) SmartLadder (Eurogentec) **B)** GeneRuler™ 100 bp Plus (Fermentas) **C)** GeneRuler™ 50 bp (Fermentas**).**

2.10 Bakterienstämme

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten *E. coli*-Stämme und ihr Genotyp.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
BJ5183	*end*A1 *sbc*BC *rec*BC *gal*K *met thi*-1 *bio*T *hsd*R (Str^r)	AG Niederacher
DH5 α	F- ϕ 80*lac*Z Δ M15 Δ (*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_κ^-, m_κ^-) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1	AG Niederacher
JM101	F´ *traD36 proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} Δ *(lacZ)M15/* Δ *(lac-proAB) glnV thi*	AG Niederacher

2.11 Plasmide

Tabelle 2.8: Auflistung der Plasmide, die in den Klonierungsversuchen verwendet wurden.

Plasmidname	Beschreibung	Bezugsquelle
S11EG	Spenderplasmid, liefert *EGFP*	AG Niederacher
pShuttle-CMV	Transferplasmid, bringt *EGFP* über homologe Rekombination in pAdEasy-1	AG Niederacher
pAdEasy-1	adenovirales Empfängerplasmid, beruht auf Adenovirus Typ 5, ΔE1ΔE3, Grundlage zur Herstellung adenoviraler Partikel	Agilent Technologies

2.12 Adenoviren

Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Adenoviren.

Virus	Beschreibung	Bezugsquelle
Ad5/3GFP	basierend auf Adenovirus Typ 5, Knob-Domäne durch die von Adenovirus Typ 3 ausgetauscht, *GFP* unter CMV-Kontrolle	Igor Dmitriev und David Curiel (Washington University, St. Louis)
Ad5/3CMVLuc	basierend auf Adenovirus Typ 5, Knob-Domäne durch die von Adenovirus Typ 3 ausgetauscht, *Luc* (Luziferase) unter CMV-Kontrolle	AG Niederacher
Ad5EGFP	basierend auf Adenovirus Typ 5, aus den in Tabelle 2.8 beschriebenen Plasmiden hergestellt (Plasmidname: pAdEasy-1-CMV-EGFP)	

2.13 Zelllinien

Tabelle 2.10: Beschreibung der verwendeten Tumorzelllinien und der Zelllinie HEK293. DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, ATCC = *American Type Culture Collection*, ECACC = *European Collection of Cell Cultures*, FBS = *Fetal Bovine Serum*.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Zusatz	Bezugsquelle
MDA-MB-231	Mamma	DMEM (1 g/l Glukose)	10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Vitamine	ATCC
SK-OV-3.ip	Ovarial	RPMI1640	10 % (v/v) FBS	Drs. Judy Wolf and Janet Price (The University of Houston, TX)
CACO-2	Kolorektal	RPMI1640	10 % (v/v) FBS	DSMZ
COLO205	Kolorektal	RPMI1640	10 % (v/v) FBS	ECACC
PC-3	Prostata	RPMI1640	10 % (v/v) FBS	ATCC
DU-145	Prostata	RPMI1640	10 % (v/v) FBS	ATCC
KYSE-30	Ösophagus	RPMI1640	10 % (v/v) FBS	DSMZ
HEK293	Niere	DMEM (4.5 g/l Glukose)	5 % (v/v) FBS	ATCC

2.14 Oligonukleotid-Arrays und Zubehör

Human Genome CGH Microarray, 4 x 180 k	Agilent Technologies
Hybridization Backing Slide	Agilent Technologies
Hybridization Chamber SureHyb	Agilent Technologies
Ozone-Barrier Slide Cover and Slide Holder	Agilent Technologies

2.15 Geräte

2.15.1 Waagen

Analysenwaage	Kern & Sohn GmbH
Feinwaage Voyager® Pro	Pro Ohaus

2.15.2 Zentrifugen

5417R	Eppendorf
5810R	Eppendorf
Fresco 17	Thermo Heraeus
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
MiniSpin®Plus	Eppendorf
Multifuge 4 KR	Heraeus Instruments
Universal 30RF	Hettich

2.15.3 Inkubatoren, Brutschränke, Sterilbänke

Brutschrank 6000	Heraeus Instruments
Hybridisierungsofen	Agilent Technologies
Inkubatoren	HERA
Schüttelinkubator 3033	GFL
Sterilbank	Thermo Electron Corporation
Sterilbank Lamin Air	Holten

2.15.4 PCR-Zykler

C1000™	Bio-Rad
Dyad Discipline	Bio-Rad
PTC-200	MJ Research
S1000™	Bio-Rad

2.15.5 Mikroskope

Axiovert 200	Carl Zeiss
DMIL	Leica

2.15.6 Sonstige Laborgeräte

Autoklav	D-65 Systec
Agilent 2100 Bioanalyzer Instruments	Agilent Technologies
CellTram	Eppendorf
Chip Priming Station	Agilent Technologies
Dispenser Pipetten	Eppendorf
DMZ-Universal Puller	Zeitz
Elektrophoresekammer GENEMate®	Starlab
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Bio-Rad
Elektroporationsküvette	Bio-Rad
ELISA-Reader Tecan Sunrise	Tecan
FACSCanto™ Durchflusszytometer	BD
Gefrierschränke	Thermo
Heizblock	Eppendorf
IKA Vortex Mixer	IKA
Infinite®200 Pro NanoQuant	Tecan
Kühlschränke	Thermo
Luminoskan Ascent Microplate Reader	Labsystem
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Microarray Scanner G2565CA	Agilent Technologies
Mikromanipulator	Eppendorf
MoFlo™ XDP Sorter	Beckman-Coulter
Molecular Imager®VersaDoc™ MP	Bio-Rad
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Brand
pH-Meter	HANNA Instruments
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac 300	Bio-Rad
Stickstofftank	Cryotherm
Thermomixer comfort	Eppendorf
TransferMan NK2	Eppendorf
Vortex Mixer	NeoLab
Wasserbad	NeoLab

2.16 Software

2100 Expert V B.02.08.SI648(SR2)	Agilent Technologies
Ascent Software V 2.4.2	Luminoskan
AxioVision V 4.8.1	Carl Zeiss MikroImaging
Disciple™ Desktop V 2.00	MJ Research
FACSDiva™ V 6.1.3	BD
Feature Extraction V 11.5.1.1	Agilent Technologies
Genomic Workbench V 7.0.4.0	Agilent Technologies

GraphPad Prism V 6.03	GraphPad Software
i-control™ V 1.9	Tecan
LAS V 3.7.0	Leica
Magellan Software V 6.6	Tecan
Microsoft® Excel V 2011	Microsoft Cooperation
Microsoft® PowerPoint V 2011	Microsoft Cooperation
Microsoft® Word V 2011	Microsoft Cooperation
Opticon Monitor V 3.1.32	Bio-Rad
Probefinder V 2.45	Roche
Quantity One V 4.5.0	Bio-Rad

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Alle in den Versuchen verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in 75 cm^2 Zellkulturflaschen in 0.2 ml Medium/cm^2 kultiviert. Das in Tabelle 2.10 angegebene Medium wird in dieser Arbeit als Wachstumsmedium bezeichnet. Als Infektionsmedium wird Medium bezeichnet, welches nur 2 % (v/v) FBS enthielt.

3.1.2 Passagieren von Zelllinien

Um die Zellen zu passagieren, wurden die adhärent wachsenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsinlösung (0.05 % (w/v)/EDTA (0.02 % (w/v)) im Brutschrank für 2-10 min inkubiert. Trypsin ist eine Serinprotease, welche die Spaltung von Proteinen und Peptiden katalysiert (Evnin et al., 1990). Dies führt zur Ablösung der Zellen vom Zellkulturgefäß. Die Wirkung der Trypsinlösung wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Wachstumsmedium abgestoppt und die Zellsuspension wurde mittels Zentrifugation für 5 min, 400 x g, Raumtemperatur (RT) sedimentiert, durch Resuspendieren vereinzelt und ihrem Wachstum entsprechend neu ausgesät bzw. nach der Bestimmung der Zellzahl (3.1.4) die entsprechende Anzahl der Zellen in die Versuche eingesetzt.

3.1.3 Kryokonservierung von Zelllinien

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff ermöglicht eine nahezu dauerhafte Lagerung von Zellkulturzellen. Diese können im Bedarfsfall wieder aufgetaut und erneut kultiviert werden.

3.1.3.1 Einfrieren von Zelllinien

Die Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben vom Zellkulturgefäß abgelöst und anschließend bei 4°C für 10 min und 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kryolösung resuspendiert, in ein Kryogefäß überführt und in einem Einfrierbehälter nach Herstellerangaben bei -80°C langsam eingefroren. Im Anschluss daran wurden die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.1.3.2 Auftauen von Zelllinien

Das Kryogefäß mit den gewünschten Zellen wurde dem Stickstoffbehälter entnommen und für ca. 1 min in der Hand aufgetaut. Diese Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß, in dem 9 ml Wachstumsmedium vorgelegt waren, überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei RT für 5 min und bei 400 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 7 ml Wachstumsmedium in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät. Sobald die Zellen eine ausreichende Dichte vorwiesen, wurden sie, wie unter 3.1.2 beschrieben, komplett in eine 75 cm^2 Flasche überführt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde nach Ernte der Zellen ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 mit einer Trypanblaulösung (0.4 %) gemischt. Tote Zellen erscheinen im Mikroskop blau, da die Trypanblaulösung durch die geschädigte Zellmembran dieser Zellen ins Zytosol gelangen kann. Lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran erscheinen hell und wurden gezählt. Hierzu wurden die Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension mithilfe der nachstehenden Formel berechnet:

$$\textbf{Zellzahl/ml} = n/z \times 10^4 \times \textbf{Verdünnungsfaktor}$$

n = Gesamtmenge gezählter Zellen
z = Anzahl gezählte Eckquadrate
Verdünnungsfaktor = Verhältnis Zellsuspension zu Trypanblau

3.2 RNA-/DNA-Analytik

3.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolierung von RNA *(ribonucleic acid,* Ribonukleinsäure) aus humanen Zelllinien, die als Grundlage für Gen-Expressionsanalysen diente, wurde das RNeasy® Mini Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die RNA-Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zusätzlich wurde nach dem ersten Waschschritt eine Desoxyribonuklease(DNase)-Behandlung mit dem Ribonuklease(Rnase)-Free DNase Set der Fa. Qiagen auf der Silicamembran der Aufreinigungssäule nach Herstellerangaben durchgeführt. Dies sollte sicherstellen, dass die gesamte genomische DNA, die falsche Rückschlüsse in den anschließenden Expressionsanalysen zuließe, eliminiert wurde. Die RNA wurde mit 30-50 µl nukleasefreiem Wasser von der Aufreinigungssäule eluiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (3.2.4). Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 cDNA-Synthese

Für die Erststrangsynthese der cDNA (*complementary DNA,* komplementäre DNA) wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Fa. Roche verwendet. Als Template diente RNA, die aus unbehandelten Zelllinien gewonnen wurde (3.2.1). Aus TGF-β1-behandelten Zellen und korrespondierenden unbehandelten Kontrollzellen isolierte RNA wurde durch die AG Gires (Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires, Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, HNO-Forschung, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde aus RNA mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, synthetisiert. Hierfür wurden Oligo$(dT)_{12\text{-}18}$-Primer der Fa. Invitrogen genutzt, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz der mRNA (*messenger RNA,* Boten-RNA) sind. Der zugefügte Protector RNase Inhibitor sollte die Spaltung von RNA durch eventuell vorhandene RNasen verhindern. Im verwendeten dNTP-Mix der Fa. Roche waren alle Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zu gleichen Anteilen (je 10 mM) vorhanden.

Für die Erststrangsynthese wurden maximal 2 µg RNA umgeschrieben. Die entsprechende RNA-Menge wurde zunächst mit nukleasefreiem Wasser auf 11 µl Gesamtvolumen verdünnt.

Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
RT-Puffer (5 x)	4
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	0.5
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	2
Oligo$(dT)_{12-18}$-Primer (0.05 µg/µl)	2
Reverse Transkriptase (20 U/µl)	0.5
RNA-Lösung	11

Die Erststrangsynthese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Dauer (min)	Schritt
RT	10	Annealing der Primer
55°C	30	Elongation der Primer
85°C	5	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
auf Eis	> 5	

3.2.3 Isolation genomischer DNA aus Zellkulturzelllinien

Für die unter 3.2.7 beschriebene STR-Analyse wurde DNA aus den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien isoliert. Für die Isolation wurde das QIAamp® DNA Blood Midi Kit der Fa. Qiagen verwendet. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Zellen wurden von einer 75 cm^2 Zellkulturflasche geerntet und in 2 ml PBS resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Probe wurde zu 200 µl Protease gegeben und gemischt. Für optimale Lysebedingungen wurden der Probe 2.4 ml Puffer AL hinzugefügt, 15-mal invertiert und ca. 1 min mittels Reagenzglasmixer vermischt, bis sich eine homogene Lösung bildete. Diese Suspension wurde 10 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Für eine optimale Bindung der DNA auf der Membran wurde das Lysat mit 2 ml 100 %igem Ethanol vermischt. Aus Kapazitätsgründen wurde das Lysat in zwei Schritten auf die Säule geladen und jeweils bei 1,810 x g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde 1-mal mit 2 ml Puffer AW1 bei 3,220 x g für 3 min und 1-mal mit 2 ml Puffer AW2 bei 3,220 x g für 15 min gewaschen. Nach Zugabe von 150-200 µl Elutionspuffer AE wurde die Säule zunächst 5 min inkubiert und anschließend für 3 min bei 3,220 x g eluiert. Die DNA-Konzentration wurde wie unter Punkt

3.2.4 beschrieben am NanoQuant gemessen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.4 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA und DNA zu bestimmen, wurde eine photometrische Messung bei 260 nm und 280 nm an einem Spektralphotometer durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl der RNA-Probe bzw. 1.5 µl der DNA-Probe auf die NanoQuant-Platte aufgetragen. Die Messung bei 260 nm erlaubt die Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration. Eine optische Dichte von 1 (OD_{260} = 1) entspricht ca. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA und 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der extrahierten Nukleinsäuren und eine eventuelle Kontamination mit Proteinen. Der Wert sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen (Sambrook and Russell, 2001).

3.2.5 Überprüfung der Qualität des WGA-Produkts mittels Fragmentlängenanalyse

Eine weitere Möglichkeit die Qualität des WGA (*whole genome amplification,* gesamtgenomische Amplifikation)-Produkts zu bestimmen, liegt in der Analyse der MSE-Fragmentlängen mithilfe des Bioanalyzer-Systems der Fa. Agilent Technologies. Es wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Die Analyse der Einzelzell-DNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Da die im Herstellerprotokoll angegebene Geschwindigkeit zum Mischen der Proben mit 2,400 UpM zu hoch war und ein Verschütten der Proben verursachte, wurde eine reduzierte Geschwindigkeit von 2,000 UpM angewendet. In die Analysen wurden 1 µl der amplifizierten Einzelzell-DNA eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der 2100 Expert-Software ausgewertet.

3.2.6 Quantitative Real-time-PCR

Die quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) stellt eine moderne Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren dar, die auf dem grundlegenden Prinzip der konventionellen PCR beruht.

Zusätzlich zum qualitativen Nachweis der Amplifikationsprodukte ermöglicht diese Methode eine Aussage über die Ausgangsmenge der zu untersuchenden Probe. Sie wird insbesondere zur Analyse von Gen-Expressionen eingesetzt. Durch ihre hohe Sensitivität ist sie besonders geeignet, wenn wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung steht oder geringe Änderungen in der Gen-Expression vorliegen (Pfaffl, 2001; Vandesompele et al., 2002). Sie wird z. B. zur Amplifikation von cDNA eingesetzt, die zuvor revers aus der RNA, die das Transkriptom darstellt, transkribiert wurde (Pfaffl, 2001).

In diesen Versuchen wurden Hydrolysesonden der Fa. Roche im sogenannten 5‘-Nuklease-Assay verwendet. Diese nur 8 bis 9 Nukleotide langen Sonden sind am 3’-Ende phosphoryliert, so dass sie nicht als Primer erkannt werden und nicht verlängert werden können. Am 5‘-Ende sind die Sonden mit dem Reporterfarbstoff Fluoreszein (FAM) markiert und am 3‘-Ende mit einem Quencher (Lee et al., 1993). Die Fluoreszenzemission des Reporters wird in der intakten Sonde durch räumliche Nähe zu dem an ihrem 3‘-Ende sitzenden Quencher unterdrückt (Livak et al., 1995). Der Reporter transferiert dabei Energie schneller auf den benachbarten Quencher als selbst zu fluoreszieren. Dieses Prinzip wird Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt (Chen et al., 1997; Hiyoshi and Hosoi, 1994). Wenn nun die *Taq*-Polymerase an die cDNA bindet und die Elongation durchführt, spaltet sie die noch gebundene Hydrolyse-Sonde durch ihre 5‘→3‘ Exonukleaseaktivität (Holland et al., 1991). Dadurch wird die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher aufgehoben und die emittierte Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs kann nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden (Heid et al., 1996; Livak et al., 1995). Diese ist proportional zur Menge des amplifizierten Produktes. Der Verlauf der PCR-Reaktion kann durch die kontinuierliche Fluoreszenzmessung direkt verfolgt werden, weshalb man diese Methode als Echtzeit-PCR (*real-time*-PCR) bezeichnet.

Für die Expressionsanalyse der zu untersuchenden Gene und der entsprechenden Referenzgene wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
FastStart TaqMan® Probe Master (2 x)	12.5
Sonde (10 µM)	0.25
Forward Primer (20 µM)	0.25
Reverse Primer (20 µM)	0.25
H_2O	9.25
cDNA-Lösung (1 ng/µl)	2.5

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt festgelegt:

Temperatur	Dauer	Wiederholung
95°C	10 min	
95°C	15 sec	
60°C	1 min	x 39
Fluoreszenzmessung der Platte		

Für die Auswertung und genaue Quantifizierung der Expression der Zielgene wurden zunächst die C(t)-Werte (*cycle threshold*, Zyklusschwellenwert) dieser durch die Werte eines Referenzgens, welches in seiner Expression unter den experimentellen Bedingungen unverändert bleibt, normalisiert.

Delta C(t) = C(t) Zielgen - C(t) Referenzgen

Der C(t)-Wert gibt den Zeitpunkt an, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Hier befindet sich die Reaktion in der exponentiellen Phase, in der optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

3.2.7 *Short Tandem Repeat*-Analyse

Um gewährleisten zu können, dass die verwendeten Zelllinien nicht durch andere Zelllinien „kontaminiert“ oder durch zu lange Kulturdauer verändert waren, wurde eine sogenannte *Short Tandem Repeat*-Analyse (STR-Analyse) aller verwendeten Zelllinien durchgeführt (Nims et al., 2010). Es wurden die Kits genRES® MPX-2 und MPX-3 der Fa. Serac verwendet, sowie das Identifier-1 Kit der Fa. ABI und das ESI17-Kit der Fa. Promega (Luca et al., 2013). Die STR-Analysen wurden von PD Dr. med. Wolfgang Huckenbeck, Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf, im Rahmen einer Kooperation angefertigt. Die Ergebnisse der STR-Analysen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Übersicht über die Ergebnisse der Short Tandem Repeat (STR)-Analyse der verwendeten humanen Zelllinien.

STR-Marker	MDA-MB-231	SK-OV-3.ip	KYSE-30	CACO-2	COLO205	PC-3	DU-145	HEK293
D8S1179	13	14,15	12,15	12	9,14	13	13,14	12,14
D21S11	33.2	30,30.2,31,31.2	28	30	30.2,33.2	29,31.2	30,33	30.2
D7S820	8,9	13,14	11,12	11,12	9,10	8	7,10,11	11
CSF1PO	13	10,11	10	11	11,12	11	10,11	12
D3S1358	16	14	15,16	14	16	16	16	15,17
TH01	7,9.3	9,9.3	9	6	8,9	6,7	7	7,9.3
D13S317	13	8,11	9	11,14	10,12	11	12,14	12,14
D16S539	12	12	10,12	12,13	12,13	11	11,13	9,13
D2S1338	20,21	18,22,23	23	17,25	17,18	18,20	16,17	19
D19S433	11,14	3,13.2,14,14.	14.2,15.2	15	13,14	14	13	15,18
VWA	15	17,18,19	16,18	16,18	15	17	17,18	16,19
TPOX	8,9	8,11	9	9,11	11	8,9	11	11
D18S51	16	16,17,18	14	12	18	14,15	12	17
Amelogenin	X,X	X,X	X	X	X	X	X,Y	X,X
D5S818	11,12	11	11	12,13	10,13	13	10,13	8
FGA	23,25	24,25,26	24	19	21,23	24	22	23
D22S1045	15,16	11,16		15,16	16	15	16	16
D1S1656	11,15.3	11,16.3,17.3		15,16	11,15	12,16	15,16,17.3	15,17.3
D10S1248	14	13,16,17		13,15	14,15	16	12,13	14
D2S441	10,14	10,11.3		10,15	10,11	10,11	9,14	11,15
D12S391	18,20	21,22		17,23	15	21	18,21	19,21
SE33	16,18	15,16,19	22,23	21	18	28.2	19.2	17,20

3.2.8 Mykoplasmen-PCR

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbstständig vermehrenden Organismen (Razin et al., 1998), die darüber hinaus auch keine Zellwand besitzen (Maniloff and Morowitz, 1972; Razin et al., 1998). Aufgrund ihrer starken Verbreitung in der Natur (Razin et al., 1998) verursachen sie häufig Kontaminationen von Zellkulturen. Dies führt zu dramatischen Änderungen der biologischen Charakteristika der betroffenen Zellen (Rottem and Barile, 1993). Damit die Ergebnisse der Versuche nicht durch eine eventuelle Kontamination mit Mykoplasmen verfälscht wurden, wurden die verwendeten Zelllinien nach jedem Auftauen getestet. Hierfür wurde das PCR Mycoplasma Test Kit I/C der Fa. PromoKine verwendet. Die Proben wurden nach Herstellerangaben gewonnen und bearbeitet.

3.2.9 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Agarose-Gel

Mittels Gel-Elektrophorese können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei bewegen sie sich durch die Poren des Gelnetzwerks in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Kurze Stücke wandern schneller durch das Gel als lange. Aufgrund ihrer negativen Ladung bei pH 7 wandern sie in Richtung der Anode.

Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurden Agarose-Gele in Konzentrationen zwischen 0.8 % und 1.5 % verwendet. Die benötigte Menge Agarose wurde hierzu in entsprechender Menge 1 x TBE-Puffer unter Kochen im Mikrowellengerät gelöst. Entweder wurde das Gel nach einer kurzen Abkühlphase mit 0.1 ‰ GelRed™ versetzt oder nach der Elektrophorese für 10 min bei 60°C in einer Ethidiumbromidfärbelösung (0.1 ‰ in H_2O) inkubiert (2.9.1). Die Auftrennung der Produkte erfolgte bei 100-130 V. Die Analyse der aufgetrennten Banden erfolgte mithilfe einer adäquaten DNA-Leiter durch UV-Licht-Exposition im VersaDoc™ der Fa. Bio-Rad.

3.3 Immunbiologische Methoden

3.3.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie können physikalische Eigenschaften einzelner Partikel bzw. Zellen gemessen und analysiert werden. Die Zellen, die sich in einem Flüssigkeitsstrom befinden, passieren einzeln einen Laserstrahl. Dabei werden zunächst Charakteristika wie ihre relative Größe und relative Granularität bzw. interne Komplexität gemessen (Brown and Wittwer, 2000). Diese Messungen beruhen darauf, dass diese Eigenschaften die Streuung des einfallenden Laserlichts beeinflussen. Das vorwärtsgestreute Licht (*forward scatter*, FSC) ist proportional zur Zelloberfläche bzw. zur Größe. Diese Messung hilft bei der Immunophänotypisierung, da sie unabhängig von der Fluoreszenz ist. Das seitwärtsgestreute Licht (*side scatter*, SSC) ist proportional zur Zellgranularität bzw. internen Komplexität (Gamucci et al., 2014). In heterogenen Zellpopulationen kann man durch die zeitgleiche Messung von FSC und SSC verschiedenen Zelltypen morphologisch voneinander unterscheiden.

Wird ein Fluoreszenzfarbstoff an einen monoklonalen Antikörper gebunden, kann er dazu benutzt werden, einen bestimmten Zelltyp zu identifizieren, der die spezifischen Antigene auf seiner Oberfläche trägt. Auf diese Weise kann eine immunologische Charakterisierung der Zellen durchgeführt werden. Um darüber hinaus lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, ist es möglich die toten Zellen mit dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) anzufärben. PI kann nur durch die nicht mehr intakte Zellmembran von toten Zellen in das Innere der Zelle gelangen.

Die unter Punkt 3.12 beschriebene Zellsortierung wurde mithilfe von Frau Katharina Raba, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ, Dr. med. Johannes Fischer, Universitätsklinikum Düsseldorf), durchgeführt.

3.3.1.1 Messung der CAR-Proteinexpression

Um eine Übersicht über die CAR-Proteinexpression auf der Oberfläche der verwendeten Zelllinien zu bekommen und daraus Rückschlüsse auf die Infektion mit dem CAR-abhängigen Ad5-Virus zu ziehen, wurden die Zelllinien mit einem unkonjugierten CAR-Antikörper markiert, der in einem zweiten Schritt mit dem Fluoreszenzfarbstoff

Alexa Fluor® 488 gekoppelt wurde. Zur Vorbereitung auf die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen wie unter 3.1.2 beschrieben geerntet und mit PBS gewaschen. Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf den Zellen abgesättigt. Hierfür wurde die Zellsuspension in 750 µl 20 %igem AB-Serum bei RT für 20 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 400 x g wurden die Zellen mit dem CAR-Antikörper im Verhältnis 1:50 (nach Herstellerempfehlung) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Um die Antigen-Antikörperreaktion zu visualisieren, wurde der sekundäre Fluoreszenzantikörper Alexa Fluor® 488 in einer Konzentration von 0.1 µg/1 µl Zellsuspension eingesetzt und für 45 min lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und schließlich in 200 bis 300 µl PBS aufgenommen. Zur Auflösung von Zellaggregaten wurde die Zellsuspension über einen 50 µm Filter gegeben und anschließend am Durchflusszytometer Canto™ der Fa. BD hinsichtlich der CAR-Proteinexpression analysiert. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet und als Isotypkontrolle des Primärantikörpers wurde ein IgG1-Antikörper in gleicher Konzentration wie der Primärantikörper verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden in 10 %igem AB-Serum angesetzt.

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung und Rekombination der verwendeten Plasmide wurden folgende, in Tabelle 2.7 aufgelisteten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme verwendet:

BJ5183 ist ein Bakterienstamm, der die Rekombinase *rec*A exprimiert und somit die nötige Maschinerie liefert, um das Rekombinationsereignis zwischen dem pShuttle-Vektor und dem pAdEasy-1-Plasmid durchzuführen. Dieser Stamm weist eine hohe Effizienz in Transformation- und Rekombinationsfähigkeiten auf (He et al., 1998).

Des Weiteren wurde der Stamm DH5 α verwendet. Dieser besitzt eine *rec*A1-Mutation und kann deshalb nicht für die Rekombinationsereignisse genutzt werden. Darüber hinaus besitzt dieser Stamm eine *end*A1-Mutation, so dass kein unspezifischer Verdau von Plasmiden durch die Endonuklease stattfinden kann (Carnes et al., 2006). Da in den BJ5183-Zellen keine ausreichende Menge Plasmid-DNA produziert wird (Renaut et al., 2002),

wurde ein Klon der Rekombination in den DH5 α -Stamm transformiert, da dieser für eine hohe Ausbeute bei der DNA-Produktion sorgt (Taylor et al., 1993).
Der Stamm JM101 wurde zur Vermehrung des pShuttle-CMV-EGFP-Vektors verwendet.

3.4.2 Medium und Aufzucht von *E. coli*

Die *E. coli*-Kulturen wurden in *lysogeny broth*(LB)-Medium bei 37°C und 200 UpM kultviert. Für die Selektion transformierter *E. coli*-Kulturen wurden dem LB-Medium nach Autoklavierung Kanamycin (30 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. In diesem Selektionsmedium konnte eine Selektion der transformierten von den nicht-transformierten Bakterien stattfinden. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar.

3.4.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Aus dem Plasmid S11EG wurde das *EGFP* verwendet, welches zur Markierung der Zielzellen benötigt wird. Das Plasmid pShuttle-CMV weist eine multiple Klonierungsstelle (*Multiple Cloning Site,* MCS) zwischen dem sehr starken Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, der für konstitutive und hohe Expressionslevel sorgt, und dem SV-40 Polyadenylierungssignal auf. Die MCS eignet sich sehr gut für die Insertion großer Stücke Fremd-DNA von bis zu 6.6 kb (AdEasy™ Adenoviral Vector System Manual). Die Regionen, die als linker und rechter Arm bezeichnet werden, sind die DNA-Abschnitte des pShuttle-Plasmids, die eine Sequenzhomologie mit dem pAdEasy-1-Plasmid aufweisen. An diesen Stellen findet die homologe Rekombination statt (He et al., 1998). Das Plasmid pShuttle-CMV ermöglicht in seiner Funktion als Transfervektor den Einbau von *EGFP* und des CMV-Promotors in das adenovirale Plasmid pAdEasy-1. Darüber hinaus besitzt das Plasmid pShuttle-CMV für die Selektion eine Kanamycinresistenz.

Um replikationsinkompetente, rekombinante Adenoviren herzustellen, wurde das AdEasy™ Adenovirale Vektorsystem der Fa. Agilent Technologies verwendet. Das adenovirale Plasmid pAdEasy-1 umfasst annähernd das gesamte Genom des humanen Adenovirus Serotyp 5. Einzig die Regionen für die viralen Gene E1 und E3 wurden deletiert. Die E1-Deletion sorgt dafür, dass keine Selbstreplikation mehr stattfinden kann und in Zielzellen keine infektiösen, Viruspartikel produziert werden können (He et al., 1998). Das

E3-Gen kodiert für Proteine, die daran beteiligt sind, der Wirtsimmunität zu entkommen und ist somit entbehrlich (Benedict et al., 2001; He et al., 1998). Durch diese beiden Deletionen kann bis zu 7.5 kb-große Fremd-DNA in das Virusgenom eingebracht werden (AdEasy™ Adenoviral Vector System Manual). Wie pShuttle enthält auch pAdEasy-1 homologe Sequenzabschnitte, die der Rekombination mit pShuttle dienen. Zusätzlich trägt pAdEasy-1 ein Ampicillinresistenzgen, welches nach der Rekombination mit dem pShuttle-Vektor verloren geht. Um nach der Klonierung rekombinante Viren herzustellen, wurde als Verpackungszelllinie die humane embryonale Nierenzelllinie 293 (*human embryonic kidney* 293, HEK293) verwendet, welche für die Vermehrungsphase defizientes E1 der Viren trans-komplementieren (Graham et al., 1977; Kovesdi and Hedley, 2010).

3.5 Klonierung

3.5.1 Restriktionsverdau

Die Restriktionen wurden nach den Herstellerangaben der jeweiligen Restriktionsenzyme unter Verwendung der zugehörigen Reaktionspuffer durchgeführt. In die Reaktionen wurden zwischen 0.2 bis 3 µg Template-DNA eingebracht und mit 1 U der entsprechenden Restriktionsenzyme pro µg DNA versetzt. Die Restriktionen wurden in 20-50 µl Ansätzen durchgeführt und bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte über die Auftrennung in einem 0.8 oder 1.5 %igem Agarose-Gel + Ethidiumbromid (3.2.9). Als Größenstandard diente eine 200 bp DNA-Leiter.

3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Um für die Klonierung relevante DNA-Banden wie Vektor und Insert zu isolieren und aufzureinigen, wurde nach einer Restriktion eine Auftrennung der Fragmente in einem 1.5 %igen Agarose-Gel durchgeführt. Die relevanten DNA-Banden wurden unter UV-Exposition nach Ethidiumbromidfärbung mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen nach Herstellerangaben extrahiert und über die Bindung an eine Silicamembran aufgereinigt. Das Produkt wurde abschließend in

30-50 µl Elutionspuffer eluiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde wie unter 3.2.4 beschrieben gemessen.

3.5.3 Dephosphorylierung

Um nach einer Restriktion die Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser mittels Antarktischer Phosphatase dephosphoryliert (Sambrook and Russell, 2001). Hierbei wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende des Vektors durch Hydrolyse entfernt. Für eine anschließende Ligation reichen die Phosphatgruppen des Inserts aus. Die Vektoren wurden pro 20 µl Reaktionsansatz mit 5 U Phosphatase pro 1-5 µg Vektor-DNA und 1/10 Volumen Phosphatasepuffer (10 x) für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurden die Proben 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Komponente	1 x Ansatz (µl)
Vektor (1-5 µg)	17
Antarktische Phosphatase (5 U/µl)	1
Puffer (10 x)	2

3.5.4 Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert wurde im Anschluss an eine Dephosphorylierung des Vektors (3.5.3) durchgeführt. Dazu wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis 1:4 in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt und über Nacht (ÜN) bei 16°C inkubiert. Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
Vektor	3
Insert	12
Puffer (10 x)	2
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1
H_2O	2

3.5.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter BJ5183-Zellen, die das pAdEasy-1-Plasmid für das anschließende Rekombinationsereignis tragen sollten, wurden in einem ersten Schritt 200 ng von pAdEasy-1 in BJ5183-Zellen transformiert (3.5.6) und unter Ampicillin

selektioniert. Eine ÜN-Vorkultur (5 ml) von einem Klon diente zur Animpfung von 500 ml LB-Selektionsmedium für eine Hauptkultur (Verhältnis 1:100). Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 180 UpM für 1.5-3 h inkubiert. Das Zellwachstum wurde laufend bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm photometrisch überwacht. Bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.5 bis 0.7 wurden die Zellen geerntet und für 15-30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 4,000 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde zunächst in 3 ml eiskaltem, sterilem Aqua dest. resuspendiert und dann 2-mal in jeweils 250 ml und 100 ml eiskaltem Aqua dest. gewaschen und zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt in 5 ml eiskaltem, 10 %igem Glycerin. Abschließend wurde das Pellet in 600 µl 10 %igem Glycerin aufgenommen, auf Trockeneis in 40 µl Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert.

3.5.6 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* innerhalb eines Klonierungsvorgangs dient zur Selektion korrekter Klone und zur Vermehrung der Plasmid-DNA . Hierzu wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen (40 µl) langsam auf Eis aufgetaut. Diese wurden mit 1-2 µl Vektor-DNA (aus Ligationsschritt bzw. fertige Plasmide) bzw. bei der homologen Rekombination mit zunächst 200 ng pAdEasy-1 und anschließend 1 µg pShuttle-CMV-EGFP gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei 200 Ω, 2.5 kV und 25 µF in einem Gene Pulser der Fa. Bio-Rad durchgeführt. Hierbei werden die Bakterien kurzen elektrischen Pulsen ausgesetzt, wodurch kurzzeitig Poren in der Plasmamembran entstehen und die Plasmid-DNA in die Bakterien eindringen kann. Anschließend wurden die Bakterien zur Regeneration in 1 ml SOC (*super optimal broth with catabolite repression)*-Medium überführt und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß für 1-2 h bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min bei 2,150 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und mit dem Rest, der im Reaktionsgefäß zurückblieb, wurde das Pellet durch Resuspendieren gelöst und auf Selektions-Agarplatten ausplattiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C ÜN.

3.5.7 Plasmidisolation

Um die Plasmid-DNA der positiven, transformierten Klone zu isolieren, wurden zunächst mehrere Klone mit einer 10 µl Pipettenspitze von einer Selektions-Agarplatte gepickt und jeweils 3-5 ml LB-Selektionsmedium für eine Übernachtkultur (ÜN-Kultur) damit angeimpft.

Zur Plasmid-DNA-Isolation kleiner Plasmid-DNA-Mengen wurde das Nucleospin® Plasmid Kit der Fa. Macherey-Nagel verwendet. Das Prinzip der Isolation beruht auf einer alkalischen Lyse, um die Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren und von chromosomaler DNA und weiteren Zellbestandteilen zu trennen. Die Bakterien der ÜN-Kultur wurden zunächst für 30 sec bei 11,000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in einen Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe eines alkalischen Lysepuffers wurden die Zellen bei RT für 5 min inkubiert. Mit einem weiteren Puffer wurde das Lysat neutralisiert und geeignete Bedingungen für die Bindung an die Silicamembran geschaffen. Anschließend wurden prezipitierte Proteine und Zelldebris durch Zentrifugation für 5 min bei 11,000 x g pelletiert. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben, an deren Silica-Membran die Plasmid-DNA bindet. Durch einen Waschschritt mit einem Puffer, dem nach Herstellerangaben Ethanol zugesetzt wurde, wurden Salze und weitere störende Faktoren ausgewaschen. Mit 50 µl des mitgelieferten Elutionspuffer wurde die Plasmid-DNA isoliert.

Für eine Plasmid-DNA-Aufreinigung großer Plasmid-DNA-Mengen wurden 250 ml einer Hauptkultur mit 4 ml einer ÜN-Vorkultur angeimpft und ÜN bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Zur Aufreinigung wurde das EndoFree® Plasmid Maxi Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die Aufreinigung beruht ebenfalls auf einer alkalischen Lyse mit der Bindung der DNA auf eine Anionenaustauschersäule. Zunächst wurde die ÜN-Kultur bei 6,000 x g für 15 min bei 4°C geerntet. Anschließend fand ebenfalls eine alkalische Lyse der Bakterien für 5 min bei RT statt. Das Lysat wurde anschließend von Zelldebris und Proteinen durch Filtration befreit. Das gefilterte Lysat wurde für 30 min mit einem Endotoxin-Entfernungspuffer auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die Säule mit einem isopropanolhaltigem Puffer equilibriert. Das Lysat wurde nach der Inkubation auf die so vorbereitete Säule geladen. Nach zweimaligem Waschen der Säule wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Elutionspuffer eluiert. Mit 10.5 ml Isopropanol wurde die DNA bei 15,000 x g für 30 min bei 4°C präzipitiert und das Pellet anschließend mit 5 ml Ethanol (70 %) bei 15,000 x g für 10 min gewaschen

und abschließend nach Trocknung des Pellets in angemessener Menge TE-Puffer aufgenommen.

3.6 Herstellung rekombinanter Adenoviren

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren kann auf zwei Wegen geschehen. Die erste Möglichkeit ist, eine direkte Ligation des Kandidatengens in das adenovirale Genom durchzuführen. Da das adenovirale Virusgenom sehr groß ist (≈36 kb), multiple Erkennungssequenzen hat, jedoch nur wenige geeignete Schnittstellen aufweist, ist dieser Ansatz ungeeignet (He et al., 1998).

Eine zweite Möglichkeit bietet die Methode der homologen Rekombination, die hier angewendet wurde (Abbildung 3.1). Hierbei wurde zunächst die DNA-Sequenz von *EGFP* aus dem Plasmid S11EG in den Transfervektor pShuttle-CMV kloniert. Parallel wurde das pAdEasy-1-Plasmid in den replikationskompetenten Stamm BJ5183 transformiert und davon anschließend elektrokompetente Zellen hergestellt. Der Transfervektor wurde anschließend in die BJ5183pAdEasy-1-Zellen transformiert. Im darauffolgenden Schritt wurde in diesen Bakterien die heterologe DNA-Sequenz über homologe Rekombination in den adenoviralen Vektor eingebaut. Da das adenovirale Plasmid pAdEasy-1-CMV-EGFP in den BJ5183-Zellen nicht stabil ist, wurde es in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert. Abschließend wurde das rekombinante adenovirale Plasmid zur Virusproduktion in die Verpackungszelllinie HEK293 transfiziert.

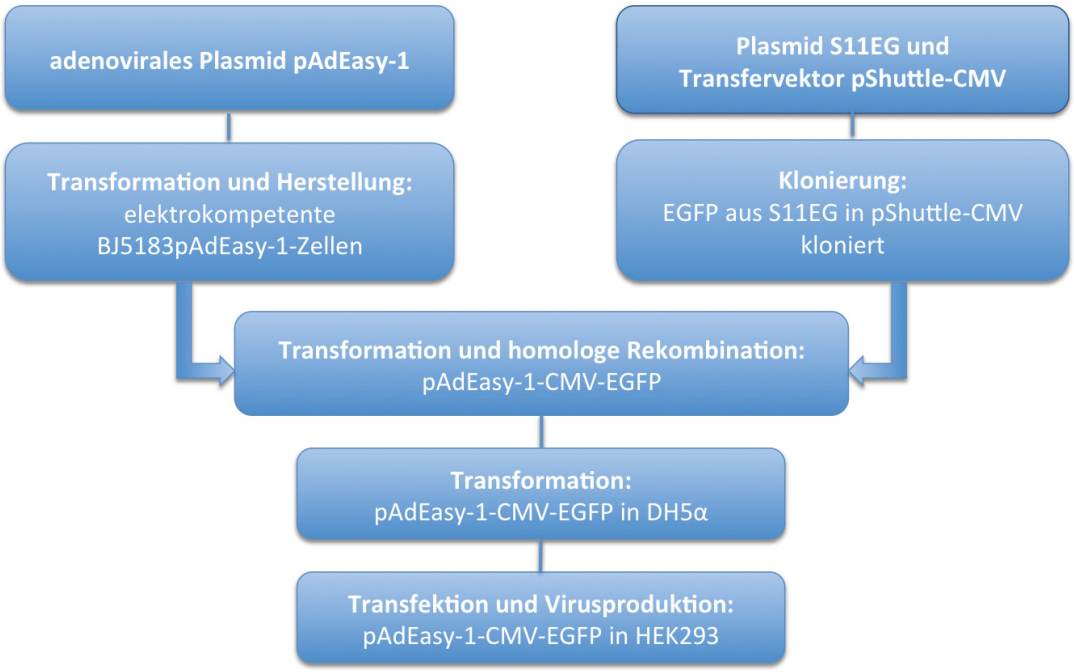


Abbildung 3.1: Überblick über die Arbeitsschritte zur Herstellung rekombinanter Adenoviren. Zunächst wurde das adenovirale Plasmid in den Stamm BJ5183 kloniert und davon elektrokompetente Zellen (BJ5183pAdEasy-1) hergestellt. Parallel wurde die DNA-Sequenz von *EGFP* aus dem Plasmid S11EG in den Transfervektor pShuttle-CMV kloniert. Für die homologe Rekombination zwischen dem pShuttle-CMV-EGFP-Vektor und dem pAdEasy-1-Plasmid wurde ersterer in die BJ5183-Zellen transformiert. Da das pAdeasy-1-CMV-Plasmid im BJ5183-Stamm nicht stabil ist, wurde es zur Plasmidproduktion in den DH5α-Stamm transformiert. Nach Transfektion in die Verpackungszelllinie HEK293 wurden rekombinante Adenoviren produziert.

In Abbildung 3.2 sind die einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung rekombinanter Adenoviren bildlich dargestellt. Zur Vorbereitung auf die homologe Rekombination wurde der Transfervektor pShuttle-CMV-EGFP zunächst mit *Pme*I linearisiert. Die homologe Rekombination fand zwischen den rechten und linken Armen des pAdEasy-1-Plasmids und denen des pShuttle-CMV-EGFP statt. Zusätzlich zum *EGFP* wurden auch der CMV-Promotor und die Kanamycinresistenz übertragen. Das adenovirale Plasmid pAdEasy-1-CMV-EGFP wurde zur Vorbereitung auf die Transfektion in die HEK293-Zellen mit *Pac*I linearisiert.

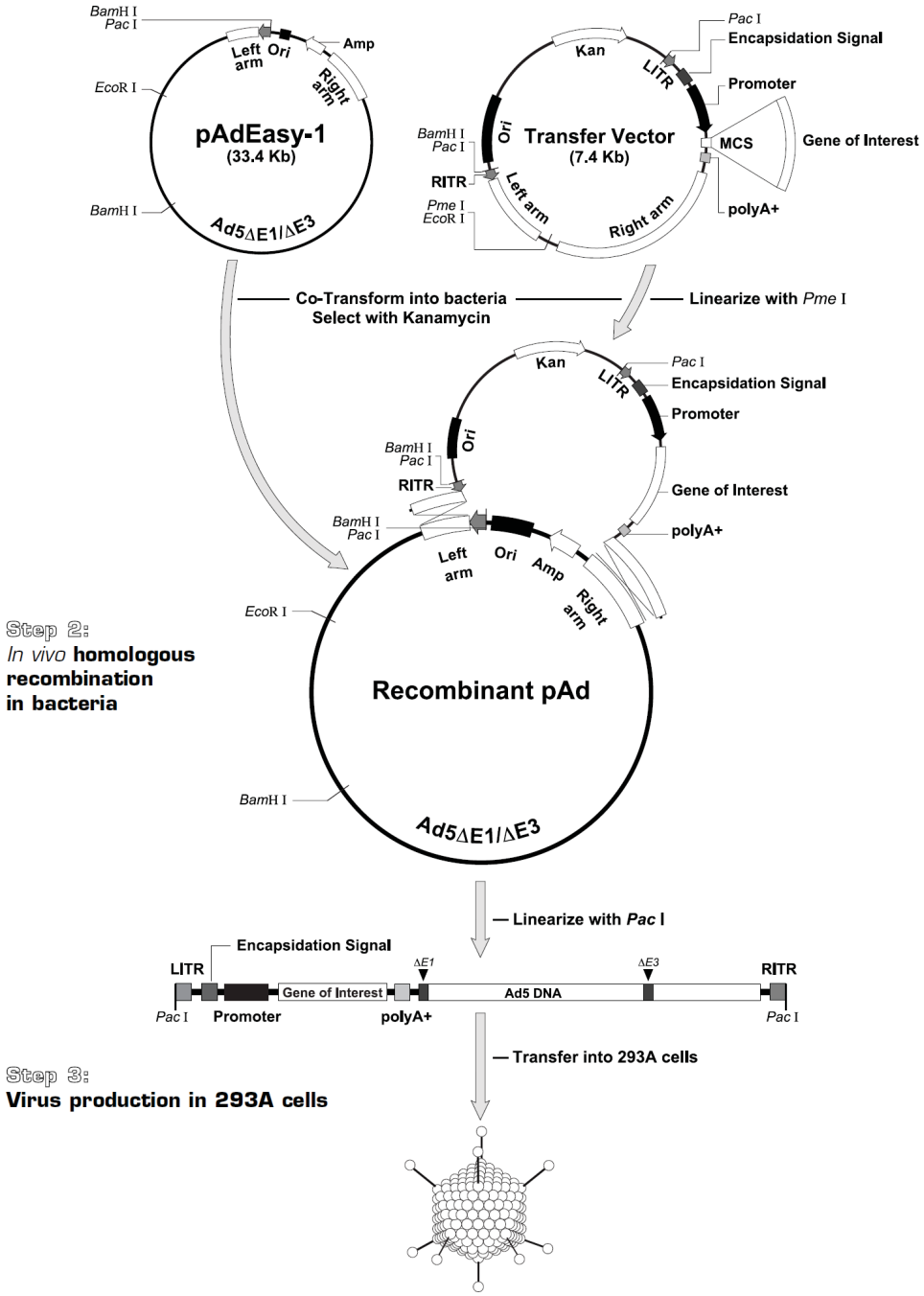


Abbildung 3.2: Prinzip der Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels homologer Rekombination. In den Transfervektor pShuttle-CMV wurde *EGFP* hinter den CMV-Promotor kloniert. Nach Linearisierung des pShuttle-Vektors wurde das *EGFP* über homologe Rekombination in das adenovirale Plasmid pAdEasy-1 kloniert. Nach Linearisierung mit *Pac*I wurde das fertige adenovirale Plasmid für die Virusproduktion in HEK293-Zellen transfiziert **(**pAdEasy™ Vector System, Application Manual, QBiogene, Version 1.4).

3.6.1 Klonierung von *EGFP* in den Transfervektor pShuttle-CMV

Um Adenovirus-infizierte Tumorzellen identifizieren und weiter analysieren zu können, wurde ein Markerprotein benötigt, welches unter UV-Exposition fluoresziert und somit die

infizierte Zelle sichtbar macht. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Zunächst wurde *EGFP* in einen pShuttle-Vektor eingebaut, in dem *EGFP* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors ist. Hierzu wurden pShuttle-CMV und S11EG (liefert *EGFP*) mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Hind*III geschnitten (3.5.1). Nach Insertion von *EGFP* in den dephosphorylierten pShuttle-Vektor wurde zur Amplifikation der Plasmid-DNA der pShuttle-CMV-EGFP-Vektor mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm JM101 transformiert (3.5.6). Erfolgreich transformierte Klone wurden unter Kanamycin selektiert. Die daraus entstandenen Klone wurden nach Selektion mit Kanamycin mittels Restriktionsanalyse auf den richtigen Einbau der *EGFP*-Sequenz hin analysiert. Von einem korrekten Klon wurde eine Plasmid-Aufreinigung durchgeführt (3.5.7).

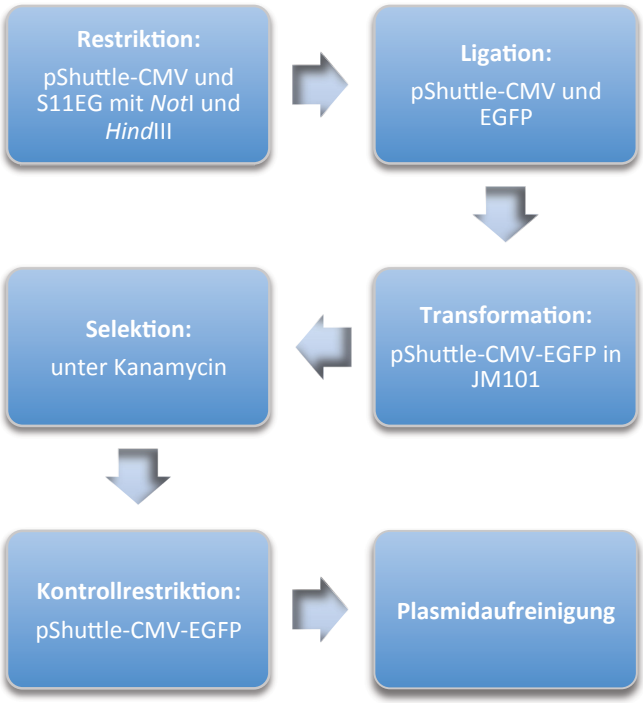


Abbildung 3.3: Übersicht über die Klonierungsschritte zur Herstellung des pShuttle-CMV-EGFP-Vektors. Zunächst wurden der pShuttle-CMV-Vektor und der S11EG-Vektor mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Hind*III geschnitten. Anschließend wurde der pShuttle-CMV-Vektor mit dem Insert *EGFP* ligiert. Der fertige pShuttle-CMV-EGFP-Vektor wurde in den Bakterienstamm JM101 transformiert und unter Kanamycin selektiert. Um den Einbau von *EGFP* zu kontrollieren, wurde eine Kontrollrestriktion durchgeführt. Abschließend wurde eine Plasmidaufreinigung durchgeführt.

3.6.2 Klonierung rekombinanter adenoviraler EGFP-Expressionsvektoren

Zur Vorbereitung auf die homologe Rekombination zwischen dem pAdEasy-1-Vektor und pShuttle-CMV-EGFP-Vektor wurde letzterer mit *Pme*I linearisiert (3.5.1), dephosphoryliert

(3.5.3) und anschließend über ein Agarose-Gel und anschließender Gelextraktion aufgereinigt (3.5.2).

Um eine hohe Effizienz in der homologen Rekombination zu erreichen, wurde das Zwei-Schritt-Protokoll zur Transformation nach Zeng et al. angewendet (Zeng et al., 2001). Der Ablauf dieses Protokolls ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Hierbei wurden der pShuttle-Vektor und das Plasmid pAdEasy-1 nicht ko-transformiert, sondern nacheinander in den rekombinationskompetenten *E. coli*-Stamm BJ5183 transfiziert. Dabei wurden zunächst das adenovirale Plasmid pAdEasy-1 mittels Elektroporation (3.5.6) in den BJ5183-Stamm eingebracht und Klone, die das Plasmid enthielten, über ihre Ampicillinresistenz selektiert. Einer dieser Klone wurde für die Herstellung elektrokompetenter BJ5183pAdEasy-1-Zellen herangezogen, es wurde wie unter 3.5.5 beschrieben vorgegangen. In diese Zellen wurden nun ebenfalls mittels Elektroporation der mit *Pme*I linearisierte pShuttle-CMV-EGFP-Vektor eingebracht. Diese transformierten Zellen wurden auf Agarplatten mit Kanamycinselektionsmedium aufgebracht, da nach einer erfolgreichen Rekombination das Kanamycinresistenzgen aus dem pShuttle-Vektor in das pAdEasy-1-Plasmid integriert wurde. Nach einer Plasmidisolation wurden durch Restriktionen (3.5.1) die positiven, rekombinanten Klone verifiziert.

Da pAdEasy-1-CMV-EGFP in den BJ5183-Zellen nicht stabil ist, wurde das Plasmid in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Durch eine Plasmidaufreinigung wurde die Plasmid-DNA gewonnen und von Endotoxinen befreit, damit diese keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz und die Zellen in späteren Versuchen haben (3.5.7).

Zur Vorbereitung auf die Transfektion in die Verpackungszelllinie HEK293 wurde der fertige adenovirale Vektor pAdEasy-1-CMV-EGFP mit *Pac*I 30 min bei 65°C linearisiert.

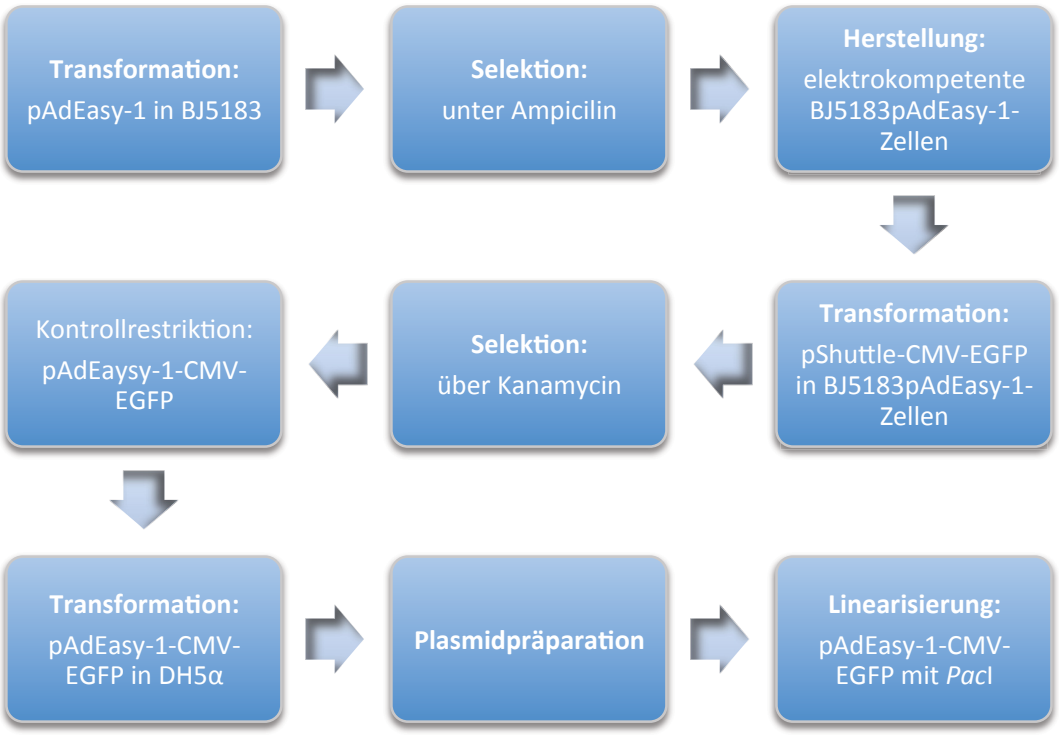


Abbildung 3.4: Übersicht über die Klonierungsschritte zur Herstellung rekombinanter Adenoviren. Der pAdEasy-1-Vektor wurde zunächst in den *E. coli*-Stamm BJ5183 transformiert und unter Ampicilin selektioniert. Aus diesen Zellen wurden elektrokompetente Zellen hergestellt. In diese Zellen wurde wiederum der pShuttle-CMV-EGFP-Vektor transformiert, so dass *EGFP* über homologe Rekombination in den viralen Vektor eingebaut werden konnte. Es fand eine Selektion unter Kanamycin statt, da durch die homologe Rekombination auch die Kanamycinresistenz aus dem pShuttle-Vektor übertragen wurde. Um die homologe Rekombination zu kontrollieren, wurde eine Kontrollrestriktion durchgeführt. Da pAdEasy-1 in den BJ5183-Zellen nicht stabil ist, wurde ein Klon in den DH5α-Stamm transformiert und anschließend eine Plasmidpräparation durchgeführt. Für die anschließende Transfektion des fertigen Vektors in HEK293-Zellen, wurde der pAdEasy-1-CMV-EGFP-Vektor mit *Pac*I linearisiert.

3.6.3 Transfektion rekombinanter adenoviraler DNA in HEK293-Zellen

Es sind mehrere Arbeitsschritte notwendig, um aus den rekombinanten Plasmiden adenovirale Partikel zu machen. Da die adenoviralen Plasmide durch die Deletion des viralen E1-Gens replikationsdefiziente, Viruspartikel hervorbringen würden, müssen die Plasmide zunächst in eine sogenannte Verpackungszelllinie transfiziert werden. Hier wurde die HEK293-Zelllinie verwendet. Sie trägt im Genom das für die virale Replikation wichtige E1-Gen und kann somit die Deletion in den Plasmiden ausgleichen (Graham et al., 1977).

HEK293-Zellen wurden am Vortag in 6-Well Platten in einer Dichte von 7.5 x 10^5 Zellen/Well in Wachstumsmedium ausplattiert. Drei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch frisches ersetzt. Für die Transfektion wurde das

X-tremeGENE HP DNA Transfektionsreagenz der Fa. Roche verwendet. Es wurden 1 µg, mit *Pac*I linearisierte Plasmid-DNA (pAdEays-1-CMV-EGFP) eingesetzt und wie vom Hersteller empfohlen vorgegangen. Die nun hergestellten Viren werden im Weiteren als Ad5EGFP bezeichnet.

3.6.4 Produktion der Viruspartikel

Einen Tag nach der Transfektion des adenoviralen Plasmids in HEK293-Zellen wurden die Zellen 1-mal vorsichtig mit PBS gewaschen, wie unter 3.1.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf vier Wells einer 6-Well Platte aufgeteilt. Für 6 h wurden die Zellen bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert, damit sie an der Plastikoberfläche anhaften. Um eine Diffusion der Viruspartikel (VP) zu minimieren, wurden die Zellen anschließend mit Agarose überschichtet. Hierfür wurden 10 ml einer 5 %igen SeaPlaque® Agarose in einem 50 ml Reaktionsgefäß vorsichtig in Wasser (100°C) gestellt, bis sie geschmolzen war. Dann wurde die Agarose auf 45°C abgekühlt und mit 30 ml Wachstumsmedium (auf 37°C erwärmt) gemischt, um eine Agarose-Endkonzentration von 1.25 % zu erreichen. Direkt im Anschluss wurden 3 ml dieser Lösung auf die Zellen gegeben, von denen vorher das Medium aspiriert wurde. Die Überschichtung mit Agarose wurde bis zum Erscheinen adenoviraler Plaques alle 4-5 Tage mit 1.5 ml/Well wiederholt.

Die Plaques wurden innerhalb von 10-21 Tagen durch den sogenannten zytopathischen Effekt (*cytopathic effect*, CPE) sichtbar. Der CPE, der durch den lytischen Zyklus der Viren ausgelöst wird, dient dazu, eine erfolgreiche Virusproduktion zu erkennen und den Zeitpunkt der Zellernte zu bestimmen. Er zeichnet sich durch Abrunden der Zellen und Verlust des Zell-Zell-Kontakts aus (AdEasy™ Vector System Application Manual, Qbiogene Version 1.4). Um die Viren aus der Agarose zu eluieren, wurden sie mit einer Pipette gepickt und in einem 24-Well in 0.5 ml Wachstumsmedium für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % (v/v) CO_2 inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl eines eluierten Plaques zu neuen HEK293-Zellen in einem 24-Well gegeben, 1.5 h bei 37°C und 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert, dann mit 900 µl Wachstumsmedium überschichtet und bis zum CPE 5-10 Tage bei 37°C und 5 % (v/v) CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, bei 4°C, bei 540 x g für 5 min zentrifugiert und in 1 ml Infektionsmedium resuspendiert. Daraufhin folgte ein Gefrier-Tau-Zyklus, der wie unter Punkt 3.6.5 beschrieben durchgeführt wurde. Der virushaltige Überstand wurde bei -80°C eingefroren oder es wurde für weitere

Virusamplifikationen zunächst eine 25 cm^2 Flasche und mit dem daraus gewonnenen Virusüberstand eine 75 cm^2 Flasche infiziert. Abschließend wurde wie unter Punkt 3.6.7 beschrieben der Titer der gewonnenen Viruspartikel bestimmt.

Für die Herstellung großer Mengen Viruspartikel (Ad5EGFP, Ad5/3GFP), die zur Infektion humaner Tumorzellen und Patientenproben verwendet werden sollten, wurden HEK293-Zellen in vier 75 cm^2 Flaschen à 5 x 10^6 Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen bei 90 % Konfluenz zunächst auf Infektionsmedium gebracht. Anschließend wurden die Zellen mit dem Virusüberstand einer vorherigen Virusamplifikation eines kleineren Maßstabs (1 x 75 cm^2) infiziert. Es wurde eine Konzentration von ≥ 0.5 *plaque forming units* (PFU) gewählt, so dass die infizierten Zellen innerhalb von 48 h einen CPE zeigten. Die Zellen wurden durch Resuspendieren und Abschaben geerntet, solang der CPE noch nicht vollständig ausgeprägt war. So war sichergestellt, dass sich die meisten Viren noch in den Zellen befanden. Die Zellen wurden anschließend bei 1,000 x g für 5 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf 15 ml abgenommen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mittels Gefrier-Tau-Zyklus (3.6.5) aufgeschlossen und mithilfe eines filterbasierten Systems von zellulären Proteinen und Zellkulturmedien-Komponenten getrennt (3.6.6).

3.6.5 Gefrier-Tau-Zyklus

Der Gefrier-Tau-Zyklus dient dazu, die Zellen zu zerstören, um die darin befindlichen Viruspartikel freizusetzen und in Lösung zu bringen. Die Zellen wurden je 3-mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Abschließend wurden die Zelltrümmer bei 3,000 x g für 10 min bei RT sedimentiert und der virushaltige Überstand bei -80°C eingefroren oder direkt aufgereinigt (3.6.6).

3.6.6 Aufreinigung der Viruspartikel

Zur Trennung der Viruspartikel von zellulären Proteinen und Zellkulturmedien-Komponenten wurde das ViraBind™ Adenovirus Purification Kit der Fa. Cell Biolabs verwendet. Es ist ein filterbasiertes System, welches die Oberflächenladung der Viren und deren Größe nutzt. Zunächst wurden der mitgelieferte Waschpuffer (10 x) 1:10 und der Elutionspuffer (2 x) 1:2 mit Wasser verdünnt.

Der virale Überstand aus dem Gefrier-Tau-Zyklus (3.6.5) wurde zunächst über einen sterilen 0.45 µm Filter gegeben und von eventuell noch vorhandenen Zelltrümmern getrennt, um u. a. ein Verstopfen des Aufreinigungsfilters zu verhindern. Auf den Aufreinigungsfilter wurde eine 10 ml Spritze gesteckt. Der Filter wurde mit 5 ml des Waschpuffers (1 x) equilibriert. Anschließend wurde der gefilterte, virale Überstand auf den Aufreinigungsfilter gegeben. Das Filtrat wurde aufgefangen und für eine maximale Ausbeute erneut über den Aufreinigungsfilter gegeben. Dieser wurde anschließend 3-mal mit je 10 ml Waschpuffer (1 x) gewaschen. Mit 2 ml eines Elutionspuffers (1 x) wurden die aufgereinigten Viren eluiert. Die aufgereinigte Virussuspension wurde mit Glycerin in einer Endkonzentration von 10 % versetzt. Die Viren wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.6.7 Titerbestimmung

Um eine Aussage über die Konzentration der gewonnenen Viren zu erhalten, wurde die Anzahl der Viruspartikel über zwei unterschiedliche Methoden bestimmt.

3.6.7.1 Physikalische Titerbestimmung

Diese Methode basiert auf der Bestimmung der Viruspartikel in Lösung im Verhältnis zum DNA-Gehalt. Hierbei wurde die Menge an viraler DNA mittels photometrischer Messung bei einer OD_{260} bestimmt. Das Virus wurde in den Verhältnissen 1:3, 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 mit Viruslysispuffer (*viral lysis buffer*, VLB) gemischt und unter Schütteln für 20 min bei 56°C inkubiert. Als Leerwert wurde der VLB herangezogen. Die Anzahl der Viruspartikel in Lösung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\mathbf{OD_{260} = A(260)\text{-}A(320)}$$

$$\mathbf{OD_{260} \times Verdünnungsfaktor \times 1.1 \times 10^{12} = Titer\ in\ VP/ml}$$

A = Absorption
VP = Viruspartikel

Die Absorption bei 320 nm entspricht der Absorption der Lösung ohne Viruspartikel.
Die Extinktion von 1 bei OD_{260} entspricht 1.1×10^{12} Viruspartikeln (AdEasy™ Vector System Application Manual, Qbiogene Version 1.4).

3.6.7.2 Biologische Titerbestimmung

Die *Tissue Culture Infection Dose 50* ($TCID_{50}$)-Methode beruht auf der Induktion des CPE in HEK293-Zellen nach einer End-Punkt-Verdünnung der aufgereinigten Adenoviruslösung (AdEasy™ Vector System Application Manual, Qbiogene Version 1.4). Es wurde eine Doppelbestimmung in einer 96-Well Platte durchgeführt. Die HEK293-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Well in 100 µl Infektionsmedium ausplattiert. Es wurde eine serielle Verdünnungsreihe des Virusstocks im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-10} jeweils für eine Zehnfachbestimmung in Infektionsmedium angesetzt. Direkt im Anschluss an das Ausplattieren wurden die Zellen mit 100 µl der Virusverdünnung infiziert. Der Bereich der Verdünnungen wurde so gewählt, dass die niedrigste Verdünnung in allen Wells einen CPE zeigte, wohingegen in der höchsten Verdünnung kein CPE induziert werden sollte. Zwei Spalten auf der Platte wurden nicht infiziert, und dienten somit als Negativkontrollen. Die Zellen wurden für 10 Tage bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Zählen der CPE-positiven Wells pro Reihe am Mikroskop. In Abbildung 3.5 ist ein exemplarische Ergebnis eines $TCID_{50}$-Versuchs dargestellt.

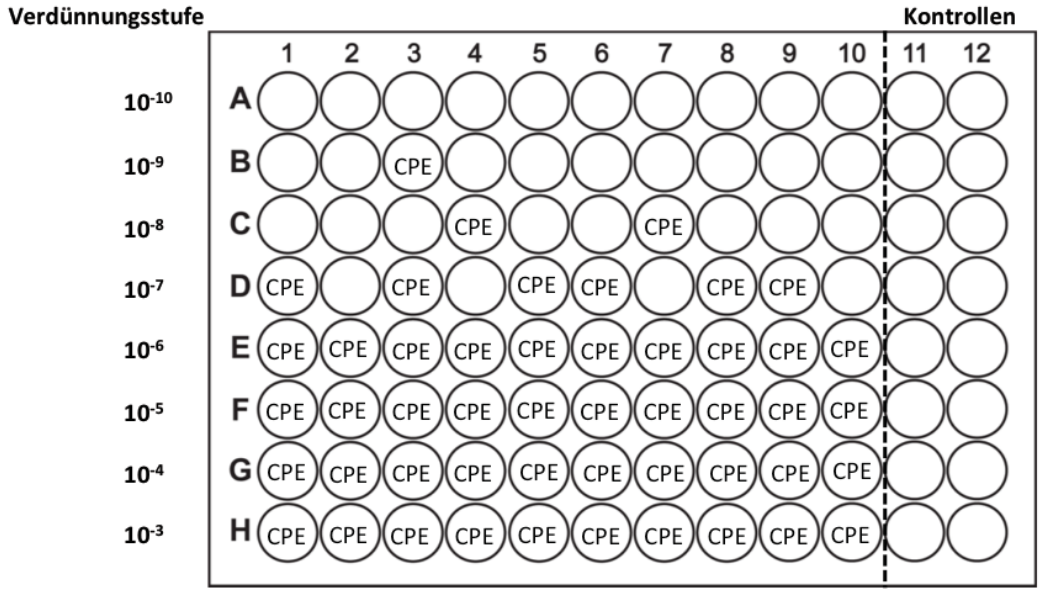


Abbildung 3.5: Exemplarisches Ergebnis eines $TCID_{50}$-Versuchs. Der Versuch wurde in einer 96-Well Platte durchgeführt. Die Spalten 1-10 wurden mit steigenden Virusverdünnungen infiziert. Die Konzentrationen nahmen von Reihe A nach Reihe H ab. Die Spalten 11 und 12 dienten als Negativkontrollen und wurden nicht infiziert. Der Test konnte nur ausgewertet werden, wenn die niedrigste Verdünnung (Reihe H) in allen Wells einen CPE zeigte und die höchste Verdünnung (Reihe A) in keinem Well einen CPE induzierte.

Zur Berechnung des Virustiters T ($TCID_{50}$/ml) wurde die statistische Methode nach KÄRBER angewendet (AdEasy™ Vector System Application Manual, Qbiogene Version 1.4). Für 100 µl der Viruslösung beträgt der Titer:

$$T = 10^{1 + d(S - 0.5)}$$

d = Log 10 der Verdünnung
S = Σ CPE-positive Wells/10

Der $TCID_{50}$-Titer konnte nach folgender Formel in die Einheit *plaque forming units* pro ml (PFU/ml) umgewandelt werden:

$$PFU/ml = TCID_{50}/ml - 0.7\ Log$$

3.7 Isolierung von PBMCs

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells,* PBMCs) wurden venöses peripheres Blut oder Buffy-Coats von anonymisierten gesunden Spendern verwendet. Buffy-Coats sind Konzentrate aus Leukozyten und Thrombozyten und wurden von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen. Zusätzlich wurde venöses, peripheres Blut von gesunden, freiwilligen Spendern in heparinhaltigen Blutentnahmeröhrchen abgenommen. DLA-Proben wurden von Patienten und gesunden Spendern im ITZ gewonnen. Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde im Interdisziplinären Zentrum für ambulante Chemotherapie (IAC) des Universitätsklinikums Düsseldorf in EDTA-haltige Blutentnahmeröhrchen abgenommen. Für die entsprechenden Probenentnahmen und Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf positive Voten erteilt. Alle Patienten und gesunden Spender haben vor der Blutentnahme bzw. der DLA schriftlich zur Verwendung des Körpermaterials für Forschungszwecke zugestimmt.

Die CellSearch®-Analysen der Blut- und DLA-Proben erfolgten im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Dieter Niederacher im Molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf.

3.7.1 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Die PBMCs aus dem peripheren Blut wurden über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Hierzu wurden jeweils 10 ml Blut in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 20 ml PBS aufgefüllt. In ein neues Reaktionsgefäß wurden 15-20 ml Ficoll der Fa. GE Healthcare vorgelegt und mit der Zellsuspension langsam überschichtet, so dass zwei getrennte Phasen erkennbar waren. Der Gradient wurde bei 550 x g für 30 min ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Die PBMC-haltige Interphase wurde vorsichtig abgenommen und mit 20 ml PBS gemischt. Die Zellsuspension wurde bei 365 x g für 10 min bei RT pelletiert. Dieser Schritt wurde 1 bis 2-mal wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in entsprechendem Wachstumsmedium resuspendiert und direkt weiterverwendet.

3.7.2 Isolierung von PBMCs aus Buffy-Coat-Präparaten

Es wurden höchstens 12.5 ml des Buffy-Coat-Präparats in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Lyse der restlichen Erythrozyten mit 37.5 ml Ammoniumchloridlösung aufgefüllt. Die Erythrozytenlyse fand für 10 min bei 4°C statt. Hierauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 7 min bei 500 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2-mal mit PBS bei 200 x g, 4°C und 10 min gewaschen. Das Pellet wurde in entsprechender Menge Wachstumsmedium aufgenommen und weiterverarbeitet.

3.7.3 Aufarbeitung von frischen Blutproben

Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde in EDTA-haltige Röhrchen abgenommen. Um eine Aktivierung der Blutzellen zu verhindern, wurden alle weiteren Schritte bei 4°C durchgeführt. Das Blut wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 200 x g ohne Bremse zentrifugiert, um den größten Anteil der unerwünschten Thrombozyten abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne die rote WBC-haltige (*white blood cells,* weiße Blutkörperchen/Leukozyten) Schicht zu zerstören. Für eine Erythrozytenlyse wurde das Zellpellet mit dem dreifachen Volumen der Ausgangsprobenmenge Ammoniumchloridlösung versetzt und für 10 min inkubiert. Danach wurde die Suspension mit HSA (*human serum*

albumin, Humanalbumin)- und EDTA-haltigem PBS-Puffer aufgefüllt und für 7 min bei 500 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Zellen wurden anschließend 2-mal mit diesem PBS-Puffer bei 500 x g für 7 min gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 5 ml RPMI-Wachstumsmedium aufgenommen und, wie unter 3.1.4 beschrieben, gezählt. Es wurden 1×10^7 Zellen in 12 ml RPMI-Wachstumsmedium aufgenommen und auf einer 6-Well Platte verteilt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit Adenoviren (Ad5/3GFP) infiziert.

3.7.4 Aufarbeitung von frischen DLA-Proben

Üblicherweise werden zirkulierende Tumorzellen in Proben peripheren Bluts von Patienten detektiert. Da in diesen Proben die Zahl der CTCs ziemlich gering ist, wurden in dieser Arbeit DLA-Proben von Tumorpatienten zur Detektion von CTCs verwendet. Zur Gewinnung der in dieser Arbeit analysierten DLA-Proben wurde etwa die Hälfte des Blutvolumens der Patienten prozessiert. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, fließt das Blut vom Patienten bzw. dem gesunden Spender zunächst in den Zellseparator, in dem die Auftrennung der einzelnen Blutzellen mittels Zentrifugation durchgeführt wird. Die CTC-haltige Schicht wird abgetrennt und in einem separaten Sammelbeutel aufgefangen. Anschließend werden die restlichen Blutbestandteile wieder in den Patienten bzw. den gesunden Spender zurückgeführt. Um zu verhindern, dass das Blut im Schlauchsystem gerinnt, wurden dem Zellseparator der gerinnungshemmende Stoff ACDA (*Acid Citrate Dextrose solution A,* saure Citrat-Dextroselösung A) zugesetzt.

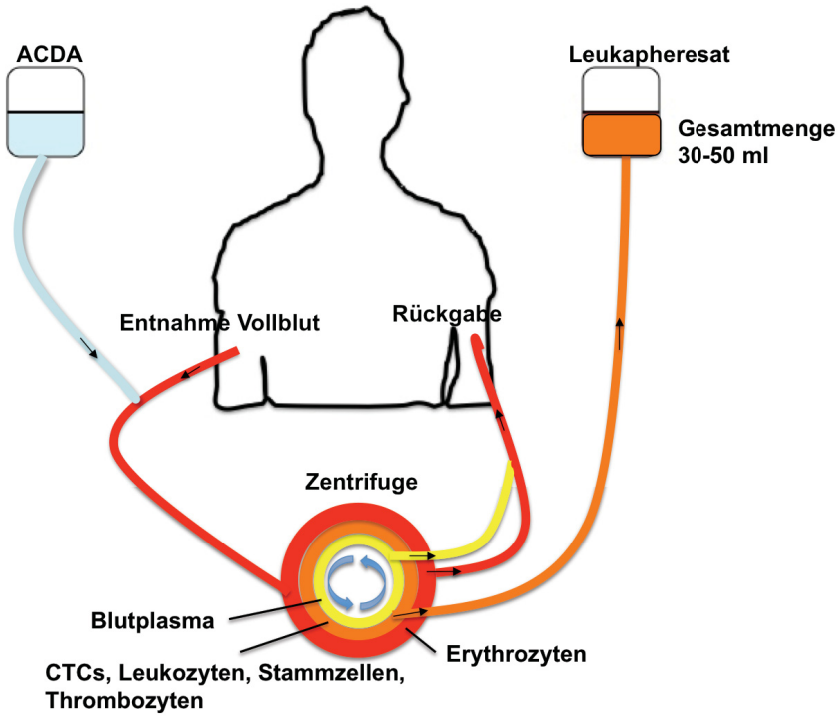


Abbildung 3.6: Ablauf der DLA zur Gewinnung von CTCs. Während der DLA findet eine Blutzellseparation statt. Hierzu werden zwei Drittel des Gesamtblutvolumens des Patienten durch Zentrifugation zunächst in seine Bestandteile aufgeteilt. Die CTC-haltige Schicht wird hierbei abgetrennt und in einem Sammelbeutel aufgefangen. Das restliche Blut wird dem Patienten wieder zurückgeführt. Um eine Blutgerinnung im Schlauchsystem zu verhindern, wird der gerinnungshemmende Stoff ACDA zugesetzt. ACDA = *Acid Citrate Dextrose solution A* (saure Citrat-Dextroselösung A), CTCs = *circulating tumor cells* (zirkulierende Tumorzellen) (modifiziert nach: http://www.cellex.me/informationen-fuer-spender/entnahme/periphere-stammzellennahme).

Insgesamt wurden durch die DLA pro Patient zwischen 30 ml und 50 ml Probenmaterial gewonnen. Für diese Versuche wurden 1 x 10^7 oder 2 x 10^7 WBCs der DLA-Probe verwendet. Im Folgenden wurden alle Inkubations- und Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt. Die gewünschte Menge frischer DLA-Proben wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Um den größten Teil der unerwünschten Thrombozyten aus der Probe zu entfernen, wurde diese bei 200 x g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand und die thrombozytenhaltige weiße Schicht wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne die rote WBC-haltige Schicht zu zerstören. Für eine Erythrozytenlyse wurde das Zellpellet mit dem dreifachen Volumen der Ausgangsprobenmenge Ammoniumchloridlösung versetzt und für 10 min inkubiert. Danach wurde die Suspension mit HSA (*human serum albumin,* Humanalbumin)- und EDTA-haltigem PBS-Puffer aufgefüllt und für 7 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend 2-mal mit diesem PBS-Puffer bei 500 x g für

7 min gewaschen. Die Zellen wurden in 12 ml RPMI-Wachstumsmedium aufgenommen und auf einer 6-Well Platte verteilt. Bis zur Infektion mit Adenoviren wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.8 Messung der Transgen-Expression mittels Luziferase-Assay

Ob PBMCs durch rekombinante Adenoviren infiziert werden können, wurde zunächst mithilfe eines Ad5/3CMVLuc-Virus in einem Luziferase-Reportgen-Assay untersucht. Hierbei wurde das Bright-Glo™ Luciferase Assay-System der Fa. Promega verwendet. Im hier verwendeten rekombinanten Virus wurde die Luziferase des Amerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*), die sogenannte Firefly-Luziferase eingesetzt. Bei der Reaktion, die zur Emission von Lumineszenz führt, wird Luziferin in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} zu Oxyluziferin monooxygeniert. Die Reaktion wird durch die Luziferase katalysiert (Abbildung 3.7).

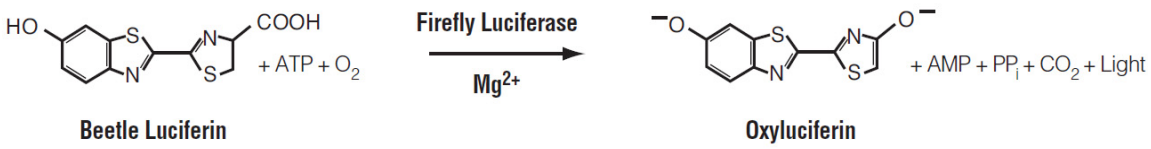


Abbildung 3.7: Die Luziferase-Reaktion. In Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} katalysiert die Firefly-Luziferase die Mono-Oxygenierung von Luziferin zu Oxyluziferin (Datenblatt *Bright-Glo™ Luciferase Assay System*, Promega).

Es wurden 1 x 10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausplattiert und mit steigenden Viruskonzentrationen im Bereich von 1 x 10^3-1 x 10^6 VP/Zelle (VP/Z) als Dreifachbestimmung infiziert. Als Negativkontrolle dienten nichtinfizierte Zellen, deren Eigenfluoreszenz vom Messwert subtrahiert wurde. Im ersten Ansatz wurden die Tumorzelllinie MDA-MB-231 und PBMCs von gesunden Spendern in getrennten Wells ausplattiert (Abbildung 3.8A), in einem zweiten Versuchsansatz wurden beide Zelltypen in einem Well zusammen ausplattiert, wobei die Gesamtzellzahl pro Well gleich blieb (Abbildung 3.8B).

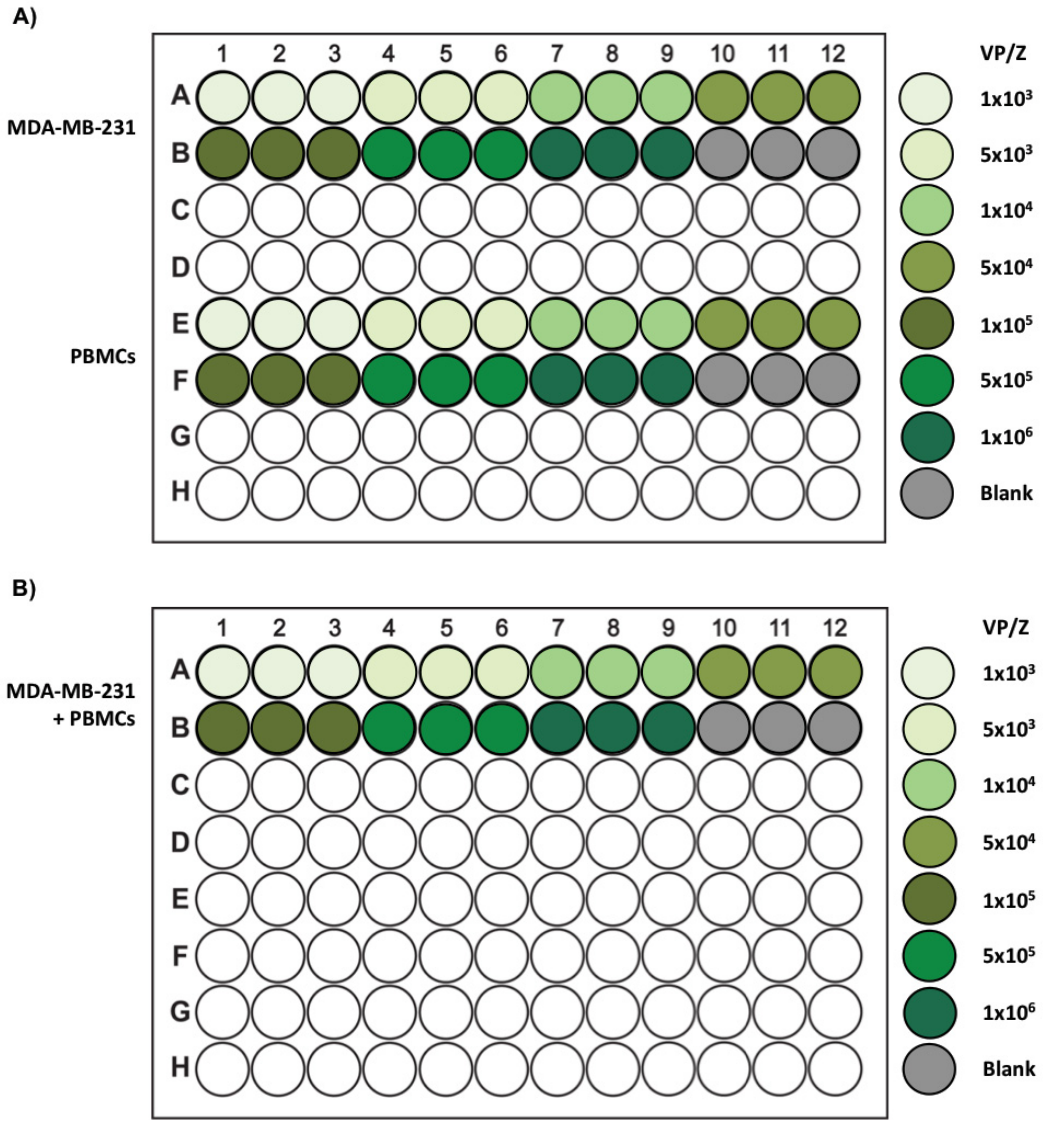


Abbildung 3.8: Pipettierschema eines Luziferase-Assays. Die Viruskonzentrationen wurden als Dreifachbestimmung angesetzt. Als Blank wurden Zellen verwendet, die nicht infiziert wurden. **A**) MDA-MB-231 und PBMCs wurden getrennt ausplattiert. MDA-MB-231-Zellen wurden in den Reihen A und B und die PBMCs gesunder Spender wurden in den Reihen E und F ausplattiert. Von beiden Zelltypen wurden jeweils 1 x 10^4 Zellen pro Well ausplattiert. B) MDA-MB-231 und PBMCS eines gesunden Spenders wurden gemeinsam in einem Well ausplattiert. Pro Well wurden jeweils 5 x 10^3 MDA-MB-231 und PBMCs ausplattiert, so dass die Gesamtzellzahl 1 x 10^4 Zellen pro Well betrug. VP/Z = Viruspartikel pro Zelle.

Nach 24 h wurden die Zellen für 3 min bei 400 x g und RT abzentrifugiert und das Medium vorsichtig aspiriert und verworfen. Die Zellen wurden mit 50 µl der entsprechenden Virusverdünnung, angesetzt in Infektionsmedium, infiziert und 2 h bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Wachstumsmedium pro Well dazugegeben und die Platten für weitere 48 h bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium nach einer kurzen Zentrifugation abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 100 µl Glo Lysis-Puffer pro Well für 5 min bei RT lysiert.

Anschließend wurden 100 µl Bright-Glo™ Assay Reagenz pro Well dazugegeben. Die Luziferase-Aktivität wurden in einem Plattenluminometer der Fa. Labsystem als Lichtemission pro Well pro Sekunde gemessen.

3.9 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Um eine möglichst hohe und für die eingesetzten Zellen tolerierbare Virusmenge zu bestimmen, wurde die Viabilität der Zellen nach Infektion mit ansteigenden Viruskonzentrationen mittels MTT-Assay gemessen. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) ist ein gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz, welches von lebenden Zellen durch Dehydrogenase-Enzyme in das unlösliche, violette Formazan umgewandelt wird (Abbildung 3.9, (Mosmann, 1983; Stockert et al., 2012)). Durch Zugabe einer sauren, alkoholischen Fixierungslösung wird das unlösliche Salz in Lösung gebracht (Mosmann, 1983) und die Absorption kann anschließend spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt werden.

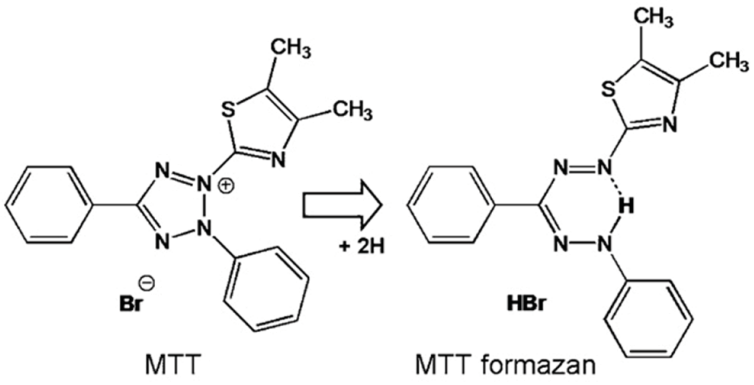


Abbildung 3.9: MTT-Reaktion. Reduktion des wasserlöslichen MTT in ein unlösliches Tetrazoliumsalz (Stockert et al., 2012).

Wie in Abbildung 3.10 dargestellt wurden pro 96-Well-Platte je nach verwendeter Zelllinie aufgrund unterschiedlichen Wachstumsverhaltens 0.3×10^4-1.4×10^4 Zellen/Well in 100 µl Wachstumsmedium ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 für 24 h inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Virusmengen in je 50 µl Infektionsmedium inkubiert und 2 h später mit 50 µl Wachstumsmedium überschichtet. Dann wurden die Zellen 48 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl MTT-Reagenz pro 100 µl Mediumvolumen und eine

Inkubation im Brutschrank unter lichtgeschützten Bedingungen. Nach 4 h wurden 50 µl Fixierungslösung pro 20 µl MTT-Reagenz auf die Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubation im Brutschrank für genau 24 h wurde die Messung der Extinktion bei 540 nm an einem ELISA-Reader der Fa. Tecan durchgeführt.

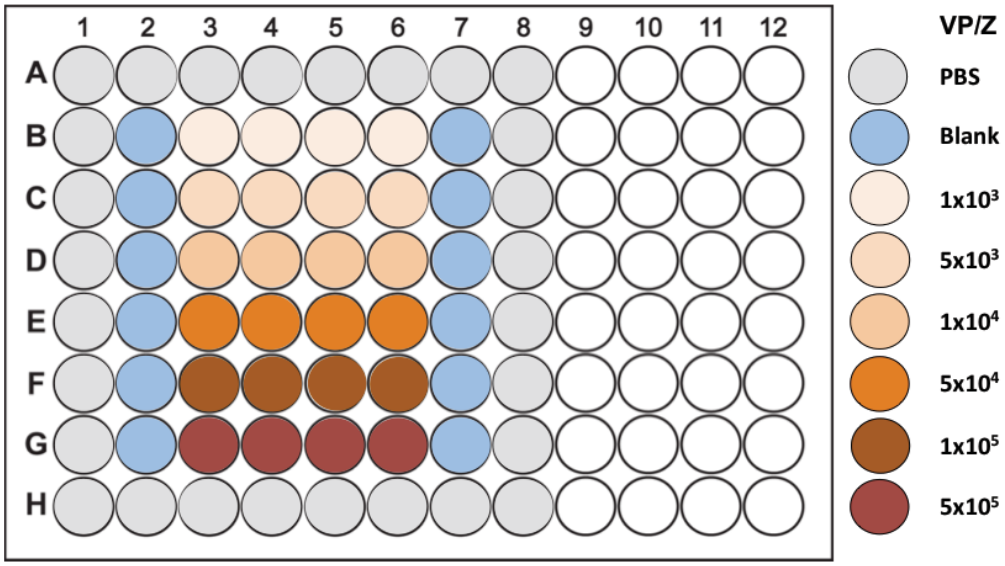


Abbildung 3.10: Pipettierschema eines MTT-Assays. In einer 96-Well-Platte wurden je nach Zelllinie 0.3 x 10^4-1.4 x 10^4 Zellen/Well ausplattiert und mit Viruskonzentrationen im Bereich von 1 x 10^3-5 x 10^5 VP/Z infiziert. Für jede Viruskonzentration wurde eine Vierfachbestimmung angesetzt. In den als Blank markierten Wells wurden alle Reagenzien eingesetzt, aber keine Zellen. VP/Z = Viruspartikel pro Zelle.

3.10 Infektion von Zelllinien mit Ad5EGFP und Ad5/3GFP

Um zunächst einen Überblick über die Effizienz der Infektion mit beiden Viruskonstrukten (Ad5EGFP und Ad5/3GFP) zu erhalten, wurden alle unter Punkt 2.11 aufgelisteten Tumorzelllinien mit diesen infiziert und 24 h sowie 48 h später die Positivität der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Es wurden ansteigende Viruskonzentrationen verwendet, um abschätzen zu können, in welchem Konzentrationsbereich man in nachfolgenden Versuchen arbeiten kann. Je nach Wachstumsverhalten der Zelllinien wurden Zellen im Bereich von 3 x 10^3-1.4 x 10^4 Zellen pro 96-Well als Dreifachansatz in Wachstumsmedium ausplattiert und bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit ansteigenden Viruskonzentrationen von 1 x 10^4-5 x 10^5 VP/Z in 50 µl Infektionsmedium infiziert und für zwei Stunden bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit 150 µl Wachstumsmedium aufgefüllt und bis

zur Auswertung bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 inkubiert. Der Verlauf der Infektion wurde 24 h und 48 h nach der Infektion an einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und bewertet.

3.11 Transiente Virusinfektion

Die zirkulierenden Tumorzellen von Patienten sollten nach der Isolierung aus Patientenproben am besten in einem möglichst originalen Zustand analysiert werden, um unverfälschte Eigenschaften dieser Zellen zu erhalten. Um dies im Modellsystem zu testen, wurde der transiente Charakter der Infektion mit Adenoviren an einer Zelllinie untersucht. Da Adenoviren epichromosomal im Zellkern vorliegen, somit deren rekombinante DNA den lysosomalen Abbauprozessen der Zelle unterliegt und darüber hinaus die hier verwendeten rekombinanten Viren auch replikationsinkompetent sind, sollten die Viren nach einiger Zeit aufgrund von Zellteilungen „verdünnt“ werden.

Für diesen Versuch wurde die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3.ip mit beiden Viren (Ad5EGFP und Ad5/3GFP) in 6-Well-Platten infiziert. Zu diesem Zweck wurden 1 x 10^5 Zellen pro Well in 3 ml Wachstumsmedium ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 1 x 10^4 VP/Z in höchstens 500 µl Infektionsmedium infiziert. Nach 2 h wurde den Zellen 3 ml Wachstumsmedium zugesetzt. Im Zeitraum von 3-15 Tagen nach der Infektion wurden die Zellen nahezu täglich im Durchflusszytometer auf ihre EGFP/GFP-Expression hin untersucht. Alle Inkubationsschritte wurden bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten nichtinfizierte Zellen. Um den Anteil an toten Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen vor der Analyse mit PI im Verhältnis 1:200 versetzt.

3.12 Zellsortierung mittels FACS für Einbringungsversuche

Um herauszufinden, wie spezifisch und sensitiv die Infektion von epithelialen Zellen vor einem hohen Hintergrund von PBMCs ist, wurden MDA-MB-231-Zellen in definierten Zellzahlen per *fluorescence activated cell sorting* (FACS) an einem MoFlo™ XDP-Sorter der Fa. Beckman Coulter als Zwölffachbestimmung in eine 96-Well-Platte sortiert. In jedem Well waren 1 x 10^5 PBMCs in 200 µl Wachstumsmedium vorgelegt. Die Zahl der CTCs in einer

Blutprobe kann zwischen 0 und 100,000 pro ml Blut liegen (Pachmann et al., 2008). Die Anzahl von 1 x 10^5 PBMCs entspricht in etwa der Menge von 0.01 ml Blut. Somit könnte man annehmen, dass pro 1 x 10^5 PBMCs/Well bis zu 1,000 CTCs vorkommen könnten. Jede potentielle CTC sollte mit je 1 x 10^4 VP/Z infiziert werden. Diese Konzentration wurde in vorangegangenen Versuchen ermittelt (3.8, 3.9, 3.10, 3.11). Die sortierten Zellen konnten ÜN bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 im Brutschrank anwachsen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Ad5/3GFP in einer Konzentration von 1 x 10^7 VP/Well in 50 µl Infektionsmedium infiziert. Nach 2 h wurden 150 µl Wachstumsmedium zugegeben. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die Anzahl GFP-positiver Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

3.13 Infektion von Blut- und DLA-Proben

Für die virale Transduktion zirkulierender Tumorzellen mit Ad5/3GFP wurden Blut- und DLA-Proben von Tumorpatienten frisch aufgearbeitet (3.7.3 und 3.7.4). Die aufgearbeiteten Zellen wurden auf eine 6-Well-Platte aufgeteilt und im Brutschrank bei 37°C, 5 % (v/v) CO_2 ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und mittels Zentrifugation bei RT und 400 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1.5 ml Virusverdünnung aufgenommen und in 250 µl/Well wieder auf die 6-Well-Platte aufgeteilt. Die Virusverdünnung wurde in Infektionsmedium angesetzt und auf 3 x 10^8 VP/Well eingestellt. Zwei Stunden nach der Infektion wurden in jedes Well 1.75 ml Wachstumsmedium dazugegeben und 2-4 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter Punkt 3.15 beschrieben fixiert und auf GFP-positive Zellen hin untersucht. Einige Proben wurden vor der Fixierung noch mit einem CD45-Antikörper gefärbt (3.14).

3.14 CD45-Färbung der mit Ad5/3GFP infizierten DLA- und Blutproben

Vor der Einzelzellisolierung (3.15) wurde die mit Ad5/3GFP infizierte Zellsuspension der DLA- bzw. der Blutproben (3.13) mit PBS gewaschen und anschließend mit einem CD45-Antikörper gefärbt. Der CD45-Antikörper wurde zunächst mit einem Alexa Fluor® 555

Sekundärantikörper selbstkonjugiert. Hierzu wurde das Zenon® Alexa Fluor® 555 Mouse IgG1 Labeling Kit der Fa. Life Technologies™ verwendet. Zu Beginn wurde 1 µg CD45-Antikörper in 19 µl PBS vorbereitet. Zu der Antikörperlösung wurden 10 µl der Komponente A hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der Komponente B dazugegeben und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Der selbstkonjugierte CD45 Alexa Fluor® 555 Antikörper wurde im Verhältnis 1:20 zu der Zellsuspension gegeben und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die gefärbte Probe wurde 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie unter 3.15 beschrieben fixiert.

3.15 Einzelzellisolierung aus DLA- und Blutproben

Die Zellen der DLA- und Blutproben wurden vor der Untersuchung auf GFP-positive Zellen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und abschließend in 1 ml PBS resuspendiert. Ein *Chamber Slide* wurde mit FBS beschichtet und die fixierten Zellen anschließend aufgebracht. Nach Sedimentation der Zellen wurden GFP-positive Zellen mithilfe einer Glaskapillare und eines Mikromanipulators auf einen mit FBS beschichteten und mit PBS befüllten neuen *Chamber Slide* überführt. Von dort aus wurde die gepickte Zelle unter Sicht mit einer Pipette in einem Volumen von 1 µl aufgenommen und in ein 200 µl Reaktionsgefäß mit vorbereitetem Proteinase K-Mix überführt (3.16.1).

3.16 MSE-PCR

Für die gesamtgenomische Amplifikation (WGA, *whole genome amplification*) der Einzelzell-DNA, wurde die von Klein et al. etablierte MSE-PCR (Klein et al., 1999) mit Modifikationen nach Stoecklein et al. (Stoecklein et al., 2002) durchgeführt. Diese beruht auf dem Prinzip einer Adapter-Linker-PCR. Alle Reaktionsschritte wurden in PCR-Zyklern durchgeführt.

3.16.1 Proteinase K-Verdau

Die aufgenommene Zelle wurde wie unter 3.15 beschrieben in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt, in welchem 2 µl Proteinase K-Mix vorgelegt waren. Dieser bestand aus folgenden Komponenten:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
OPA	0.2
Tween (10 %ig)	0.13
Igepal (10 %ig)	0.13
Proteinase K (10 mg/ml)	0.26
H_2O	1.28

Durch diesen Proteinase K-Verdau wird die DNA von Membran- und Zellproteinen befreit. Der Proteinase K-Verdau wurde bei 42°C für 10 h durchgeführt. Die anschließende Denaturierung der Proteinase K erfolgte unterhalb des Schmelzpunktes der DNA bei 80°C für 10 min, da die DNA für die anschließende Ligation doppelsträngig sein musste.

3.16.2 *Mse*I-Verdau und Preannealing

Das Genom der gepickten Einzelzelle wurde mithilfe des Restriktionsenzyms *Mse*I fragmentiert. Der enzymatische Verdau wurde bei 37°C für 3 h durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
OPA	0.2
*Mse*I (50 U/µl)	0.2
H_2O	1.6

Das *Mse*I-Restriktionsenzym wurde abschließend bei 65°C für 5 min inaktiviert. Durch den Verdau wurden 5'TA Überhänge generiert, sogenannte *sticky ends* (klebrige Enden). An diese wurden Adapter ligiert, die aus den Oligonukleotiden LIB1 und ddMSE11 generiert wurden. Hierfür wurde folgender Versuchsansatz gewählt:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
OPA	0.5
LIB1 (100 µM)	0.5
ddMse11 (100 µM)	0.5
H_2O	1.5

Die Basenpaarung des Adapters wurde durch langsames Abkühlen erreicht. Hierzu wurde ein Temperaturgradient von 65°C-15°C gewählt, bei dem jeder Temperaturschritt von 1°C für 1 min gehalten wurde.

3.16.3 Ligation

Die Ligation der Adapter und der *Mse*I-fragmentierten DNA wurde über Nacht bei 15°C durchgeführt. Zu 3 µl der preannealten Adapter wurden je 1 µl ATP (10 mM) und 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) pipettiert und diese 5 µl zu der *Mse*I-verdauten Zelle gegeben.

3.16.4 Primäre PCR

Während der primären PCR findet eine globale Genomamplifikation der Einzelzelle statt. Zunächst wurden dazu die Hilfsprimer ddMse11 entfernt. Hierzu wurde ein initialer Schritt von 68°C für 3 min eingefügt. Die Temperatur liegt über dem Schmelzpunkt der ddMse11-Primer. Diese haben keine Phosphatreste, wodurch diese nicht so fest gebunden sind wie LIB1, so dass sie bei den gegebenen Bedingungen von der DNA dissoziieren. LIB1 hingegen dient hier als universelle Primerbindungsstelle für die Amplifikation des gesamten Genoms der Einzelzelle. Es folgt eine Auffüllreaktion der 3'-rezessiven Enden der Fragment-Adapter-Konstrukte, wodurch komplementäre LIB1-Primerbindungsstellen entstehen. Der im Überschuss im Reaktionsmix vorliegende Primer LIB1 lagert sich anschließend an die geschaffenen Bindungsstellen an und in den folgenden PCR-Zyklen wird das Genom der Einzelzelle amplifiziert. Hierfür wurde das Expand Long Template PCR System der Fa. Roche verwendet. Das Produkt dieser Amplifikation wird im Folgenden als WGA-Produkt bezeichnet.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
Expand Long Template Puffer 1 (10 x)	3
dNTPs (10 mM)	2
Expand Long Template Enzyme Mix (5 U/µl)	1
H_2O	35

Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde angewendet:

Tabelle 3.2: Amplifikationsprotokoll der primären PCR. Z = Zyklus, ’ = Minute, ’’ = Sekunde

1 x		14 x		8 x		22 x		1 x	
68°C	3’	94°C 57°C 68°C	40’’ 30’’ 1’ 30’’ + 1’’/Z	94°C 57°C 68°C	40’’ 30’’ + 1°C/Z 1’ 45’’ + 1’’/Z	94°C 65°C 68°C	40’’ 30’’ 1’ 53’’ + 1’’/Z	68°C 4°C	3’ 40’’ halten

3.16.5 Kontroll-PCR

Um die Qualität des WGA-Produkts zu bestimmen, wurden bestimmte genomische MSE-Fragmente amplifiziert. Als Primerpaare wurden im Folgenden verwendet: TP53 Exon 2/3 und CK19. Als Positivkontrolle wurde ein Pool von WBCs des Patienten mitgeführt. Die Negativkontrolle enthielt keine DNA. Von einem qualitativ guten primären PCR-Produkt kann man sprechen, wenn zwei spezifische Fragmente amplifiziert werden konnten. Der Nachweis von *TP53* kann erfolglos sein, da in Tumorzellen ein Verlust von *TP53* möglich ist. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x)	5
CK19 for (10 µM)	0.1
CK19 rev (10 µM)	0.1
TP53 2/3 for (5 µM)	0.3
TP53 2/3 rev (5 µM)	0.3
H_2O	4.2

Es wurden 9.5 µl des Mastermixes mit 0.5 µl des Produkts der primären PCR gemischt und die Amplifikation mit nachfolgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	1 x	14 x	24 x	1 x
94°C	2 min	15 sec	15 sec	
65°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

Im Anschluss wurden die WGA-Produkte der Kontroll-PCR in einem 1.5 %igen Agarose-Gel + GelRed™ ihrer Größe nach aufgetrennt (3.2.9). Bei einer Spannung von 130 V wurden die Proben über einen Zeitraum von 45 min aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 50 bp DNA-Leiter (Abbildung 2.1)

3.17 Molekularzytogenetik

3.17.1 Vergleichende genomische Hybridisierung auf DNA-Microarrays

Die vergleichende genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridisation,* CGH) auf DNA-Microarrays (Array-CGH, aCGH) ist eine molekularzytogenetische Methode, um hochauflösend das gesamte Genom auf Kopienzahlveränderungen (*copy number alterations,* CNAs) in einer Probe hin analysieren zu können. Der Arbeitsablauf der aCGH ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Hierzu wird die zu untersuchende genomische DNA (gDNA) einer Einzelzelle sowie eine Einzelzell-Referenz-DNA unterschiedlich farblich markiert und auf einen Array (Glasobjektträger) hybridisiert. Je nach Genotyp der Probe wurde ein weiblicher oder männlicher Genotyp der Referenz-DNA verwendet. Auf dem Objektträger ist das gesamte Genom durch synthetisch hergestellte 180,000 DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 60 bp repräsentiert. In dieser Arbeit wurden 4 x 180 k Arrays der Fa. Agilent Technologies verwendet. Die aCGH-Analysen wurden basierend auf dem von Möhlendick et al. entwickelten Protokoll durchgeführt (Möhlendick et al., 2013). Die Proben auf den Arrays sind mit der Annotation der Gene der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Version 36 bzw. mit der Datenbank der Universität von Kalifornien (UCSC, Version hg18, März 2006) abgeglichen (Agilent Technologies). Die Proben sind auf dem Array nicht in der Reihenfolge aufgetragen, wie sie auf den Chromosomen vorliegen. Sollte ein Teil der Proben ausfallen, z. B. durch schlechte Hybridisierung oder Verschmutzung, sind keine ganzen Chromosomen betroffen, so dass der Array dennoch ausgewertet werden kann. In die aCGH-Versuche wurde die DNA der gepickten Einzelzellen der Patienten nach ausreichender Kontrolle der DNA-Qualität eingesetzt (3.16.5 und 3.17.1.1).

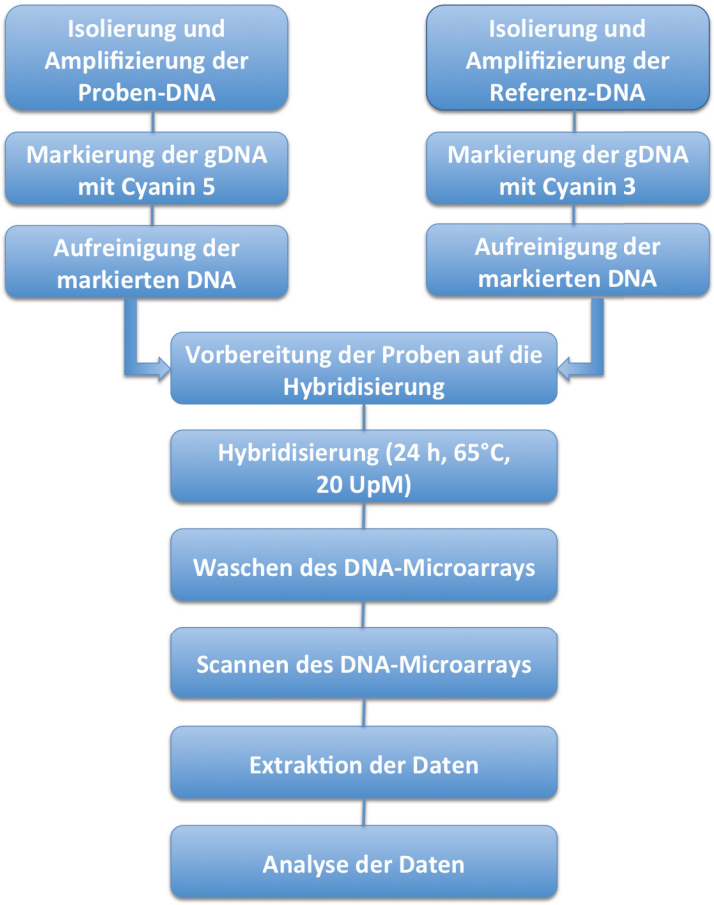


Abbildung 3.11: Arbeitsablauf der aCGH. Die ersten Arbeitsschritte bei der Aufbereitung der Proben- und Referenz-DNA laufen getrennt voneinander ab. Zunächst wurde aus Einzelzellen die gDNA isoliert und amplifiziert. Anschließend wurde die DNA mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert und aufgereinigt. Die beiden markierten gDNAs wurden vereint und auf einen DNA-Microarray hybridisiert. Nach 24 h wurde der Array gewaschen und gescannt. Abschließend erfolgte die Datenextraktion und -analyse.

3.17.1.1 Multiplex-PCR zur Kontrolle der Qualität von Einzelzellamplifikaten

Bevor die DNA einer Einzelzelle auf einen Array hybridisiert wurde, musste zunächst die Qualität des WGA-Produkts kontrolliert werden. Zusätzlich zur Kontroll-PCR (3.16.5) wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Hierbei wurden Primer für sechs verschiedene Genloci (*LAMC1, CADPS, GRIK5, NEK9, PICK1, DNAH9*) verwendet, die auf sechs verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Tabelle 2.4) (Knijnenburg et al., 2007). Als Template diente die unter Punkt 3.16.4 amplifizierte DNA einer Einzelzelle. Als Positivkontrolle wurde ein Pool einer gesamtgenomischen DNA verwendet und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 x)	5
Primer-Mix (10 x)	1
Template-DNA	0.5
dH2O	3.5
Gesamtvolumen	10

Das Amplifikationsprotokoll wurde wie folgt gewählt:

Temperatur	Dauer	Wiederholung
95°C	2 min	
95°C	30 sec	33 x
60°C	40 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte über ein 1.5 %iges Agarose-Gel mit GelRed™ (2.9.1, 3.2.9) bei 130 V für 60 min. Als Größenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter (Abbildung 2.1). Ein Einsatz der Proben für die aCGH erfolgte bei einer erfolgreichen Amplifikation von mindestens drei Genloci.

3.17.1.2 Aufreinigung der amplifizierten DNA für die Array-CGH

Um die amplifizierte DNA der Einzelzelle von Primerresten zu befreien, den Puffer auszutauschen und das Produkt zu konzentrieren, wurde das Amicon® Ultra 0.5 Kit der Fa. Millipore verwendet.

Die gesamte Probe der Einzelzellamplifikation wurde zu Beginn kurz abzentrifugiert und dann mit 430 µl 1 x TE-Puffer, pH 8.0 versetzt. Die Probe wurde auf einen Dialysefilter gegeben und 10 min bei 14,000 x g zentrifugiert und das Filtrat anschließend verworfen. Auf den Filter wurden 480 µl 1 x TE-Puffer gegeben und erneut zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen, der Filter daraufhin invertiert und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gestellt. Die Probe wurde 1 min bei 1,000 x g zentrifugiert und im Reaktionsgefäß aufgefangen. Die DNA-Konzentration wurde im Spektralphotometer gemessen (3.2.4).

3.17.1.3 Fluoreszenzmarkierung der genomischen Einzelzell-DNA

Die Tumorzell-DNA wurde mit Cyanin 5 und die Referenz-DNA mit Cyanin 3 markiert. Für diese Fluoreszenzmarkierung wurde das SureTag Complete DNA Labeling Kit der Fa. Agilent

Technologies verwendet. In die Markierung wurden 1.5 µg DNA eingesetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 24 µl aufgefüllt. Im sogenannten *random priming* werden als Primer Hexaoligonukleotide mit zufälliger Sequenz verwendet, die sich an die denaturierte DNA anlagern und dem Exo (-) Klenow-Fragment als Startstelle für die Synthese des komplementären DNA-Strangs dienen. Das Klenow-Fragment besitzt die Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase I, aber nicht mehr ihre 5'→3' und 3'→5' Exonukleaseaktivität. Das Fehlen der 3'→5' Exonukleaseaktivität ist wichtig, da in der Reaktion nicht nur unmarkierte Nukleotide in die DNA eingebaut werden, sondern auch die markierten Nukleotide Cyanin 3-dUTP bzw. Cyanin 5-dUTP. Diese würden durch die Exonukleaseaktivität wieder entfernt werden. In einem 200 µl Reaktionsgefäß wurden der DNA zunächst 5 µl Random Primer zugefügt. Dieser Ansatz wurde für 3 min bei 95°C im Thermozykler denaturiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min auf Eis inkubiert. Folgender Mastermix wurde angesetzt:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
nukleasefreies H_2O	2
Puffer (5 x)	10
dNTPs (10 x)	5
Cyanin 3-dUTP/ Cyanin 5-dUTP	3
Exo (-) Klenow-Fragment	1
Gesamtvolumen	21

Zu der Proben-DNA wurden 21 µl des Cyanin 5-Mastermixes gegeben und zur Referenz-DNA jeweils die gleiche Menge des Cyanin 3-Mastermixes. Anschließend wurden die Proben für 2 h bei 37°C im Thermozykler inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen 10-minütigen Schritt bei 65°C gestoppt. Die Probe wurde entweder direkt weiterbearbeitet oder bei -20°C bis zu einen Monat lang gelagert.

3.17.1.4 Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten DNA und Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die fluoreszenzmarkierte DNA wurde erneut wie unter Punkt 3.17.1.2 beschrieben aufgereinigt. Um die Einbaurate der markierten Nukleotide in die DNA zu überprüfen, wurde die spezifische Aktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität ist wie folgt definiert:

$$\textbf{Spez. Aktivität (pmol/µg)} = \left[\textbf{(pmol/µl Farbe / (µg/µl gDNA)}\right]$$

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Absorption der beiden Farbstoffe Cyanin 3 und Cyanin 5 im Spektralphotometer gemessen. Die Fa. Agilent Technologies gibt die in Tabelle 3.3 aufgeführten Werte bei einer erfolgreichen Markierung der gDNA an. Proben, bei denen keine Konzentrationserhöhung oder eine zu schlechte Aktivität gemessen wurde, wurden in den folgenden Schritten nicht weiterprozessiert, da keine gute Qualität auf dem Array zu erwarten gewesen wäre.

Tabelle 3.3: Angaben der Fa. Agilent Technologies der zu erwartenden Werte für Ausbeute und spezifische Aktivität auf Einzelzellebene. gDNA = genomische DNA, spez. = spezifische, Cy3 = Cyanin 3, Cy5 = Cyanin 5

Menge eingesetzte gDNA (µg)	Ausbeute (µg)	Spez. Aktivität Cy3 (pmol/µg)	Spez. Aktivität Cy5 (pmol/µg)
1.5	9-12	25-40	20-35

3.17.1.5 Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten DNA auf die Hybridisierung

Nach der Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden die markierte Proben-DNA und die markierte Referenz-DNA (aus Punkt 3.17.1.3) in einem lichtgeschützten 1.5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Für die Hybridisierungsreaktion wurde das Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit der Fa. Agilent Technologies verwendet. Vor einer erneuten Denaturierung der DNA wurden 71 µl des folgenden Hybridisierungs-Mastermixes zur Probe dazugegeben:

Komponente	1 x Ansatz (µl)
Cot-1 DNA (1 mg/ml)	5
Blocking Agent (10 x)	11
Hi-RPM Puffer (2 x)	55
Gesamtvolumen	71

Der Hybridisierungsansatz wurde zunächst für 3 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und dann für 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 6,000 x g zentrifugiert.

3.17.1.6 Hybridisierung

Für die Hybridisierung auf den Oligonukleotidarray wurden zunächst 100 µl der Probe auf ein sogenanntes *Backing* pipettiert, das die Probenauftragsfläche durch Gummidichtungen begrenzt. Eventuell auftretende Luftblasen aufgrund des Auftragens wurden durch die Ecke eines Deckglases zerstört. Auf das *Backing* wurde vorsichtig die mit

Oligonukleotiden bestückte Seite des Arrays gelegt und beide Objektträger durch eine Metallklammer fest miteinander verbunden. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte für 24 h bei 65°C und 20 UpM im Hybridisierungsofen der Fa. Agilent Technologies.

3.17.1.7 Waschen des DNA-Microarrays

Alle Waschschritte wurden unter dem Abzug unter Rühren mit einem Rührfisch durchgeführt. Da Cyanin 5 anfällig für eine Ozondegradierung ist (Fare et al., 2003), wurde mit einer Stabilisierungslösung gearbeitet. Zunächst wurden nach der Hybridisierung (3.17.1.6) *Backing* und Array mithilfe einer Pinzette im Oligo aCGH Waschpuffer 1 vorsichtig voneinander getrennt. Der Array wurde dann für 5 min bei RT in Oligo aCGH Waschpuffer 1 gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschritt für 1 min im Oligo aCGH Waschpuffer 2, der auf 37°C vorgewärmt wurde. Es folgte eine Inkubation in Acetonitril bei RT für 10 sec. Abschließend wurde der Array für 30 sec in eine Stabilisierungs- und Trockenlösung gegeben. Nach diesem letzten Schritt wurde der Array langsam und gleichmäßig aus der Lösung gehoben, um eine Tröpfchenbildung auf dem Array zu verhindern. Abschließend wurde der Array in eine Plastikhalterung eingelegt, mit einem Plastikdeckel zum Schutz vor Ozon versiegelt und direkt im Anschluss gescannt.

3.17.1.8 Scannen des DNA-Microarrays

Das Scannen des Microarrays erfolgte im Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf im Scanner G2565CA der Fa. Agilent Technologies. Die Proben wurden mit einem SHG-YAG-Laser (532 nm) und einem Helium-Neon-Laser (633 nm) angeregt. Die beiden Fluorochrome Cyanin 3 und 5 absorbieren das Licht des Lasers. Die von den Fluorochromen emittierten Lichtsignale werden über spezifische Filter zu einem Photomultiplier geleitet. Hier werden die Signale digitalisiert und eine Bilddatei erstellt, die mit einem speziellen Programm verarbeitet werden kann.

3.17.1.9 Auswertung der gewonnenen aCGH-Daten

Die aCGH-Daten wurden mithilfe des Programms *Feature Extraction* (Version 11.5.1.1) der Fa. Agilent Technologies extrahiert. In einem Qualitätsbericht, dem sogenannten *QC report*, erhält man Auskunft über die Qualität des Arrays und den Verlauf der Analyse. Da viele Faktoren die Qualität der aCGH beeinflussen können, wie das Array-Format,

Probenquelle, Qualität der gDNA und der Verlauf des Experiments, gibt die Fa. Agilent Technologies Richtwerte für die Qualitätsbeurteilung der aCGH an, die in Tabelle 3.4 aufgelistet sind. Der sogenannte DLRSD-Wert (*Derivative Log Ratio Standard Deviation*) sollte hierbei unter 1 liegen, um eine hohe Genauigkeit der Analyse zu erreichen.

Tabelle 3.4: Richtwerte und Qualitätsparameter zur Beurteilung der aCGH-Hybridisierung von Einzelzellen laut Revision A0.2012 des Protokolls der Fa. Agilent Technologies. DLRSD = *Derivative Log Ratio Standard Deviation*

Parameter	empfohlen
BGNoise	<10
Signalintensität	>50
Signal-zu-Rauschen	>30
Reproduzierbarkeit	<0.2
DLRSD	<1

Die extrahierten Daten wurden mithilfe des Programms *Genomic Workbench* (V 7.0.4.0) visualisiert und analysiert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden folgende Parameter gewählt:

- Auswerte-Algorithmus: ADM-2, Schwellenwert 5.5
- Gleitender Mittelwert: lineares Fenster: 5 Mb
- Zentralisierung: aus
- Aberrationsfilter:
    - mindestens fünf konsekutive Oligonukleotide
    - minimale $\log_2$-Ratio: +/- 0.25

3.18 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit generierten Daten wurden, sofern nicht anders aufgeführt, in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, sofern nicht anders vermerkt. Die Berechnung der Signifikanzen wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß r^2 wurde aus dem nach Pearson berechneten Korrelationskoeffizienten r errechnet. Alle statistischen Tests wurden mit dem Programm GraphPad Prism (V 6.03) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 CAR-Expression in Tumorzelllinien

In dieser Arbeit sollten sowohl das CAR-abhängige Viruskonstrukt Ad5EGFP als auch das CAR-unabhängige Virus Ad5/3GFP als CTC-Detektionssysteme getestet werden. Daher wurde zunächst die *CAR*-Expression auf mRNA- und Proteinebene (CAR) in den hier verwendeten Zelllinien untersucht. In Abbildung 4.1 ist die mittels qRT-PCR analysierte mRNA-Expression von *CAR* in verschiedenen Tumorzelllinien dargestellt. Es ergaben sich deutliche Unterschiede in der Gen-Expression zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien (Abbildung 4.1). So zeigte die Kolonkarzinom-Zelllinie COLO205 die niedrigste und die Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 die höchste *CAR*-Expression. Selbst Zelllinien des gleichen Zelltyps zeigten Unterschiede in der Expression von *CAR*, wie z. B. die Kolonkarzinom-Zelllinien CACO-2 und COLO205 bzw. die Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145 und PC-3.

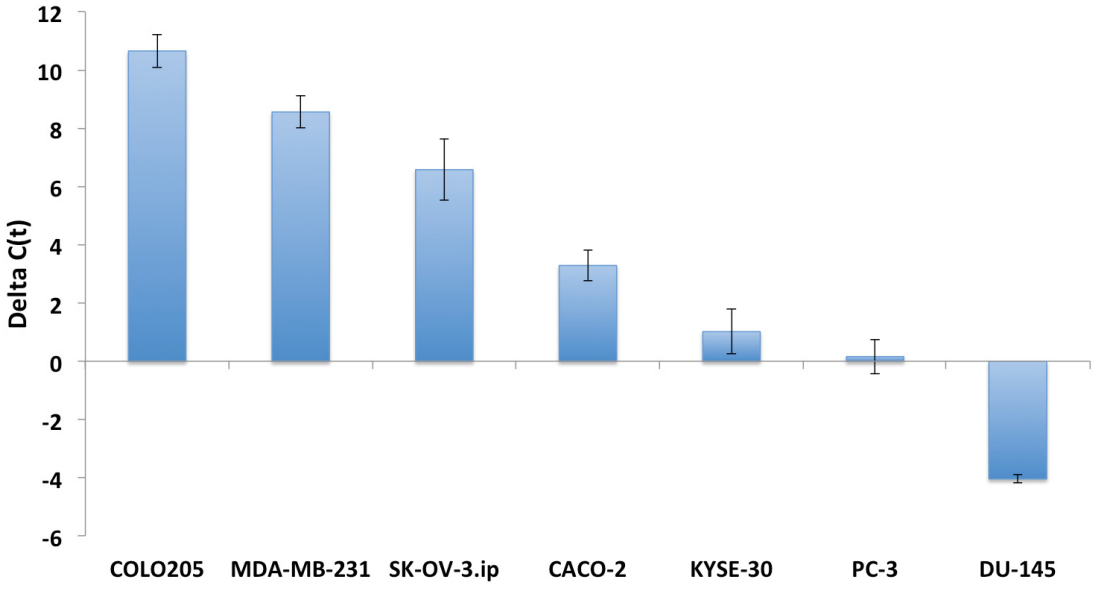


Abbildung 4.1: mRNA-Expression von *CAR* in verschiedenen Tumorzelllinien. Die Expressionsdaten wurden mittels qRT-PCR erhoben. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung des Delta C(t)-Werts von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In einem nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob die CAR-Expression auf Proteinebene ein ähnliches Bild zeigt. Hierfür wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, welche anschließend mittels FACS analysiert wurden. Vor der FACS-Analyse wurden die Zelllinien mit einem primären CAR-Antikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 markiert. In Abbildung 4.2 ist die CAR-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien dargestellt. Vergleichbar zur mRNA-Expression (Abbildung 4.1) war auch bei der Proteinexpression eine starke Varianz zwischen den Tumorzelllinien verschiedener Zelltypen zu beobachten (Abbildung 4.2). Die Zelllinie DU-145 hatte analog zur mRNA-Expression auf Proteinebene ebenfalls die stärkste CAR-Expression. COLO205 wies auch hier die niedrigste CAR-Expression auf. Verglichen mit der *CAR*-Expression zeigte die Zelllinie MDA-MB-231 nun auf Proteineben eine höhere CAR-Expression als SK-OV-3.ip auf.

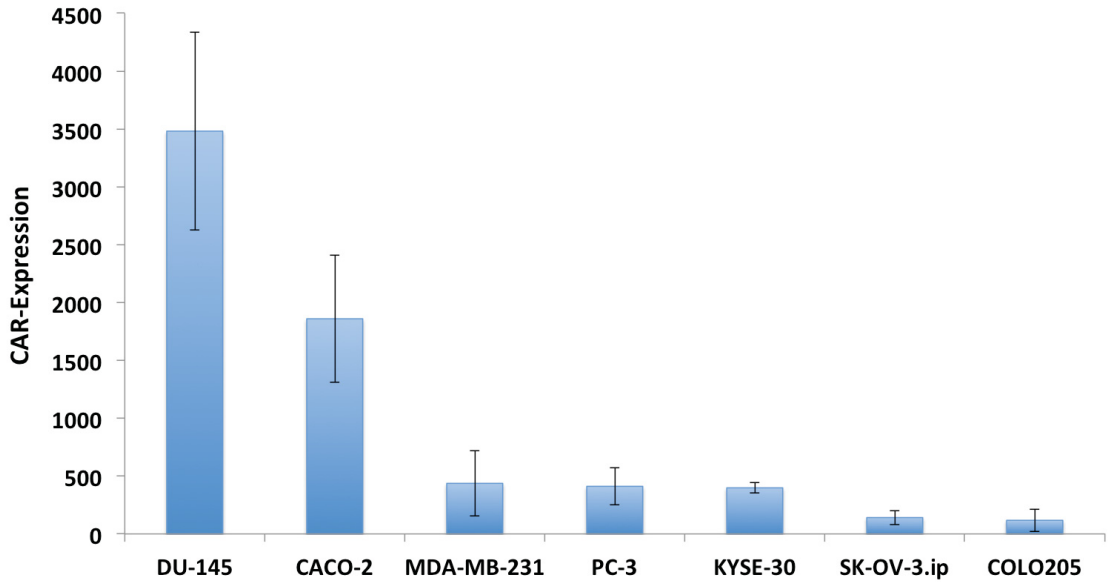


Abbildung 4.2: Proteinexpression von CAR in verschiedenen Tumorzelllinien. Die Expression von CAR wurde durch FACS-Analyse ermittelt. Hierzu wurden die Zelllinien mit einem primären CAR-Antikörper und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 markiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der CAR-Expression von drei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen.

4.2 Einfluss der EMT auf die *CAR*-Expression

EMT scheint ein wichtiger Mechanismus für die Herunterregulation von EpCAM und anderen epithelialen Markern bei CTCs zu sein (Gires and Stoecklein, 2014) und erschwert dadurch deren effektive Isolation und Detektion. Im Hinblick auf die Verwendung von CAR-abhängigen viralen CTC-Nachweissystemen war von großem Interesse, ob die *CAR*-Expression durch EMT beeinflusst wird. Um dies in einem Modellsystem unter kontrollierten Bedingungen testen zu können, wurde die mRNA-Expression von *CAR* bei

Zelllinien analysiert, bei denen eine EMT induziert wurde. Für diese Experimente wurde von der AG Gires aus München RNA aus Zelllinien zur Verfügung gestellt, die mit dem EMT-Induktor TGF-β1 behandelt wurden, sowie aus unbehandelten Vergleichszellen. Für eine Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurde RNA aus solchen Zelllinien verwendet, die bereits in dieser Arbeit für Versuche herangezogen wurden. Interessanterweise zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der *CAR*-Expression zwischen TGF-β1-behandelten und unbehandelten Zellen (Mann-Whitney-Test, $p > 0.05$) (Abbildung 4.3).

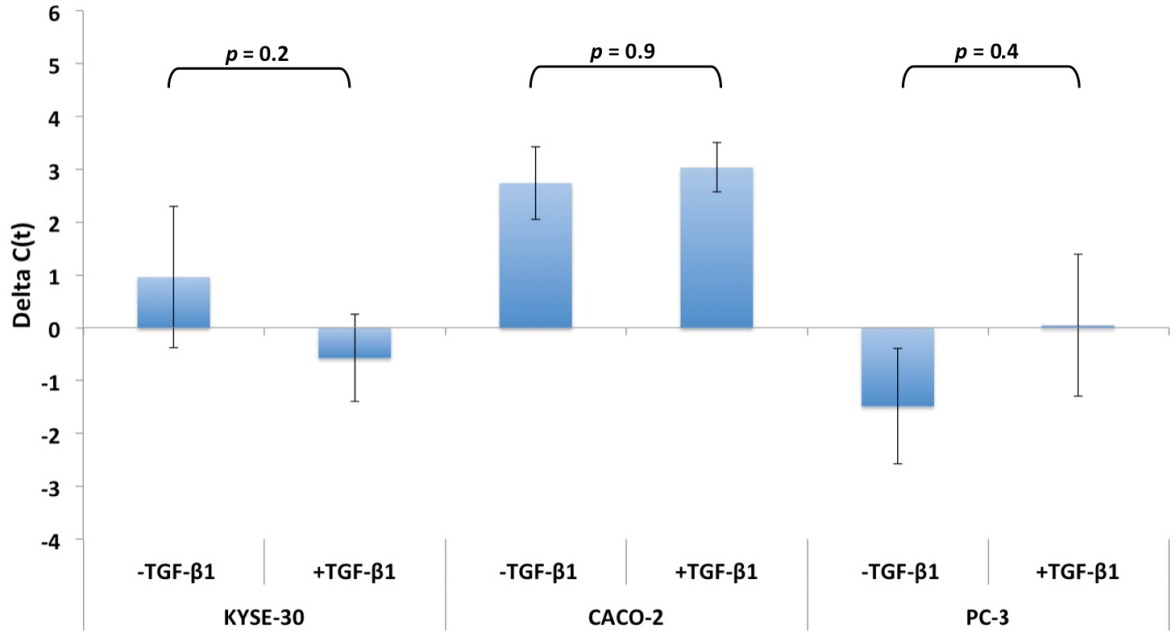


Abbildung 4.3: Einfluss der EMT auf die mRNA-Expression von *CAR* nach TGF-β1-Behandlung in Tumorzelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der Delta C(t)-Werte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4.3 Einfluss der Viruskonzentration auf die Zellviabilität

Da CTCs sehr selten sind und in nur sehr geringer Konzentration im Blut vorkommen, sollte sichergestellt sein, dass bei einer adenoviralen Infektion einer Patientenprobe *ex vivo* jede CTC von wenigstens einem Viruspartikel infiziert wird. Aus diesem Grund sollten möglichst hohe Viruskonzentrationen in den Versuchen eingesetzt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden ursprünglich für die Gentherapie entwickelt (Benihoud et al., 1999; Kanerva et al., 2002). Dort gilt es, möglichst geringe Viruskonzentrationen einzusetzen, um eine Immunantwort des Körpers zu verhindern (Bessis et al., 2004; Liu and Muruve, 2003; Muruve et al., 1999). Für die Applikation der Viren

im Rahmen der CTC-Detektion sind ausschließlich *ex-vivo*-Versuchsansätze vorgesehen, so dass der Aspekt der Immunantwort vernachlässigt werden konnte. Da Teramoto et al. aber einen Einfluss der Viruskonzentration auf die Viabilität primärer Lungenepithelzellen beschrieben haben (Teramoto et al., 1995), war es notwendig zu untersuchen, ob sehr hohe Viruskonzentrationen ebenfalls einen Einfluss auf die Zellviabilität in diesem Versuchskontext haben könnten und ob Ad5EGFP und Ad5/3GFP sich unterschiedlich auf die Viabilität auswirken.

Um zu überprüfen, welche maximalen Konzentrationen in späteren Detektionsexperimenten eingesetzt werden könnten, ohne einen Effekt auf die Viabilität der behandelten Zellen zu haben, wurden verschiedene Tumorzelllinien mit steigenden Viruskonzentrationen von Ad5EGFP und Ad5/3GFP infiziert. Genau 48 h nach der Infektion wurde die Viabilität der infizierten Zellen mittels MTT-Assay analysiert. In Abbildung 4.4 ist ein repräsentativer Versuch von drei voneinander unabhängig durchgeführten Analysen dargestellt. Die Viabilität der Zellen, die mit Ad5EGFP infiziert wurden, blieb über den gesamten Konzentrationsbereich stabil (Abbildung 4.4A). Wurden die Zellen jedoch mit dem tropismusmodifizierten Virus Ad5/3GFP infiziert, zeigten einige Zelllinien, darunter MDA-MB-231, SK-OV-3.ip, CACO-2 und DU-145, eine leichte Abnahme ($*p < 0.05$) der Zellviabilität unter dem Einfluss sehr hoher Viruskonzentrationen (Abbildung 4.4B).

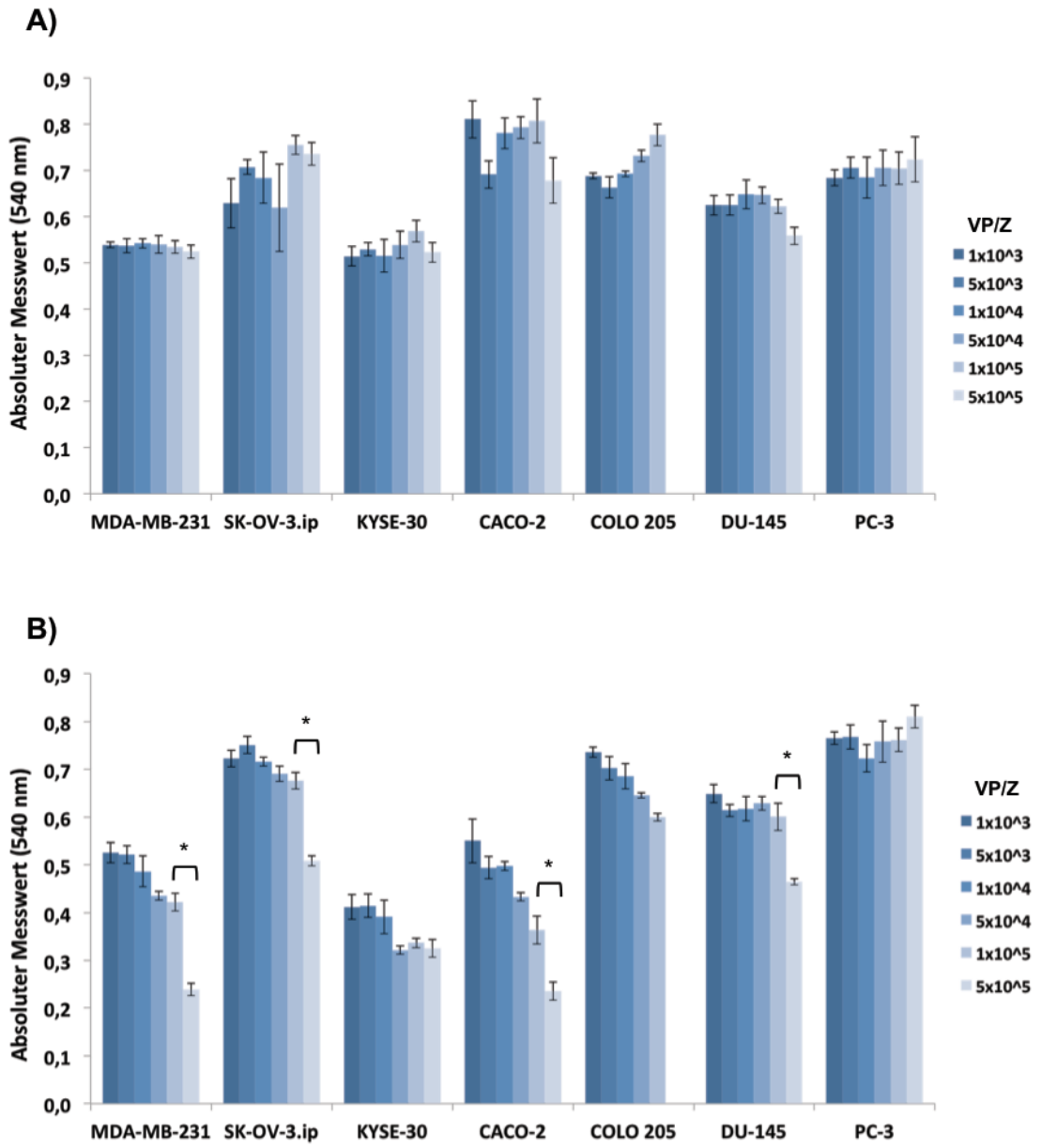


Abbildung 4.4: Untersuchung der Zellviabilität unter dem Einfluss steigender Viruskonzentrationen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch von drei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der absoluten Messwerte. **A)** Infektion der Tumorzelllinien mit steigenden Viruskonzentrationen von Ad5EGFP. **B)** Infektion der Tumorzelllinien mit steigenden Viruskonzentrationen von Ad5/3GFP. (Mann-Whitney-Test, $*p < 0.05$).

4.4 Transiente Infektion

Um die Eigenschaften von CTCs nicht nur in einer Momentaufnahme zu sehen, sondern um möglichst viele Informationen aus einer einzelnen Zelle zu erhalten, ist die Kultivierung dieser Zellen ein wichtiges Ziel in der CTC-Forschung. Hierdurch wäre es möglich, viele Informationen über verschiedene Eigenschaften dieser Zellen zu bekommen. Es könnten Daten auf Genom-, Transkriptom- und Proteomebene gewonnen werden, ebenso Daten zu

zellbiologischen Merkmalen. Jedoch ist dies bislang kaum möglich. Für die Kultivierung von CTCs wäre es wichtig, die Eigenschaften der Zellen so wenig wie möglich durch äußere Einflüsse zu verändern. Die hier untersuchten adenoviralen Detektionssysteme für CTCs sollten diese Anforderungen potentiell erfüllen können. Die Voraussetzung hierfür ist, dass die Infektion der Zellen nur transient ist und die Adenoviren somit nur einen vorrübergehenden Einfluss auf die Zellen haben. Um dies für das hier etablierte System zu testen, wurden 1 x 10^5 Zellen der Zelllinie SK-OV-3.ip mit beiden Viruskonstrukten und einer Viruskonzentration von jeweils 1 x 10^4 VP/Z infiziert. Die infizierten Zellen wurden dann über einen Zeitraum von 15 Tagen kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Zellen geerntet und die GFP/EGFP-Expression mittels FACS-Analyse dokumentiert. In Abbildung 4.5 ist der prozentuale Anteil GFP/EGFP-positiver und GFP/EGFP-negativer Zellen über einen Zeitraum von 15 Tagen nach der Infektion dargestellt. An Tag 3 nach der Infektion lag der Anteil EGFP-negativer und EGFP-positiver Zellen nach Infektion mit Ad5EGFP bei 55 % bzw. 45 %. Der Anteil EGFP-negativer Zellen stieg bereits nach 6 Tagen stark an, bis er schließlich nach 13 Tagen 100 % erreichte (Abbildung 4.5A). In Abbildung 4.5B ist der Anteil GFP-positiver und GFP-negativer Zellen nach Infektion mit Ad5/3GFP dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass an Tag 3 nach der Infektion der Anteil GFP-positiver Zellen mit 69 % höher war als mit dem Ad5-Virus (45 %, Abbildung 4.5A). Aber auch hier fiel der Anteil GFP-positiver Zellen bereits an Tag 6 nach der Infektion stark ab, bis er an Tag 15 bei 4 % lag.

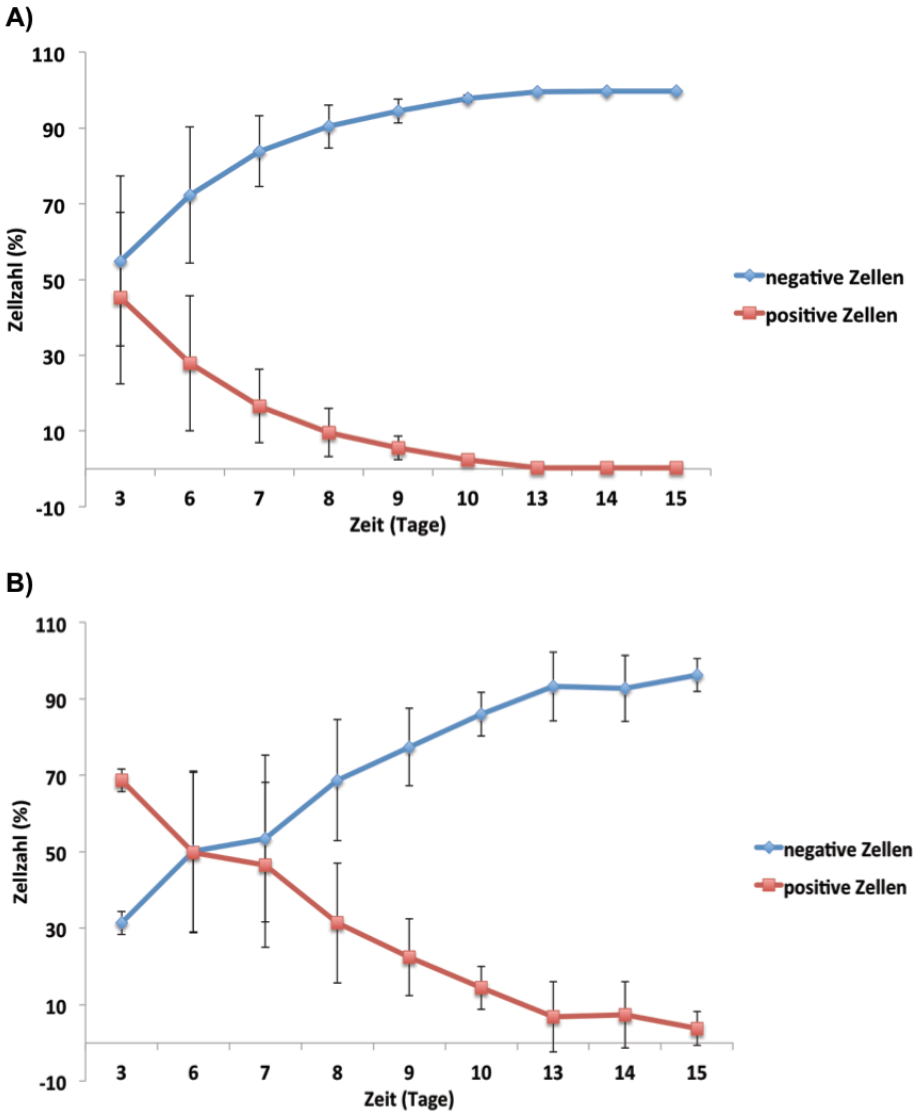


Abbildung 4.5: Überprüfung der transienten Infektion mit Ad5EGFP und Ad5/3GFP. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP/EGFP-positiver und -negativer Zellen der Zelllinie SK-OV-3.ip nach Virusinfektion. über einen Kultivierungszeitraum von 15 Tagen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten FACS-Analysen. **A)** Infektion mit Ad5EGFP. **B)** Infektion mit Ad5/3GFP.

Zur Überprüfung, ob die Virusinfektion einen Einfluss auf das Zellüberleben hat, wurden die infizierten Zellen und die korrespondierenden unbehandelten Kontrollzellen mit dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) gefärbt, um zwischen toten und lebenden Zellen differenzieren zu können. In den Abbildung 4.6 undAbbildung 4.7 sind die prozentualen Anteile der toten und lebenden Zellen über einen Zeitraum von 15 Tagen dargestellt. Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Der Anteil toter Zellen war bei den Ad5EGFP-infizierten Zellen (Abbildung 4.6A) nicht signifikant höher (Mann-Whitney-Test, $p = 0.2067$) als bei den Kontrollzellen (Abbildung 4.6B). Verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen konnte

jedoch bei den Ad5/3GFP-infizierten Zellen (Abbildung 4.7A) eine signifikant erhöhte Anzahl (Mann-Whitney-Test, $p < 0.0001$) toter Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.7B). Der Median der toten Zellen (Abbildung 4.7A) lag bei den Ad5/3-infizierten Zellen bei 27.8 % gegenüber 17.4 % bei den unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 4.7B).

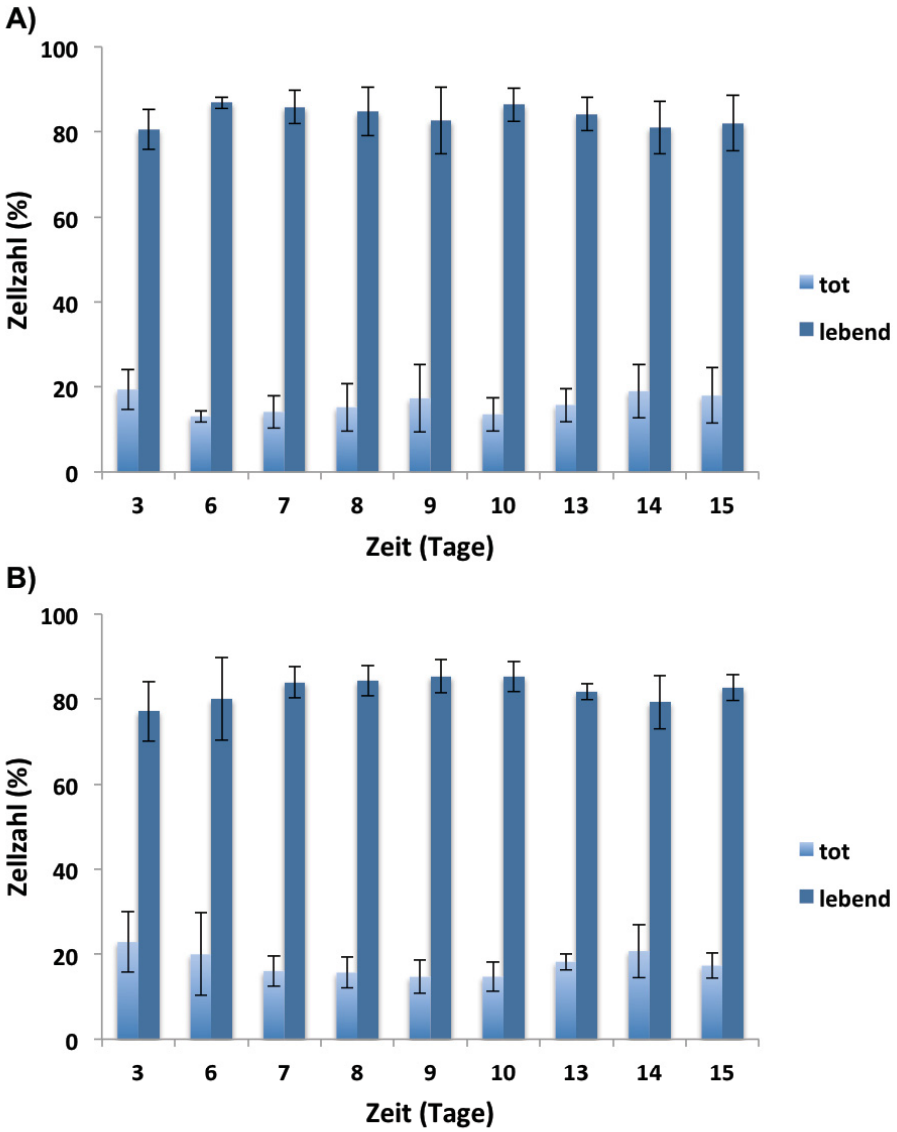


Abbildung 4.6: Beobachtung der Zellviabilität nach adenoviraler Infektion über 15 Tage. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. **A)** Ad5EGFP-infizierte Zellen. **B)** Unbehandelte Kontrollzellen.

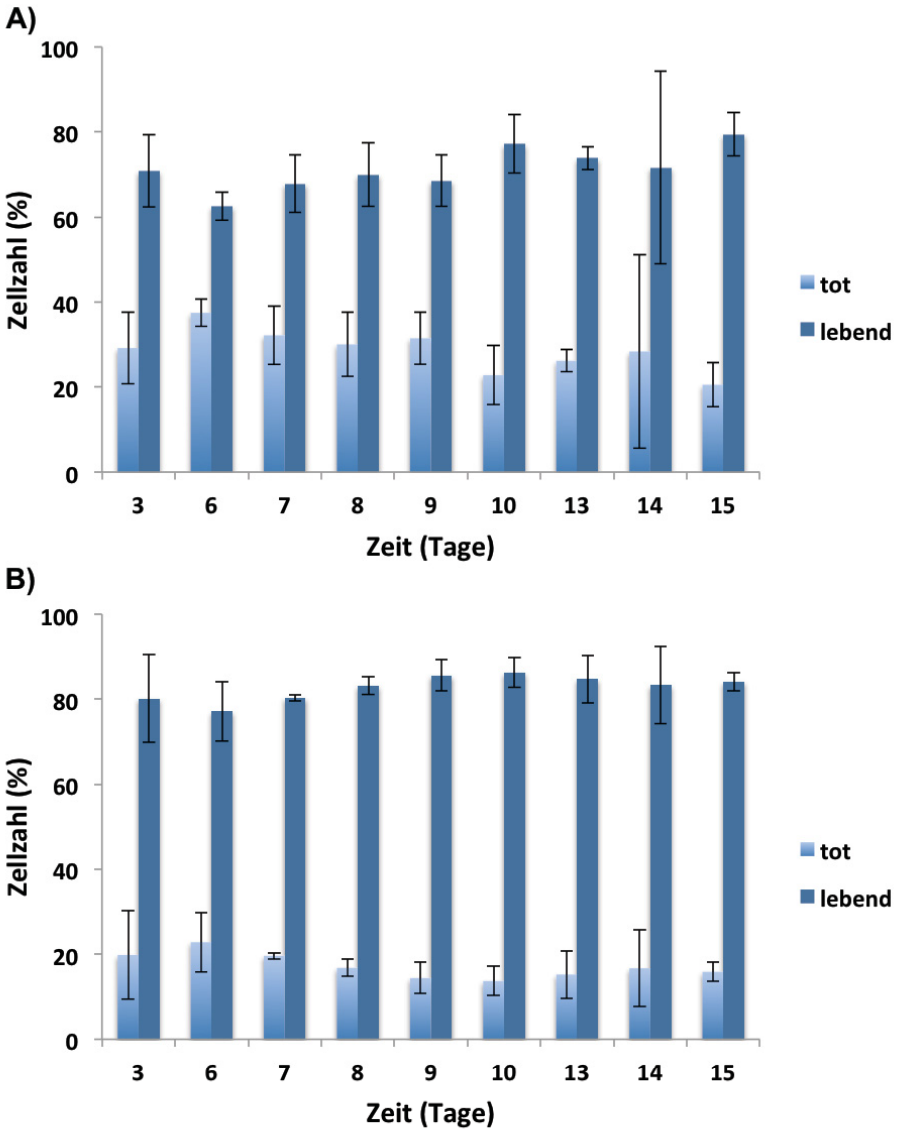


Abbildung 4.7: Beobachtung der Zellviabilität nach adenoviraler Infektion über 15 Tage. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. **A)** Ad5/3GFP-infizierte Zellen. **B)** Unbehandelte Kontrollzellen.

4.5 Effizienz der adenoviralen Infektion

Die am besten etablierte Methode zur Identifizierung von CTCs ist die Mikroskopie (Hoeppener et al., 2012). Daher war es wichtig zu überprüfen, ob mit den verwendeten Viruskonzentrationen eine ausreichend hohe Expression von GFP/EGFP in den Zielzellen erreicht werden kann, um diese mittels Fluoreszenzmikroskopie zu identifizieren. Um herauszufinden, wie effizient die GFP/EGFP-Expression nach Infektion mit beiden verwendeten viralen Vektoren (Ad5EGFP und Ad5/3GFP) war und ob hier Unterschiede zwischen beiden viralen Vektoren bestanden, wurden Tumorzelllinien mit steigenden

Viruskonzentrationen infiziert und anschließend die GFP/EGFP-Expression mikroskopisch bewertet. In Abbildung 4.8 sind die infizierten Zelllinien bei einer eingesetzten Viruskonzentration von 1 x 10^5 VP/Z gezeigt. Es konnten alle getesteten Zelllinien mit beiden viralen Vektoren infiziert werden. Im Gesamtüberblick offenbarte sich zunächst, dass die Infektion mit Ad5/3 effizienter war als mit Ad5, was sich in einer unterschiedlich starken GFP/EGFP-Expression widerspiegelte. Darüber hinaus wurde hier deutlich, dass die Zelllinien unterschiedlich effizient mit den viralen Vektoren infiziert wurden. Die Zelllinien MDA-MB-231, SK-OV-3.ip und KYSE-30 wurden insbesondere mit Ad5/3 sehr effizient infiziert, wohingegen COLO205, DU-145 und PC-3 mit diesem viralen Vektor weniger effizient infiziert wurden. Die geringste Infektionseffizienz zeigte sich für beide Vektoren bei der Zelllinie COLO205.

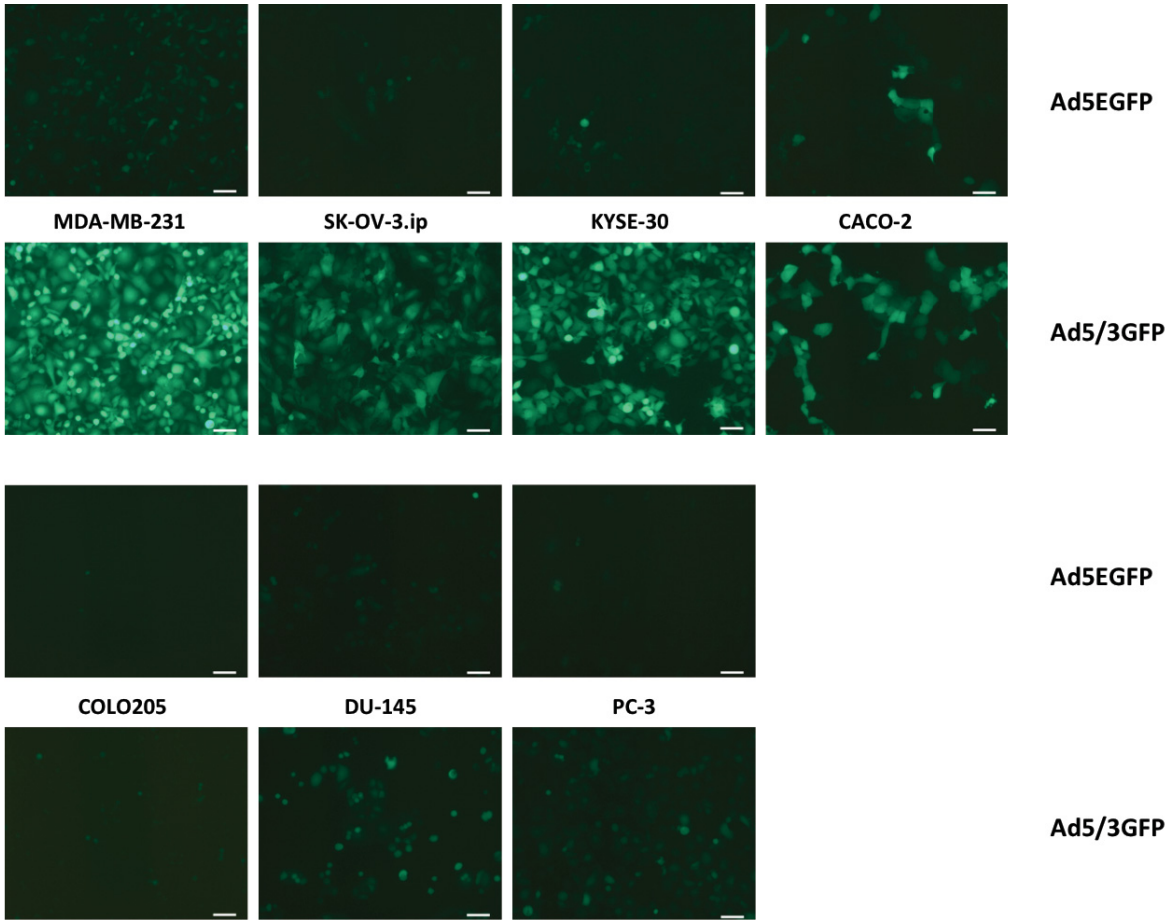


Abbildung 4.8: Vergleich der Effizienz der Infektion mit Ad5EGFP und Ad5/3GFP in verschiedenen Zelllinien. Dargestellt sind die verschiedenen Zelllinien zwei Tage nach der Infektion mit Ad5EGFP bzw. Ad5/3GFP. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 20 µm.

In Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10 ist der Anstieg der GFP/EGFP-Expression in Abhängigkeit von der Viruskonzentration dargestellt. Exemplarisch ist die Zelllinie KYSE-30 an Tag 1 (Abbildung 4.9) und Tag 2 (Abbildung 4.10) nach der Infektion mit Ad5EGFP bzw.

Ad5/3GFP dargestellt. Einen Tag nach Infektion mit Ad5 ist die EGFP-Expression bei allen eingesetzten Viruskonzentrationen kaum zu erkennen. In einigen Zellen, die mit Ad5/3 infiziert wurden, konnte die GFP-Expression hingegen schon bei 1×10^4 VP/Z identifiziert werden (Abbildung 4.9).

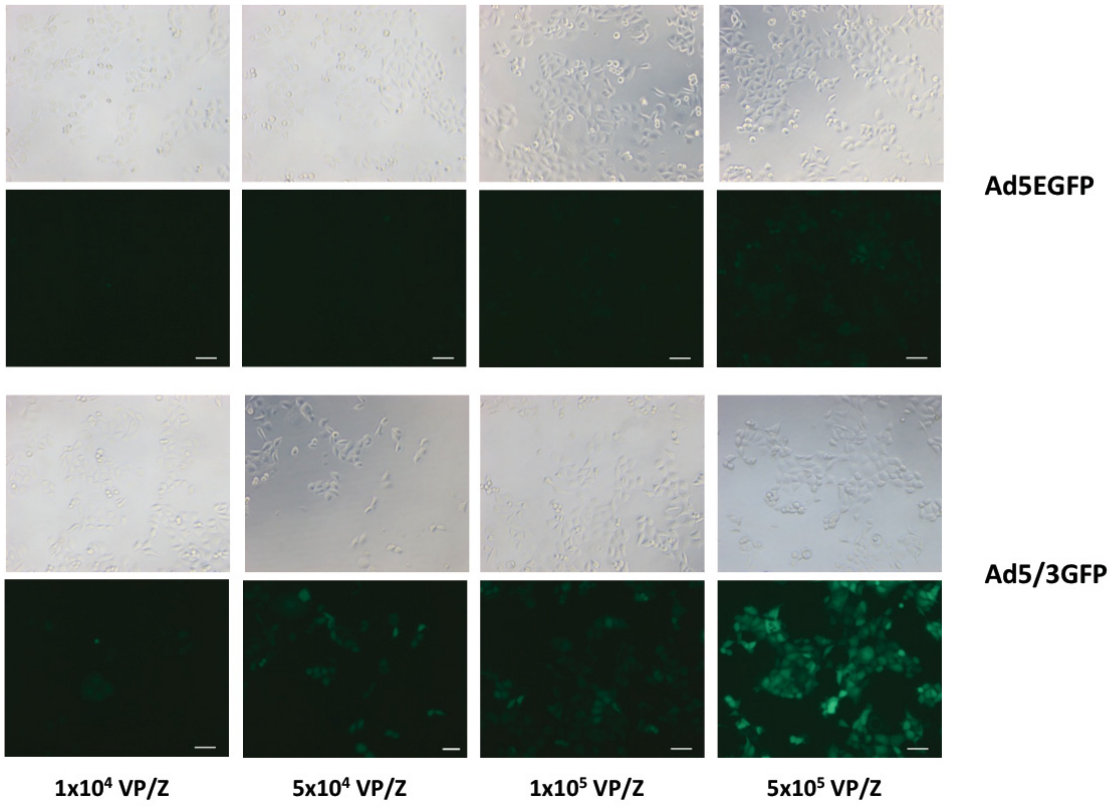


Abbildung 4.9: Überprüfung der Effizienz der Virusinfektion. Dargestellt ist exemplarisch die Zelllinie KYSE-30 einen Tag nach Infektion mit Ad5EGFP und Ad5/3GFP. Es wurden Viruskonzentrationen von 1×10^4-5×10^5 VP/Z eingesetzt. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 20 µm.

An Tag 2 nach der Infektion mit Ad5EGFP war nur bei der höchsten Viruskonzentration die EGFP-Expression in den Zielzellen mikroskopisch gut zu erkennen, wohingegen dies bei Ad5/3GFP bereits ab einer Konzentration von 1×10^4 VP/Z möglich war (Abbildung 4.10).

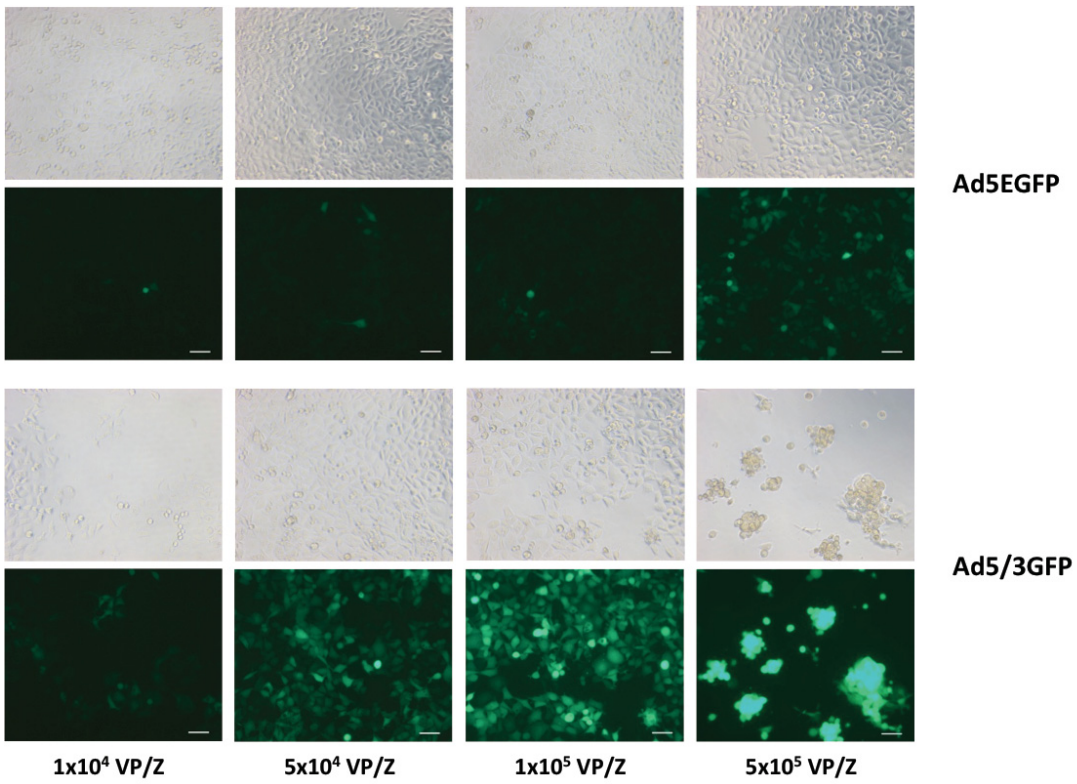


Abbildung 4.10: Überprüfung der Effizienz der Virusinfektion. Dargestellt ist exemplarisch die Zelllinie KYSE-30 zwei Tage nach Infektion mit Ad5EGFP und Ad5/3GFP. Es wurden Viruskonzentrationen von 1 x 10^4-5 x 10^5 VP/Z eingesetzt. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 20 µm.

Da Ad5/3 zum einen viele unterschiedliche Tumorzelllinien infizieren konnte und zum anderen bei gleicher Viruskonzentration eine effizientere Infektion aufwies, die zu einer besseren mikroskopischen Auswertbarkeit dieser Zellen im Vergleich zu Ad5-infizierten Zellen führte, wurde für weitere Versuche ausschließlich das Ad5/3-Virus verwendet.

4.6 Spezifität des adenoviralen Detektionssystems Ad5/3

Aufgrund der äußerst geringen CTC-Konzentrationen im Blut sollte durch den Einsatz hoher Viruskonzentrationen die Infektion jeder in einer Patientenprobe befindlichen CTC gewährleistet sein. In der vorliegen Arbeit wurde bereits der Einfluss hoher Viruskonzentrationen auf die Viabilität der Zellen untersucht. Zusätzlich musste nun überprüft werden, ob die Infektion von Patientenproben auch bei hohen Viruskonzentrationen epithelspezifisch bleibt und keine hämatopoetischen Zellen infiziert werden. Eine Infektion von Blutzellen würde zur Detektion falsch-positiver Zellen führen und somit die Aussagekraft des adenoviralen Detektionssystems in Frage stellen. Neben einer mikroskopischen Bewertung der Spezifität bot sich darüber hinaus die Verwendung des

sensitiven Luziferase-Assays an. Um die Spezifität im Luziferase-Assay überprüfen zu können, wurde der adenovirale Vektor Ad5/3 mit dem Luziferase-Gen *Luc* (Ad5/3CMVLuc) verwendet. Eine definierte Zellzahl der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 wurde mit PBMCs gesunder Spender gemischt. Zunächst wurden 1×10^4 Zellen der Zelllinie MDA-MB-231 mit steigenden Viruskonzentrationen von 1×10^3-5×10^5 VP/Z infiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 h nach Infektion mittels Plattenluminometer gemessen. Hierbei zeigte sich ein starker Anstieg der Luziferaseaktivität bei höheren Viruskonzentrationen (Abbildung 4.11A). Bei der Infektion von ebenfalls 1×10^4 PBMCs gesunder Spender wurde selbst bei hohen Viruskonzentrationen keine Aktivität der Luziferase gemessen (Abbildung 4.11B). Dies zeigte deutlich, dass keine Infektion der Blutzellen stattgefunden hat. In einem nächsten Schritt wurden PBMCs und MDA-MB-231-Zellen im gleichen Verhältnis ausplattiert. Diese gemischte Tumorzellpopulation wurde ebenfalls mit steigenden Viruskonzentrationen von 1×10^3-5×10^5 VP/Z infiziert. Anhand der gemessenen Luziferaseaktivität konnte mittels Mann-Whitney-Test keine signifikante Veränderung ($p = 0.6753$) in der Effizienz der Infektion gegenüber der Infektion der MDA-MB-231-Zellen ohne PBMCs (Abbildung 4.11A) beobachtet werden (Abbildung 4.11C).

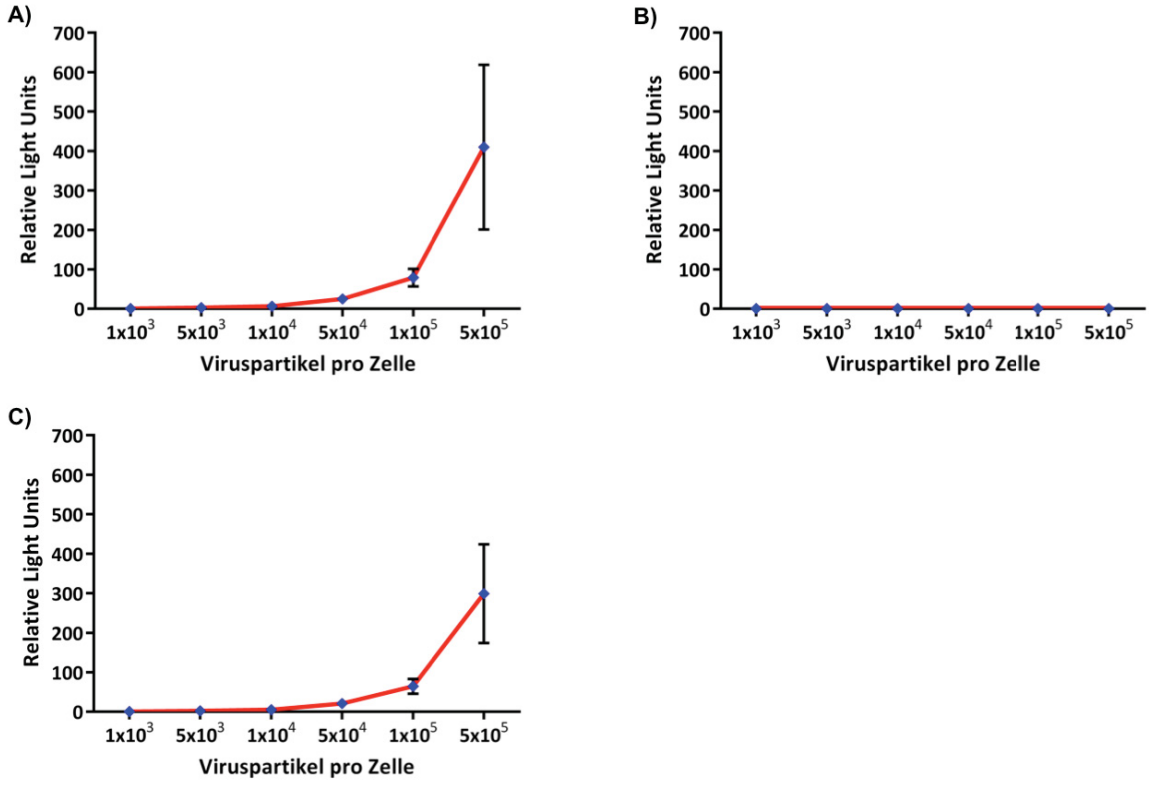


Abbildung 4.11: Überprüfung der Spezifität der adenoviralen Infektion mittels Luziferase-Assay. Für die Infektion wurde das Ad5/3-Virus mit einer Luziferase-Kassette (Ad5/3CMVLuc) verwendet. **A)** Die Infektion der

Zelllinie MDA-MB-231. **B)** Infektion von PBMCs. **C)** Infektion von PBMCs und MDA-MB-231-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der *Relative Light Units*, die aus der Lichtemission der Luziferase-Reaktion von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen berechnet wurden.

4.7 Sensitivität des adenoviralen Detektionssystems Ad5/3GFP

Nachdem die vorangegangenen Experimente bewiesen haben, dass das hier etablierte virale Detektionssystem hämatopoetische Zellen des peripheren Bluts nicht infiziert, war es in einem nächsten Schritt wichtig die Sensitivität der Methode analysieren zu können. Um die Sensitivität des Assays zu bestimmen, wurden definierte Zellzahlen (1, 10, 50, 100, 1000 Zellen) der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 mithilfe des Zellsortierers MoFlo™ der Fa. Beckman Coulter in 1 x 10^5 PBMCs gesunder Spender eingebracht. Die Zellen wurden mit Ad5/3GFP in einer Konzentration von 1 x 10^7 VP/Well infiziert. In Abbildung 4.12 sind exemplarisch einzelne Wells mit steigenden Zellzahlen der MDA-MB-231-Zellen dargestellt. Es konnte gut zwischen den GFP-positiven Tumorzellen und den GFP-negativen PBMCs differenziert werden.

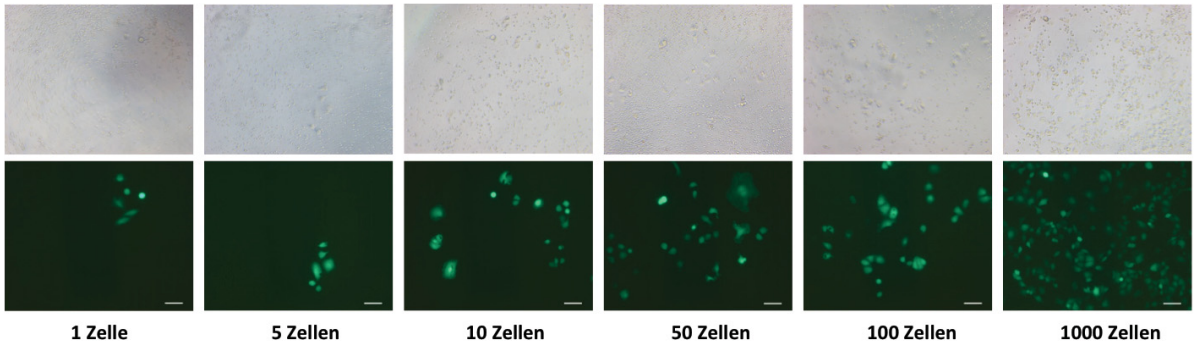


Abbildung 4.12: Überprüfung der Spezifität und Sensitivität der adenoviralen Infektion. MDA-MB-231 Zellen wurden mit steigender Anzahl in 1 x 10^5 PBMCs mithilfe eines Zellsortierers eingebracht. Zu sehen ist die GFP-Expression der MDA-MB-231-Zellen zwei Tage nach der Infektion mit Ad5/3GFP. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 20 µm.

Die GFP-positiven Zellen wurden an Tag 1-3 nach der Infektion am Mikroskop gezählt. An Tag 1 nach der Infektion war die GFP-Expression noch zu schwach, um eindeutig GFP-positive Zellen identifizieren zu können (Abbildung 4.13A). Jedoch war dies bereits am zweiten Tag nach der Infektion möglich, da stark GFP-exprimierende Zellen zu beobachten waren (Abbildung 4.13B). Bei diesem Experiment zeigte sich erneut, dass die Infektion keinen Einfluss auf die Viabilität der infizierten Zellen hatte. Denn aufgrund der starken Proliferation der MDA-MB-231-Zellen, die in die Proben eingebracht wurden, konnte die mit 1,000 MDA-MB-231-Zellen versetzte Probe mikroskopisch nicht mehr ausgezählt werden.

Daher wurden diese in der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Wie in Abbildung 4.13C zu sehen, kam es an Tag 3 nach der Infektion zu einer Abweichung zwischen beobachteter Zellzahl und der ursprünglich eingebrachten Anzahl MDA-MB-231-Zellen. Dies spiegelte sich auch im Wert des Bestimmtheitsmaßes wieder (r^2 = 0.9817). Das Bestimmtheitsmaß hilft bei der Beurteilung der Wiederfindungsrate der eingebrachten Tumorzellen. Wie in Abbildung 4.13B zu erkennen ist, lag das Bestimmtheitsmaß nach zwei Tagen bei r^2 = 0.9994 und war der beste ermittelte Wert in diesem Versuch.

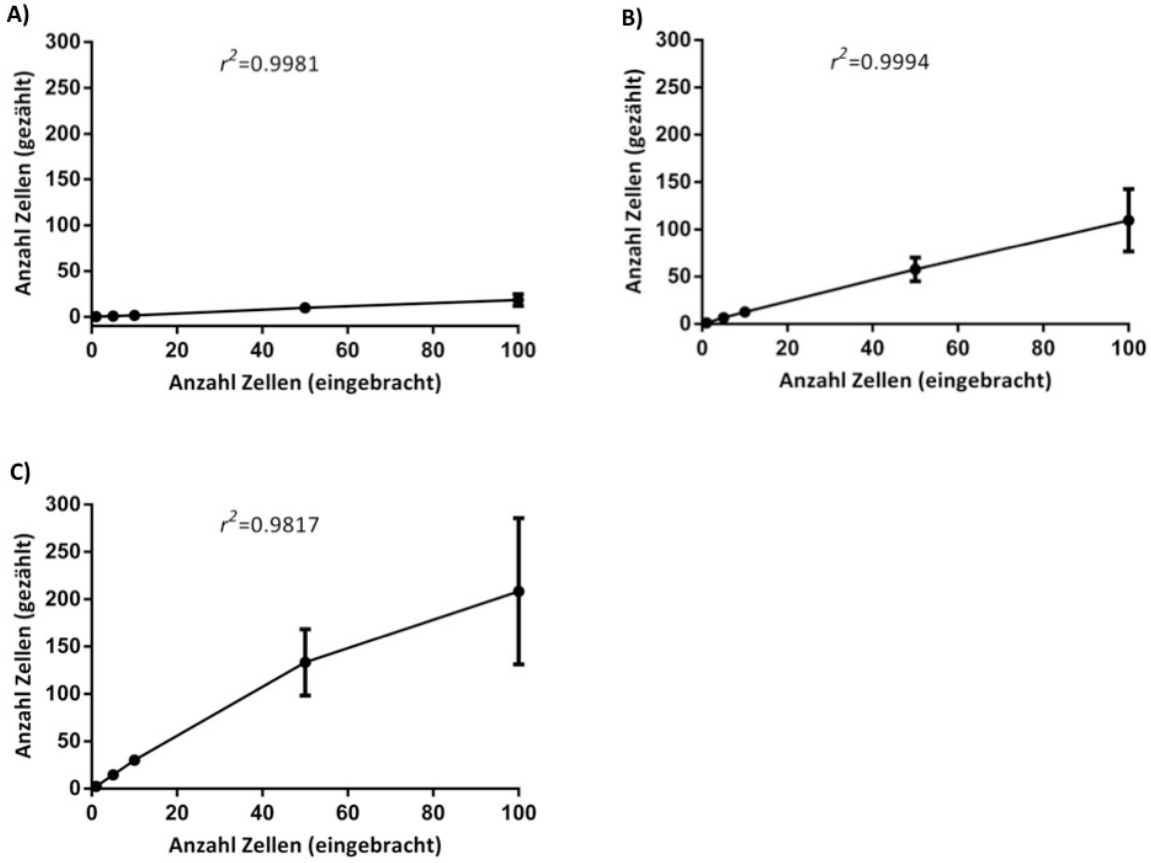


Abbildung 4.13: Zellzählung der eingebrachten MDA-MB-231-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl der eingebrachten Zellen und die Anzahl der am Mikroskop tatsächlich gezählten GFP-positiven Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen und das Bestimmtheitsmaß r^2. **A)** Zellzählung an Tag 1 nach der Infektion. **B)** Zellzählung an Tag 2 nach der Infektion. **C)** Zellzählung an Tag 3 nach der Infektion.

4.8 Anwendung des virusbasierten Detektionssystems an DLA-Patientenproben

In der Regel werden zur Detektion und Analyse der CTCs Vollblutproben von Tumorpatienten verwendet. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, mehr CTCs pro Probe zu detektieren, wurden DLA-Proben von Patienten verwendet (Fischer et al., 2013). Die Proben

stammten von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten. Insgesamt wurden 31 DLA-Proben mit dem hier etablierten adenoviralen CTC-Detektionssystem analysiert (Abbildung 4.14). Hierzu wurden 1 x 10^7 oder 2 x 10^7 WBCs aus einer DLA-Probe verwendet und mit Ad5/3GFP infiziert. In 19 dieser Proben wurden GFP-positive Zellen detektiert (Tabelle 4.1).

Die höchste Anzahl positiver Zellen wurde in Proben von Pankreaskarzinom-Patienten beobachtet. In Proben von Patienten mit nicht-epithelialen Tumoren wie Melanomen und Sarkomen und in Proben gesunder Kontrollspender konnten keine GFP-positiven Zellen nachgewiesen werden.

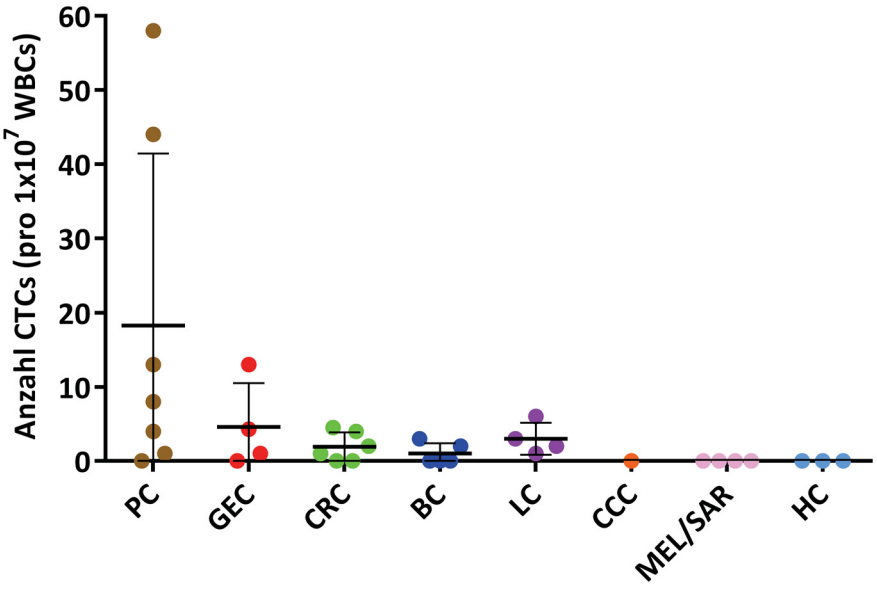


Abbildung 4.14: Anzahl der CTCs in adenoviral-infizierten Patientenproben verschiedener Tumorentitäten. In Patientenproben verschiedener Tumorentitäten und Proben gesunder Spender wurden CTCs nach Infektion mit Ad5/3GFP mit GFP markiert. Dargestellt ist die Anzahl GFP-positiver CTCs pro 1 x 10^7 WBCs. PC = *pancreatic cancer* (Pankreaskarzinome) GEC = *gastroesophageal cancer* (gastroösophageale Karzinome), CRC = *colorectal cancer* (kolorektale Karzinome), BC = *breast cancer* (Mammakarzinome), LC = *lung cancer* (Lungenkarzinome), CCC = *cholangiocellular carcinoma* (Cholangiozelluläres Karzinom), MEL/SAR = *melanoma* (Melanome)/ *sarcoma* (Sarkome), HC = *healthy controls* (gesunde Kontrollen).

Als Kontrollen wurden in gleicher Weise verarbeitete DLA-Proben gesunder Spender analysiert. Hierbei zeigte eine der Kontrollproben GFP-positive Zellen. Auffällig war hierbei, dass fast alle Zellen dieser Probe GFP-positiv waren. Da alle bislang untersuchten PBMC-Proben (*n* = 20) gesunder Spender keine Zellen mit GFP-Expression aufwiesen und die Ursache für die Positivität fast der gesamten Kontrollprobe nicht geklärt werden konnte, wurde diese aus den weiteren Betrachtungen herausgelassen. Dennoch hat dieser Versuch die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse verdeutlicht. Als Konsequenz wurde eine

Immunfärbung mit einem CD45-Antikörper in den Experimentalaufbau eingeführt, um sicherer zwischen Blutzellen und CTCs differenzieren zu können. In Abbildung 4.15 ist eine mit Ad5/3GFP infizierte Patientenprobe dargestellt, die mit einem CD45-Antikörper gegengefärbt wurde. Im Durchlicht ist die GFP-positive CTC unter GFP-negativen WBCs zu erkennen (Abbildung 4.15A). Abbildung 4.15B zeigt die GFP-positive CTC im Fluoreszenzlicht. Aufgrund der CD45-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die GFP-positive Zelle im Gegensatz zu den umliegenden WBCs keine CD45-Expression aufwies (Abbildung 4.15C).

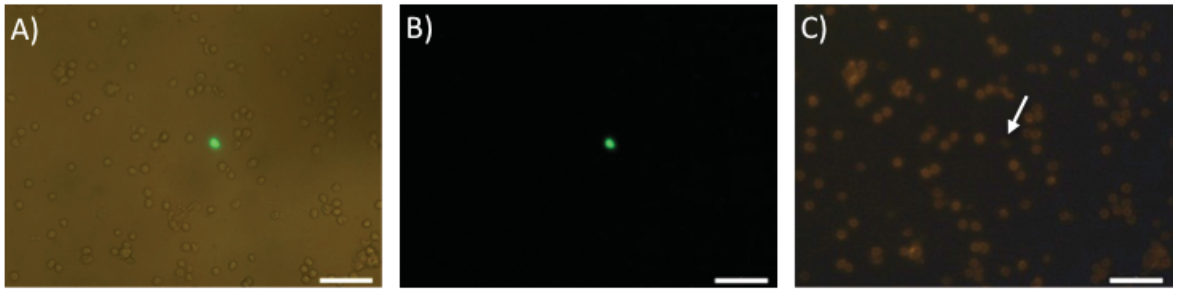


Abbildung 4.15: CD45 Alexa Fluor® 555-Färbung einer mit Ad5/3GFP-infizierten Patientenprobe. A) Durchlicht. **B)** Fluoreszenzlicht. **C)** CD45-positive WBCs. Der Pfeil markiert die CD45-negative GFP-positive CTC. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 50 µM.

4.9 Vergleich der Detektionsraten des adenoviralen Systems mit CellSearch®

Um einen direkten Vergleich der Detektionsrate zwischen dem adenoviralen Detektionssystem und dem CellSearch®-System anzustellen, wurden Patientenproben parallel mit beiden Methoden analysiert. Zum einen wurden 7.5 ml Blut, welches vor der DLA abgenommen wurde, und zum anderen 2×10^8 WBCs aus der DLA-Probe im CellSearch®-System untersucht.

In Tabelle 4.1 sind die mit dem adenoviralen Detektionssystem analysierten DLA-Proben (n = 31) den DLA-(n = 31) und Blutproben (n = 29) gegenübergestellt, die mittels CellSearch® analysiert wurden.

Tabelle 4.1: Aufstellung der analysierten Patientenproben.

	Apheresat (Virus)	Blut (CellSearch®)	Apheresat (CellSearch®)
Anzahl Proben gesamt	31	29	31
Anzahl positiver Proben	19	2	9
Anteil positiver Proben (%)	61	7	29

Von diesen analysierten DLA-Proben wiesen 19 im adenoviralen System (61 %) und neun im CellSearch® CTCs auf (29 %). Periphere Blutproben wurden nur von 29 dieser Patienten

untersucht, von denen lediglich zwei positiv (7 %) für CTCs waren. Das adenovirale Detektionssystem wies somit eine deutlich höhere Detektionsrate auf als das CellSearch®-System.

Die Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die analysierten Proben von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten. Dargestellt ist die Anzahl der CTCs pro Probe in dem jeweiligen Detektionssystem.

Tabelle 4.2: Überblick über die analysierten Patientenproben. Die Anzahl der CTCs pro Probe, die mit dem Virus Ad5/3GFP infiziert worden sind, wurden auf 1×10^7 WBCs eingestellt. Die Anzahl der CTCs im CellSearch®-System aus DLA-Proben wurde auf 2×10^8 WBCs eingestellt. n. a. = nicht analysiert.

Tumorentität	Anzahl CTCs pro 1×10^7 WBCs (Virus)	Anzahl CTCs in 7.5 ml Blut (CellSearch®)	Anzahl CTCs pro 2×10^8 WBCs (CellSearch®)
Pankreaskarzinome	44	0	0
	58	0	0
	13	0	0
	8	3	15
	4	0	0
	0	0	2
	1	0	2
Gastroösophageale Karzinome	0	n. a.	0
	13	0	0
	4.3	0	0
	1	0	0
Kolorektale Karzinome	2	0	0
	0	0	2
	4.5	0	0
	0	0	0
	4	0	0
	1	0	1
Mammakarzinome	3	0	2
	2	19	202
	0	0	0
	0	0	1
	0	0	0
Lungenkarzinome	2	0	0
	3	0	0
	1	0	0
	6	0	3
Cholangiozelluläres Karzinom	0	n. a.	0
Melanome Sarkome	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

In den Proben, die mittels adenoviraler Infektion untersucht wurden, konnten im Vergleich zu den CellSearch®-Analysen mehr Proben als positiv beschrieben werden (Tabelle 4.1, Tabelle 4.2). Am häufigsten konnten CTCs mittels adenoviraler Infektion in Proben von Patienten mit einem Pankreaskarzinom detektiert werden. In Proben von

Brustkrebspatientinnen wurden hingegen mehr Zellen mittels CellSearch® gefunden (DLA (Virus): Mittelwert = 1, *n* = 5; Blut (CellSearch®): Mittelwert = 3.8 *n* = 5; DLA (CellSearch®): Mittelwert = 41, *n* = 5). In Proben von Patienten mit nicht-epithelialen Tumoren wurden keine CTCs detektiert. Blutproben gesunder Spender wurden mittels CellSearch® nicht analysiert.

In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse der adenoviralen Analyse des Apheresats (Abbildung 4.16A) und die Analyse des Bluts mithilfe des CellSearch®-Systems (Abbildung 4.16B) aus Tabelle 4.2 grafisch gegenübergestellt. Hier wird erneut deutlich, dass mehr CTCs in DLA-Proben mittels adenoviraler Infektion gefunden wurden als in den korrespondieren Blutproben mittels CellSearch®. Lediglich in Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen konnten mehr CTCs detektiert werden als in den korrespondierenden DLA-Proben mittels adenoviraler Infektion. Es wird auch hier noch einmal deutlich, dass mithilfe des adenoviralen Detektionssystems die meisten Zellen in Proben von Pankreaskarzinom-Patienten gefunden wurden.

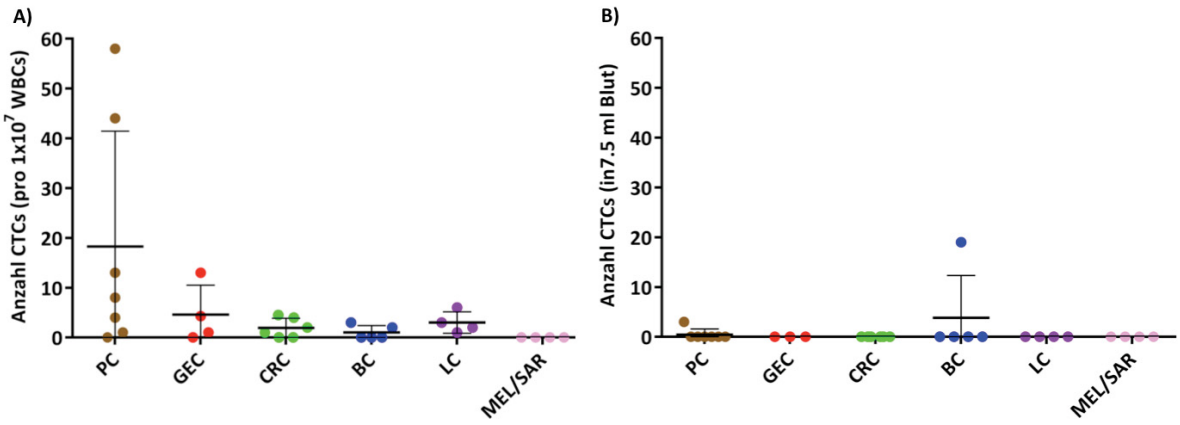


Abbildung 4.16: Anzahl CTCs in DLA- und Blutprobe. Diesen Abbildungen liegen die Daten aus Tabelle 4.2 zugrunde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der Anzahl der CTCs pro Probe. **A)** Anzahl der CTCs pro 1 x 10^7 WBCs in einer DLA-Probe, analysiert mit dem adenoviralem System. **B)** Anzahl CTCs in 7.5 ml Blut, analysiert mittels CellSearch®-System. PC = *pancreatic cancer* (Pankreaskarzinome) GEC = *gastroesophageal cancer* (gastroösophageale Karzinome), CRC = *colorectal cancer* (kolorektale Karzinome), BC = *breast cancer* (Mammakarzinome), LC = *lung cancer* (Lungenkarzinome), MEL/SAR = *melanoma* (Melanome)/ *sarcoma* (Sarkome).

Um die gewonnenen Daten beider Systeme noch besser miteinander vergleichen zu können, wurden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse des virusbasierten Systems auf die im CellSearch®-System analysierte Zellzahl des Apheresats von 2 x 10^8 WBCs extrapoliert dargestellt (Abbildung 4.17). Hierdurch ist noch deutlicher zu erkennen, dass die Detektionsrate des virusbasierten Systems größer war als mit dem CellSearch®-System.

Darüber hinaus wurde durch die Extrapolation der Daten der Unterschied in der Anzahl der CTCs in Proben von Mammakarzinom-Patientinnen verringert.

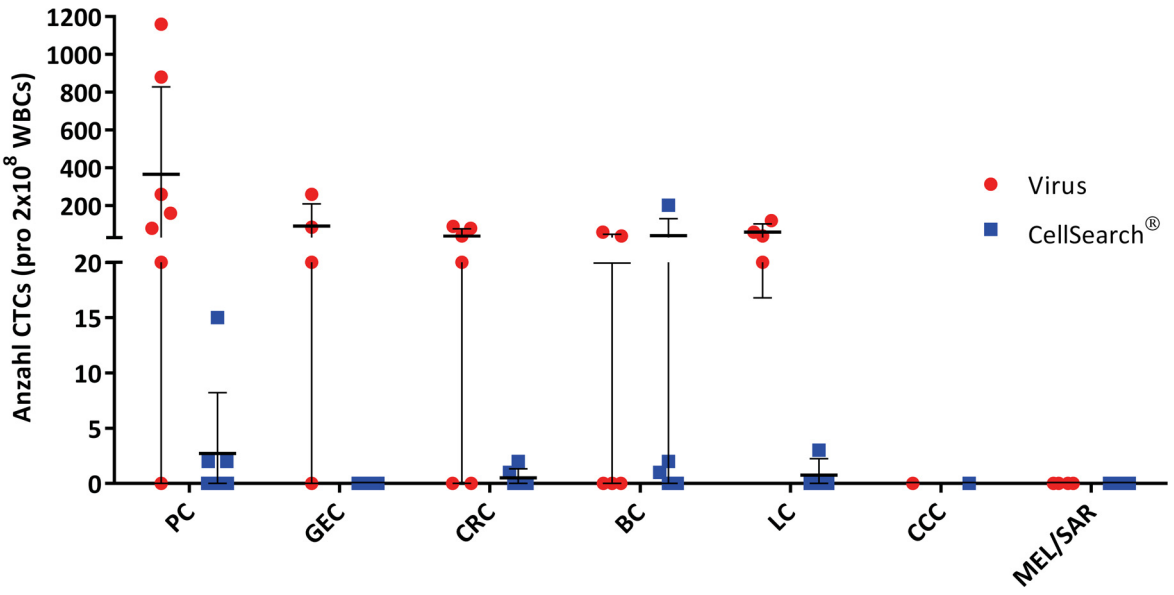


Abbildung 4.17: Grafischer Vergleich der Anzahl an CTCs im virusbasierten System und im CellSearch®-System in DLA-Patientenproben verschiedener Tumorentitäten. Die Anzahl der CTCs aus den Virusversuchen wurde auf 2×10^8 WBCs extrapoliert, was der Anzahl der analysierten Zellen im CellSearch®-System entspricht. PC = *pancreatic cancer* (Pankreaskarzinome) GEC = *gastroesophageal cancer* (gastroösophageale Karzinome), CRC = *colorectal cancer* (kolorektale Karzinome), BC = *breast cancer* (Mammakarzinome), LC = *lung cancer* (Lungenkarzinome), CCC = *cholangiocellular carcinoma* (Cholangiozelluläres Karzinom), MEL/SAR = *melanoma* (Melanome)/ *sarcoma* (Sarkome).

4.10 Anwendung des adenoviralen Detektionssystems an Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

In den vorangegangenen Analysen hat sich gezeigt, dass die Detektionsrate bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nach der CellSearch®-Analyse höher war als mit dem adenoviralen Detektionssystem. Um der Frage genauer nachzugehen, wie sich das adenovirale System gegenüber dem etablierten CellSearch®-System verhält, wurden ausschließlich Blutproben dieser Patientengruppe analysiert. Insgesamt wurden fünf Blutproben gleichzeitig mit dem virusbasierten Detektionssystem und dem CellSearch®-System untersucht. In Tabelle 4.3 ist die Anzahl der detektierten CTCs im CellSearch®-System pro 7.5 ml Blut und pro 1×10^7 PBMCs im virusbasierten System aufgeführt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Detektionszahlen des CellSearch®-Systems ebenfalls auf 1×10^7 PBMCs normalisiert. In einer Probe konnte das CellSearch®-System keine CTCs detektieren. Im Vergleich zum CellSearch®-System wiesen

alle Proben, die mithilfe des adenoviralen Detektionssystems analysiert wurden, CTCs auf. Beim Vergleich der normalisierten Werte der CellSearch®-Analyse mit den detektierten Zellzahlen im adenoviralen System, erscheint der Unterschied zwischen den Detektionsraten beider Systeme stark vermindert.

Tabelle 4.3: Überblick über die analysierten Proben der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom.

Patientenprobe	Anzahl CTCs in 7.5 ml Blut (CellSearch®)	Anzahl CTCs pro 1 x 10^7 PBMCs (CellSearch®)	Anzahl CTCs pro 1 x 10^7 PBMCs (Virus)
1	6	2.7	1
2	15	9	3
3	5	3	2
4	8	4.1	2
5	0	0	2

4.11 Überprüfung der Qualität des WGA-Produkts

Üblicherweise ist die Identifikation von CTCs allein auf die phänotypische Charakterisierung beschränkt. Um nun den malignen Charakter der mittels Ad5/3-Virus detektierten CTCs zu überprüfen, sollte das Genom einzelner, mit dem adenoviralen System detektierter, CTC bezüglich ihrer Kopienzahlveränderungen (CNAs) untersucht werden. Um an diese genetischen Informationen der isolierten CTCs zu gelangen, wurde die Einzelzell-aCGH angewendet. Diese Methode bietet die Möglichkeit, das gesamte Genom einzelner CTCs bezüglich ihrer CNAs zu analysieren. Um zu gewährleisten, dass nur WGA-Produkte von guter Qualität in den aCGH-Analysen verwendet werden, wurden direkt im Anschluss an die gesamtgenomische Amplifikation verschiedene Loci mit spezifischen Kontroll-PCRs nachgewiesen. Hierdurch sollte die erfolgreiche Amplifikation des WGA-Produkts überprüft und die gesamtgenomische Repräsentation der amplifizierten Einzelzell-DNA sichergestellt werden. In einer ersten Kontroll-PCR wurden *TP53* und *CK19* amplifiziert (Abbildung 4.18A). Nicht alle untersuchten WGA-Produkte wiesen die Amplifikate für beide Gen-Loci auf. Zellen in denen lediglich eins oder sogar keins der beiden Amplifikate nachgewiesen werden konnte, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

In einer nächsten Kontroll-PCR derselben Proben (Multiplex-PCR) wurden sechs weitere Gene-Loci (*LAMC1, CADPS, GRIK5, NEK9, PICK1, DNAH9*) amplifiziert (Abbildung 4.18B). Dabei sollte bei erfolgreich amplifizierten Einzelzellen das Amplikon von *CADPS* im WGA-Produkt nicht nachweisbar sein, da dieses eine *Mse*I-Schnittstelle aufweist. Als Positivkontrolle wurde in diesem Experiment ein Pool aus genomischer, unfragmentierter

DNA eingesetzt, wodurch es zur Detektion des Amplikons für *CADPS* in dieser Kontrolle kam. Die hier analysierten WGA-Proben spiegelten ein sehr heterogenes Bild bezüglich der gesamtgenomischen Repräsentation wider. Die Anzahl der amplifizierten Gen-Loci lag hier zwischen eins und fünf. Auffällig war, dass in Spur 1 die Amplifikation von *CADPS* nachgewiesen wurde. Dies deutet auf einen unzureichenden *Mse*I-Verdau hin. Da eine erfolgreiche aCGH-Analyse mit Nachweis von mindestens drei Amplikons in der Multiplex-PCR assoziiert ist (Möhlendick et al., 2013), wurden nur Proben, die dieses Kriterium erfüllten, in die weiteren Versuche eingeschlossen.

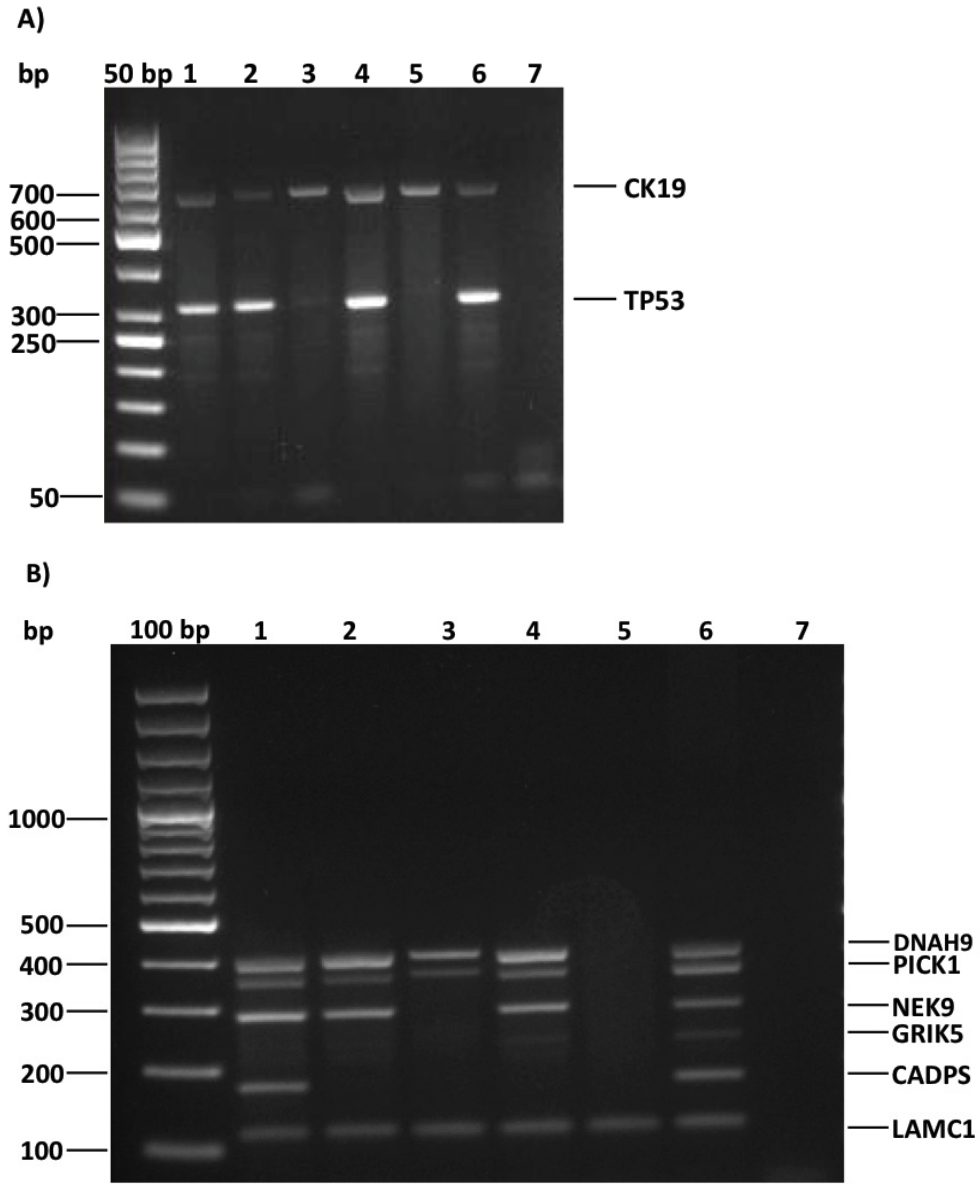


Abbildung 4.18: Qualitätsanalyse der WGA-Produkte mittels Kontroll- und Multiplex-PCR. In den Spuren 1-5 sind jeweils die gleichen Patientenproben aufgetragen. In Spur 6 ist die Positiv(gDNA, unamplifiziert)- und in Spur 7 die Negativkontrolle (H_2O) aufgetragen. **A)** Kontroll-PCR. **B)** Multiplex-PCR.

4.12 Genomische Analyse GFP-positiver Einzelzellen aus DLA- und Blutproben mittels aCGH

Im Anschluss an die WGA der Einzelzell-DNA und den Qualitätskontrollen der WGA-Produkte wurden an fünf isolierten CTCs aus DLA-Proben aCGH-Analysen durchgeführt. Alle WGA-Produkte dieser CTCs erfüllten die Ansprüche der vorher durchgeführten PCR-basierten Qualitätskontrollen. Wie in Abbildung 4.19 dargestellt, wiesen jedoch vier dieser Proben, die von unterschiedlichen Tumorentitäten abstammten, ein sehr ähnliches aCGH-Profil auf.

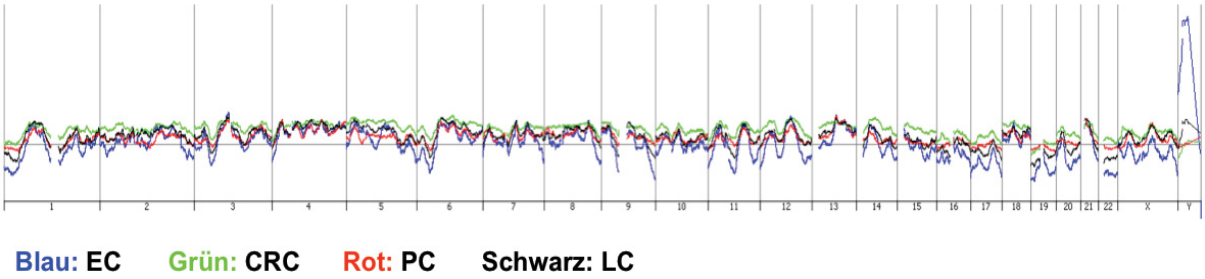


Abbildung 4.19: Grafischer Vergleich der genomweiten aCGH-Profile von vier CTCs aus DLA-Proben. EC = *esophageal cancer* (Ösophaguskarzinom), CRC = *colorectal cancer* (kolorektales Karzinom), PC = *pancreatic cancer* (Pankreaskarzinom), LC = *lung cancer* (Lungenkarzinom). Die Abbildung wurde mithilfe des Programms *Genomic Workbench* erstellt.

Da nicht davon auszugehen war, dass hierbei echte Aberrationen abgebildet wurden, konnten diese aCGH-Profile nicht weiter berücksichtigt werden. Somit lieferte lediglich eine CTC einer Brustkrebspatientin ein auswertbares aCGH-Ergebnis. Bei dieser Probe zeigten sich zahlreiche chromosomale Verluste (grün) und Zugewinne (rot) (Abbildung 4.20).

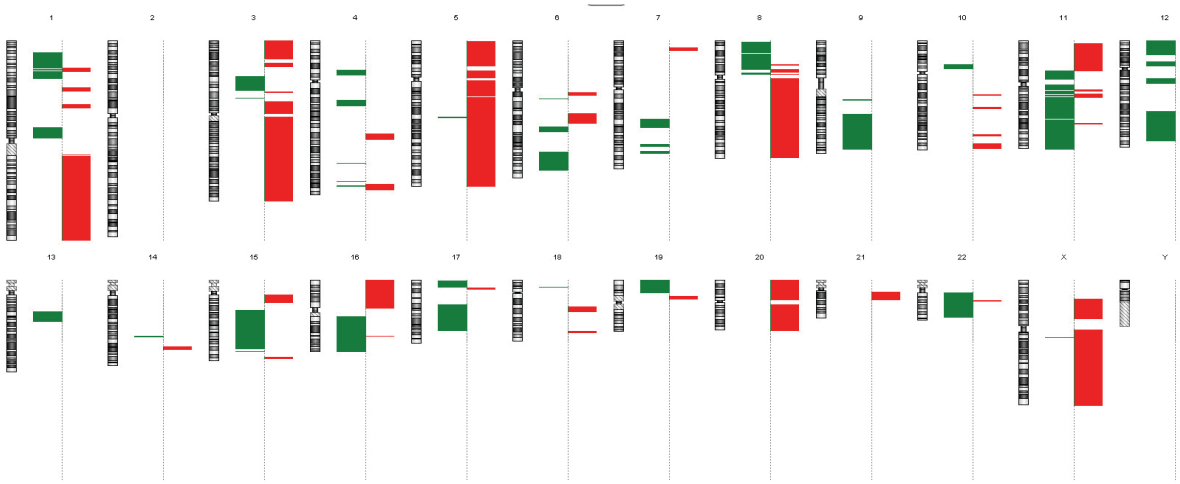


Abbildung 4.20: Übersicht über die chromosomalen Zugewinne und Verluste der CTC einer Brustkrebspatienten. Dargestellt sind die chromosomalen Zugewinne (rot) und Verluste (grün) des Einzelzellgenoms der CTCs. Die Grafik wurde mithilfe des Programms *Genomic Workbench* erstellt.

Um zu überprüfen, ob diese aufgedeckten Aberrationen typisch für das Mammakarzinom sind, wurde ein Abgleich mit anderen aCGH-Daten durchgeführt. In Abbildung 4.21 ist ein direkter grafischer Vergleich der chromosomalen Veränderungen der isolierten CTC (blaue Linie) mit den aCGH-Daten von 106 Mammakarzinomen dargestellt (Andre et al., 2009). Die chromosomalen Zugewinne und Verluste der isolierten CTC sind sehr gut vergleichbar mit den Aberrationen, die häufig beim metastasierten Mammakarzinom beobachtet werden (Abbildung 4.21).

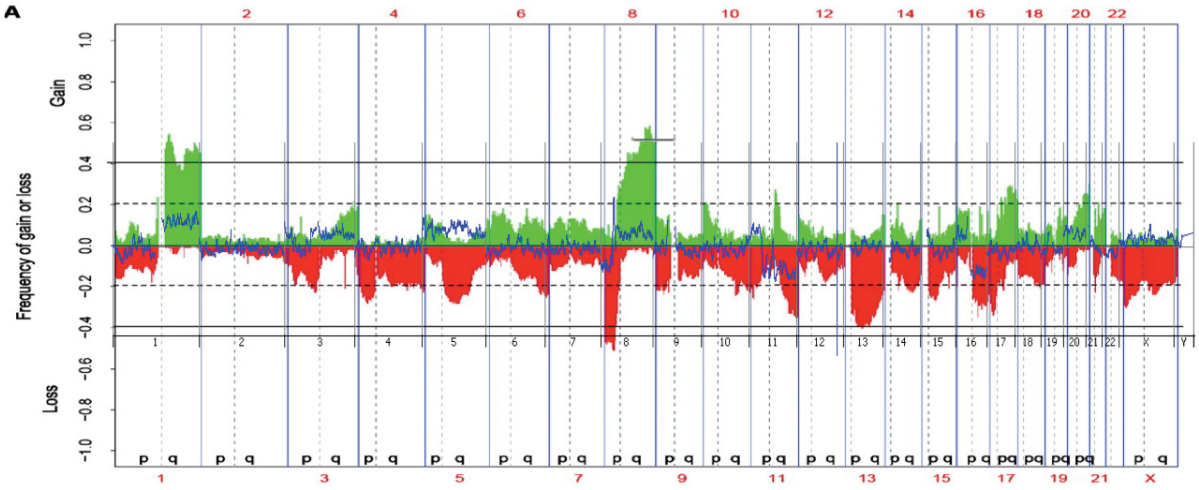


Abbildung 4.21: Grafischer Vergleich der Frequenz der chromosomalen Zugewinne und Verluste der CTC einer Brustkrebspatientin mit publizierten Daten. Die Grundlage für den Vergleich lieferten die aCGH-Daten von 106 Brustkrebspatientinnen (Andre et al., 2009). Die blaue Linie zeigen die Gewinne und Verluste der CTC an, die sich mit den Zugewinnen (grün) und Verlusten (rot) der Vergleichsdaten gut decken.

In Abbildung 4.22 sind exemplarisch die aCGH-Profile der Chromosomen 8, 10, 11, 13 und 17 dargestellt. Sie zeigen chromosomale Zugewinne (rot) und chromosomale Verluste (grün). Das Gen *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1,* Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor 1) (8p11.23) wies gleichermaßen wie *MYC* (8q24.21) eine Amplifikation auf (Abbildung 4.22A). Für die Gene *PTEN* (10q23.3, Abbildung 4.22B) und *BRCA2* (13q12.3, Abbildung 4.22D) konnte ein chromosomaler Verlust beobachtet werden, wohingegen auf Chromosom 11 ein Zugewinn im Gen *CCND1* (11q13.3) vorlag (Abbildung 4.22C). Auf Chromosom 17 waren chromosomale Verluste in den Genen *TP53* (17p13.1) und *BRCA1* (17q21) zu erkennen (Abbildung 4.22E).

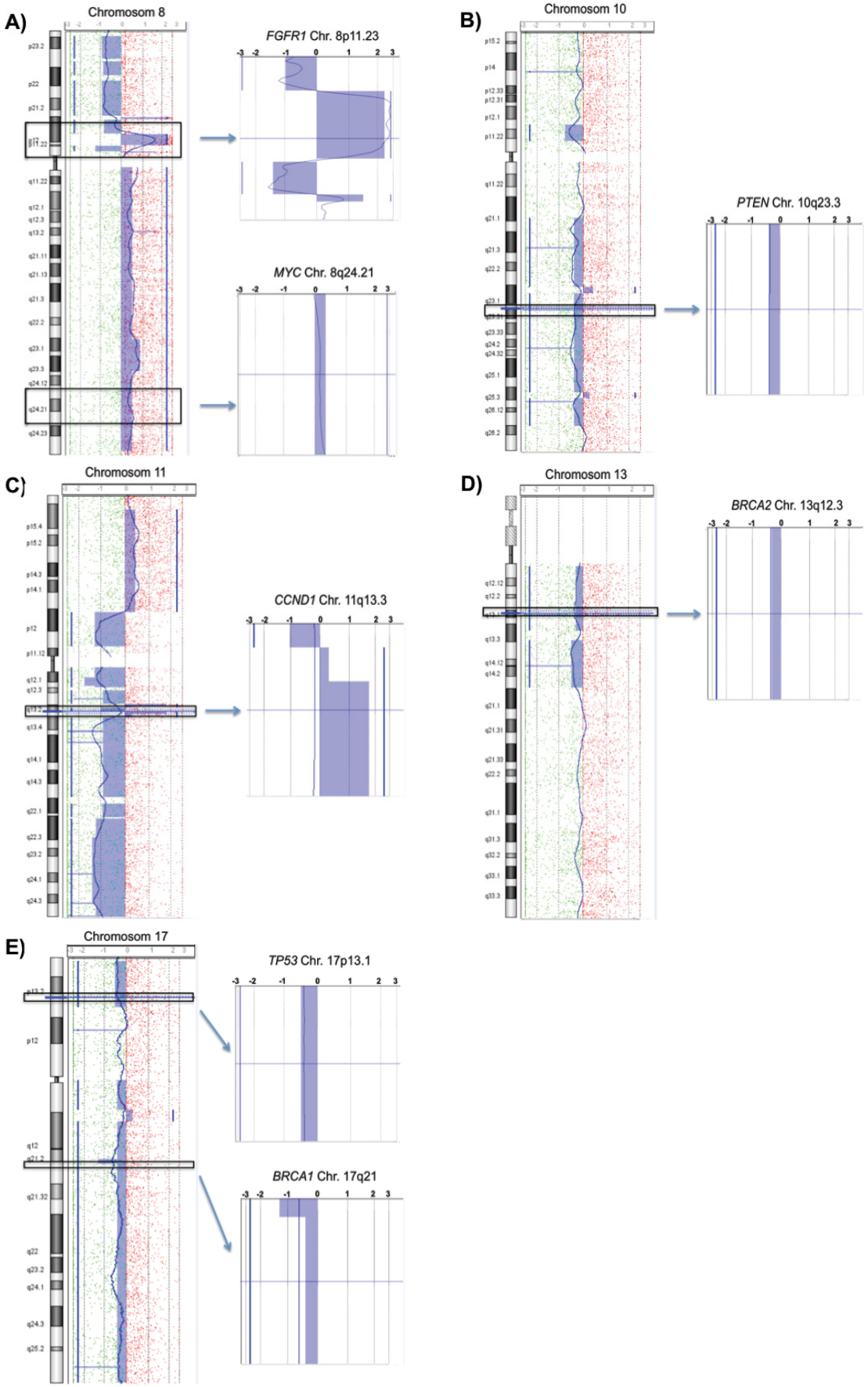


Abbildung 4.22: Detaillierte Ansicht der aCGH-Profile von Chromosom 8, 10, 11, 13 und 17 der CTC aus der DLA-Probe einer Mammakarzinom-Patientin. A) Chromosom 8 mit chromosomalen Zugewinnen in den Genen *FGFR1* (8p11.23) und *MYC* (8q24.21). **B)** Chromosomaler Verlust auf Chromosom 10 für *PTEN* (10q23.3). **C)**

Chromosom 11 mit chromosomalem Zugewinn im Gen *CCND1* (11q13.3). **D)** Chromosom 13 mit chromosomalem Verlust im Gen *BRCA2* (13q12.3). **E)** Chromosomale Verluste auf Chromosom 17 in den Genen *TP53* (17p13.1) und *BRCA1* (17q21). Die Abbildungen wurden mithilfe des Programms *Genomic Workbench* erstellt.

Die aus den Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom isolierten CTCs wurden ebenfalls mittels aCGH analysiert. In Abbildung 4.23 sind exemplarisch die aCGH-Profile von Chromosom 17 zweier CTCs einer Patientin dargestellt. Im Vergleich zu der CTC aus der DLA-Probe (Abbildung 4.22) wiesen die hier dargestellten Zellen auf Chromosom 17 nur wenige subtile chromosomale Veränderungen auf. Im Gen *TP53* konnte in der Tumorzelle 1 (T1) ein Verlust und in der Tumorzelle 2 (T2) ein Zugewinn festgestellt werden. *BRCA1* wies keine chromosomalen Veränderungen auf (Abbildung 4.23).

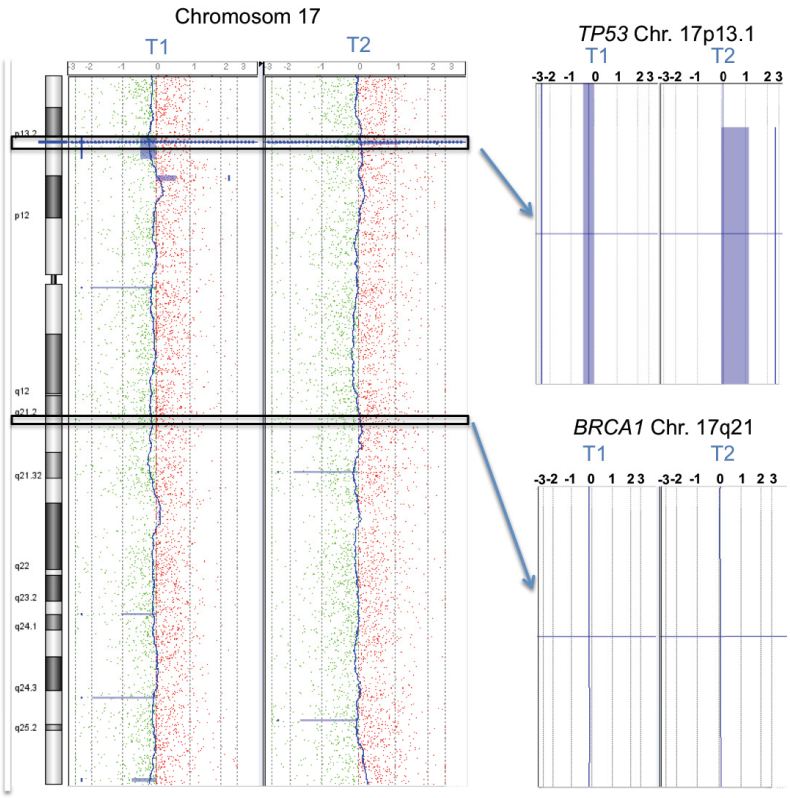


Abbildung 4.23: Detaillierte Ansicht der aCGH-Profile von zwei CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Dargestellt ist Chromosom 17 mit einem Verlust (T1) bzw. Zugewinn (T2) im Gen *TP53* (17p13.1) und ohne erkennbare chromosomale Veränderung im Gen *BRCA1* (17q21). T1 = Tumorzelle 1, T2 = Tumorzelle 2. Die Abbildungen wurden mithilfe des Programms *Genomic Workbench* erstellt.

In Abbildung 4.24 sind die genomweiten aCGH-Profile exemplarisch von zwei CTCs aus den Blutproben gezeigt. Im Vergleich dazu ist zusätzlich die CTC aus der DLA-Probe dargestellt, die in der aCGH-Analyse ein auswertbares Ergebnis lieferte. Es ist deutlich zu erkennen, dass

die CTCs aus den Blutproben über das gesamte Genom verteilt im Gegensatz zur CTC aus der DLA-Probe keine wesentlichen Veränderungen aufwiesen.

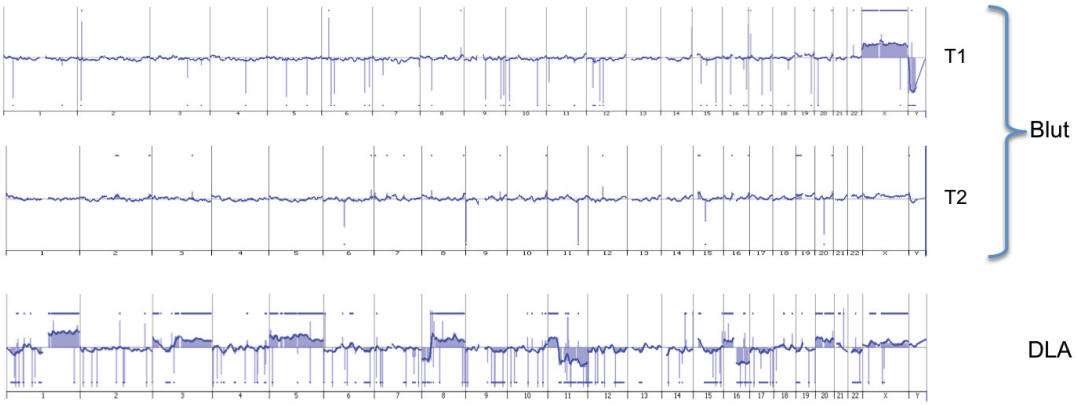


Abbildung 4.24: Genomweite aCGH-Profile von CTCs aus Blutproben und DLA-Probe. Ausschläge oberhalb der Mittellinie zeigen Zugewinne und Ausschläge unterhalb zeigen Verluste an. Die blau schraffierten Bereiche markieren die mittels Aberrationsalgorithmus detektierten Veränderungen. Die Abbildung wurde mithilfe des Programms *Genomic Workbench* erstellt.

Um die aCGH-Experimente besser zu kontrollieren, wurde bei Probe T1 eine Hybridisierung mit einer männlichen Referenz-DNA durchgeführt (Geschlechtsfehlpaarung, *sex mismatch*). Wie in Abbildung 4.24 gut zu erkennen ist, wies die Test-DNA (T1) korrekterweise einen Zugewinn für das X-Chromosom und einen Verlust für das (nicht vorhandene) Y-Chromosom auf. Somit ist davon auszugehen, dass das aCGH-Experiment erfolgreich war und es sich um ein balanciertes Genom ohne wesentliche chromosomale Veränderungen handelte.

In Tabelle 4.4 ist eine Auswahl von Genen aufgelistet, die in der CTC aus der DLA-Probe und exemplarisch in zwei CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom entweder eine Amplifikation (rot), eine Deletion (grün) oder keine chromosomalen Veränderungen (gelb) zeigten. Deutlich ist auch hier zu erkennen, dass die zwei Zellen aus der Blutprobe lediglich subtile Veränderungen u. a. im Gen *TP53* aufwiesen. Für die übrigen Gene konnten keine chromosomalen Veränderungen nachgewiesen werden. In der Zelle der DLA-Probe zeigten alle der hier aufgelisteten Gene chromosomale Veränderungen.

Tabelle 4.4: Auflistung einiger Gene, die in der aCGH in der CTC aus der DLA-Probe und exemplarisch in zwei CTCs aus der Blutprobe einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom amplifiziert, deletiert bzw. unverändert waren. *CCND1* = Cyclin D1, *MYC* =C-Myc, *FGFR1* = Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor 1, *ERBB2* = Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (HER2/neu), *ESR1* = Östrogenrezeptor 1, *ESR2* = Östrogenrezeptor 2, *PGR* = Progesteronrezeptor, *TP53* = Tumorprotein p53, *EPCAM* = Epitheliales Zelladhäsionsmolekül, *BRCA1* = Breast Cancer 1, *BRCA2* = Breast Cancer 2, *PTEN* = phosphatase and tensin homolog, *CDH1* = E-Cadherin, rot = amplifiziert, grün = deletiert, gelb = unverändert.

	Status			
Gen	Apherese	Blut T1	Blut T2	Lokalisation
CCND1				11q13.3
MYC				8q24.21
FGFR1				8p11.23
ERBB2				17q12
ESR1				6q25.1
ESR2				14q23.2
PGR				11q22-q23
TP53				17p13.1
EPCAM				2p21
BRCA1				17q21
BRCA2				13q12.3
PTEN				10q23.3
CDH1				16q22.1

4.13 Gesamtgenomische Fragmentlängen-Analyse der WGA-Produkte

Da nicht alle Einzelzellen auswertbare aCGH-Ergebnisse lieferten, waren die Qualitätskontrollen der WGA-Produkte mittels PCR-Analyse für solche Zellen, die mit dem adenoviralen Detektionssystem isoliert wurden, offenbar unzureichend. Obwohl die aCGH-Überprüfung mittels Geschlechtsfehlpaarung funktioniert hat, konnten letzte Zweifel an den Ergebnissen nicht ganz ausgeräumt werden. Es war anzunehmen, dass Störfaktoren für die gesamtgenomische PCR im experimentellen Versuchsaufbau vorlagen. Neben verschiedenen Möglichkeiten könnte sich vor allem die im Vergleich zu bisher verwendeten Detektions- und Isolationsverfahren (Binder et al., 2014; Möhlendick et al., 2013; Neves et al., 2014) stärker ausgeprägte Fixierung mit PFA ausgewirkt haben. So könnte es in Folge der Fixierung zur DNA-Degradierung kommen (Ross and Shipley, 1980) und in der MSE-PCR eingesetzte Enzyme könnten durch die verursachte Vernetzung der DNA mit Proteinen (Magana-Schwencke and Ekert, 1978; Ross and Shipley, 1980; Wilkins and Macleod, 1976)

keinen ausreichenden Zugang mehr zur DNA bekommen haben (Dietrich et al., 2013). Dies könnte zu einer unzureichenden Fragmentierung und Amplifikation des Einzelzell-Genoms geführt haben. Um dies zu überprüfen, wurden die Fragmentlängen des WGA-Produkts mithilfe des Bioanalyzers überprüft. Hierzu wurden die WGA-Produkte der CTC-Einzelzell-DNAs aus DLA-Proben und aus Blutproben der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom untersucht. Als Referenzproben wurden gesamtgenomisch amplifizierte Einzelzell-DNAs aus der Arbeitsgruppe Stoecklein verwendet, die nicht über das adenovirale System detektiert wurden und gute Ergebnisse in der aCGH erzielt haben.

In Abbildung 4.25 sind die Elektropherogramme der Analyse exemplarisch für einige Proben dargestellt. Hierbei zeigte sich schon deutlich, dass die *Mse*I-verdaute Einzelzell-DNA aus den DLA-Proben (Abbildung 4.25A + C) größere DNA-Fragmente und auch ein anderes Erscheinungsbild aufwiesen als die Referenzproben (Abbildung 4.25D). Die Fragmentlängen und Elektropherogramme der Einzelzell-DNA aus den Blutproben hingegen waren mit den Referenzproben vergleichbar (Abbildung 4.25B + D).

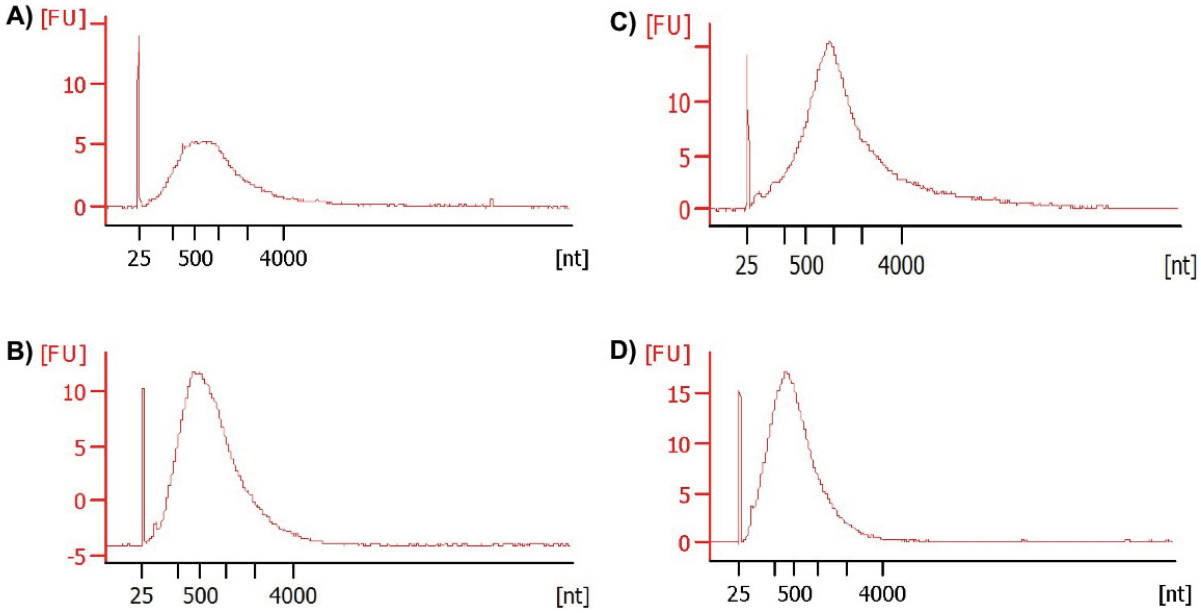


Abbildung 4.25: Elektropherogramme der Einzelzell-DNA nach Fragmentlängen-Analyse. A) CTC der Mammakarzinom-Patientin aus der DLA. **B)** CTC aus einer Blutprobe. **C)** CTC aus der DLA eines Pankreaskarzinom-Patienten. **D)** Referenzprobe.

In Tabelle 4.5 sind die durchschnittlichen Fragmentlängen der Einzelzell-DNA-Proben dargestellt. Im Durchschnitt wies die Einzelzell-DNA der DLA-Proben deutlich größere Fragmente (Mittelwert = 754 bp) auf als die Einzelzell-DNA der Blut (Mittelwert = 536 bp)- und Referenzproben (Mittelwert = 517 bp).

Tabelle 4.5: Auflistung der DNA-Fragmentlängen der Einzelzell-DNA nach Analyse mithilfe des Bioanalyzers.

CTCs aus DLA-Proben		CTCs aus Blut		Einzelzell-DNA Referenz-Proben	
	600 bp		500 bp		400 bp
	500 bp		450 bp		450 bp
	840 bp		460 bp		400 bp
	750 bp		630 bp		750 bp
	820 bp		640 bp		700 bp
	720 bp				400 bp
	670 bp				
	670 bp				
	685 bp				
	740 bp				
	900 bp				
	820 bp				
	830 bp				
	940 bp				
	880 bp				
	700 bp				
Mittelwert	754 bp	Mittelwert	536 bp	Mittelwert	517 bp

Wie in Abbildung 4.26 zu erkennen ist, waren die Unterschiede in den Fragmentlängen zwischen den DLA-Proben und den Blut- bzw. Referenzproben statistisch signifikant ($p = 0.0012$ bzw. $p = 0.0097$). Die Unterschiede in den Fragmentlängen der Blut- und Referenzproben wiesen hingegen keine statistische Signifikanz auf ($p = 0.4545$).

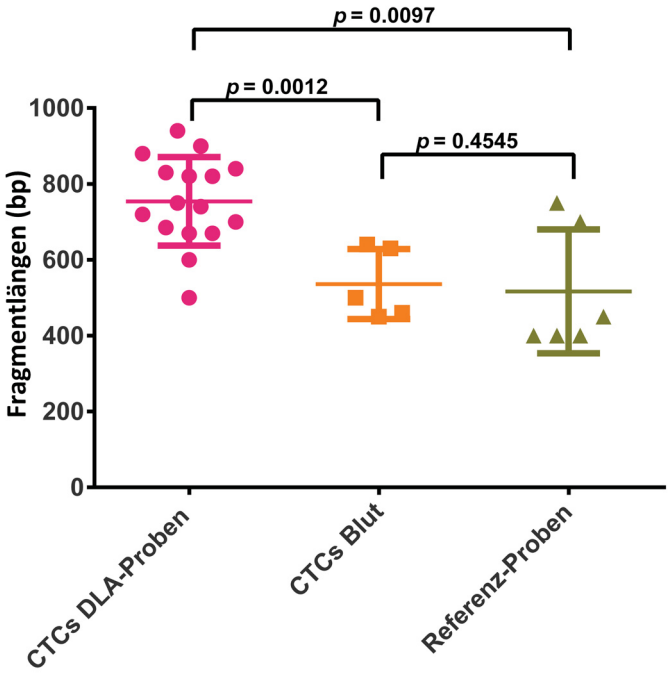


Abbildung 4.26: Gesamtgenomische Fragmentlängen-Analyse der Einzelzell-DNA.

5 DISKUSSION

Krebserkrankungen waren im Jahr 2008 die häufigste Todesursache weltweit und in Deutschland, nach den kardiovaskulären Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache (WHO, Statistisches Bundesamt). Dabei sterben die meisten Menschen nicht aufgrund des Primärtumors, sondern an den Folgen der Metastasen (Chaffer and Weinberg, 2011; Gupta and Massagué, 2006), die auch noch Jahrzehnte nach der Entfernung des Primärtumors auftreten können (Hanahan and Weinberg, 2011). Häufig bleiben Mikrometastasen und ihre Vorläuferzellen durch übliche klinische Diagnoseverfahren unentdeckt (Ignatiadis and Reinholz, 2011). Als Vorläuferzellen der Metastasen gelten disseminierte Tumorzellen (DTCs) im Knochenmark oder zirkulierende Tumorzellen (CTCs) im Blut. Diese Zellen können aktiv, z. B. über den Mechanismus der EMT, aus dem Zellverband des Primärtumors auswandern oder gelangen durch passives Abschilfern vom Primärtumor über die Blutbahn und Lymphgefäße in vom Primärtumor entfernte Körperregionen (Thiery et al., 2009; Tjensvoll et al., 2014). In den metastatischen Zielorganen können sich die Zellen unter für sie günstigen Bedingungen ansiedeln und zu klinisch relevanten Makrometastasen auswachsen (Valastyan and Weinberg, 2011).

Obwohl die Resektion von Metastasen die einzige kurative Maßnahme darstellt, können Metastasen nur in wenigen Fällen durch chirurgische oder radiologische Maßnahmen entfernt bzw. zerstört werden. Dies ist häufig durch ihre Größe, Lage oder Anzahl bedingt. In vielen Fällen wird jedoch eine systemische Therapie oder eine Kombination aus beidem erwogen (Gustavsson et al., 2015; Mitry et al., 2008; Penna and Nordlinger, 2002; Singletary et al., 2003). Eine systemische Therapie scheitert aber oft an Resistenzen der Zielzellen (Dallas et al., 2009; Rivera and Gomez, 2010). Um möglichst in einem frühen Erkrankungsstadium die Ausbildung von Metastasen zu verhindern, ist es nötig, mehr über den Prozess der Metastasierung zu erfahren. Während einer Therapie bietet die sequentielle Analyse der CTCs die Möglichkeit, den Verlauf einer Therapie zu beobachten und gegebenenfalls zu ändern. Zwar konnten in den letzten Jahren viele Fortschritte bei der Isolierung und Detektion der CTCs erzielt werden, aber ein limitierender Schritt in der

routinemäßigen Isolierung und Detektion dieser Zellen ist weiterhin die geringe Anzahl der Zellen im Blut und das Fehlen eines CTC-spezifischen Markers (Yu et al., 2011). Darüber hinaus ist es nur mit den wenigsten Verfahren möglich, lebende Zelle zu isolieren und in die Zellkultur zu überführen. An solchen expandierten CTCs könnten molekulare und funktionelle Analysen durchgeführt werden, die einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Metastasierung gewähren (Cayrefourcq et al., 2015). Ebenfalls wäre es möglich, die Zellen eines Patienten direkt auf Resistenzen gegen Medikamente hin zu untersuchen (Yu et al., 2014). Zusätzlich könnten solche Analysen auch neue therapeutische Zielstrukturen zur Bekämpfung der systemischen Erkrankung liefern.

Da die Zellpopulation der CTCs, genauso wie der korrespondierende Primärtumor, in sich heterogen sein können (Macintosh et al., 1998; Pestrin et al., 2015) und somit kein einheitliches Expressionsprofil aufweisen, ist es schwierig, einen geeigneten Marker zu finden, der alle Zellen dieser Zellpopulation identifiziert. Derzeit ist EpCAM der am häufigsten verwendete Detektionsmarker für CTCs. Doch da einige CTCs während der Abwanderung eine EMT durchlaufen können, ist es möglich, dass der epitheliale Marker EpCAM auf CTCs zeitweise herunterreguliert ist (Driemel et al., 2014) oder intrinsisch von den Tumorzellen überhaupt nicht exprimiert wird (Gires and Stoecklein, 2014). Solche EpCAM-negativen Zellen sind durch EpCAM-abhängige Detektionsmethoden, wie das CellSearch®-System, nicht nachweisbar. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass EpCAM-negative EMT-CTCs auch einen aggressiveren Phänotyp aufweisen können (Markiewicz et al., 2014; Sieuwerts et al., 2009; Yu et al., 2013). Das Auftreten von CTCs mit einem mesenchymalen Phänotyp ist mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert (Giordano et al., 2012; Gradilone et al., 2011; Raimondi et al., 2011). Solch eine schlechtere Prognose für die Patienten kann darin begründet sein, dass EMT-CTCs Resistenzen gegenüber gängigen Therapien entwickeln und somit nicht wirksam bekämpft werden können (Theys et al., 2011). Da sich ebenfalls unter den EpCAM-negativen CTCs potentielle Vorläuferzellen der Metastasen befinden können, sind diese Zellen von besonderem Interesse.

Um CTCs EpCAM-unabhängig im peripheren Blut aufspüren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob dies mittels humaner Adenoviren möglich ist und diese CTCs darüber hinaus vital sind. Hierzu wurden zunächst zwei humane Adenoviren verwendet, die einen unterschiedlichen Tropismus aufweisen. Zur Markierung der CTCs

wurde durch die Viren eingebrachtes EGFP bzw. GFP eingesetzt. Dies sollte dafür sorgen, dass nur lebende Zellen markiert wurden.

5.1 Untersuchungen zur Verwendung des adenoviralen Vektors Ad5 für die CTC-Detektion

Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob sich der adenovirale Vektor Ad5 zur CTC-Detektion eignet. Humane Adenoviren des Typs 5 (Ad5) binden an epitheliale Zellen über den Coxsackivirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Die Expression epithelialer Marker kann u. a. aufgrund einer EMT Schwankungen unterliegen. Es wurde bereits gezeigt, dass die CAR-Expression in unterschiedlichen Tumoren stark variieren kann. Einerseits kann es zu einer Zunahme der CAR-Expression in Tumoren der Brust, der Lunge und des Eierstocks kommen (Chen et al., 2013; Martin et al., 2005; Reimer et al., 2007; Wunder et al., 2013), wohingegen CAR-Expression in einem fortgeschrittenen Tumorstadium verschiedener Tumorentitäten herunterreguliert sein kann (Anders et al., 2009; Korn et al., 2006; Matsumoto et al., 2005; Rauen et al., 2002; Sachs et al., 2002; Stecker et al., 2011; Wunder et al., 2012). Um einen Überblick über die CAR-Expression in Tumorzellen zu bekommen, wurden diese zunächst auf mRNA- und Proteinebene in den hier verwendeten Tumorzelllinien untersucht. Hierbei wurden deutliche Unterschiede in der CAR-Expression festgestellt. Als Beispiel kann hierfür exemplarisch der Unterschied zwischen den beiden Kolonkarzinom-Zelllinien COLO205 und CACO-2 dienen. Sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene war die CAR-Expression bei COLO205 gegenüber der Zelllinie CACO-2 deutlich vermindert. Möglicherweise beruht dies darauf, dass COLO205 aus einer Metastase generiert wurde und CACO-2 aus einem Primärtumor. Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit haben Shan et al. beobachtet, dass die Expression von *CAR* in den MDA-MB-231-Zellen höher war als in SK-OV-3-Zellen (Shan et al., 2012). Möglicherweise liegt dies darin begründet, dass diese Arbeitsgruppe die parentale Zelllinie SK-OV-3 und nicht die Xenograft-Zelllinie SK-OV-3.ip verwendet hat (Yu et al., 1993). Bei den Prostatakarzinom-Zelllinien war die CAR-Expression bei PC-3 gegenüber DU-145 ebenfalls sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Diese differentielle Expression zwischen den Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145 und PC-3 wurde auf

Proteinebene bereits von Okegawa beschrieben (Okegawa et al., 2000) und konnte somit bestätigt werden.

Nachdem die Expression von CAR bei den verschiedenen Zelllinien nachgewiesen wurde, war die Frage spannend, ob die dramatischen Effekte einer EMT auf den Phänotyp von CTCs (Yu et al., 2013) auch die CAR-Expression beeinflussen würden. Eine Herunterregulation von CAR während der EMT auf CTCs würde die Effektivität der Infektion mit dem Ad5EGFP-Virus erheblich reduzieren. In Ovarialkarzinom-Zelllinien, einer Pankreaskarzinom-Zelllinie (Panc-1) und der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 konnte eine Herunterregulation von CAR durch TGF-β1 bereits nachgewiesen werden (Brüning and Runnebaum, 2003; Lacher et al., 2006, 2011). In einem EMT-Versuch mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 konnte hingegen kein Einfluss auf die CAR-Expression festgestellt werden (Shigeyasu et al., 2015). Die Untersuchung der Auswirkung der TGF-β-induzierten EMT in der vorliegenden Arbeit zeigte ebenfalls keine statistisch signifikante Auswirkung auf die *CAR*-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dies könnte jedoch auch auf die erheblichen Standardabweichungen zurückzuführen sein, die bei den Versuchen dieser Arbeit festzustellen waren und die sich durch die geringe Menge des untersuchten Ausgangsmaterials erklären lassen. Da EMT-CTCs nicht ausschließlich einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen, sondern auch einen intermediären (Yu et al., 2013), wäre unter diesem Gesichtspunkt die Infektion der CTCs mit dem Ad5-Virus weiterhin eine Option. Da die Expression von CAR noch nicht auf CTCs aller Tumorentitäten untersucht wurde, wäre auch eine Kombination aus beiden Viren (Ad5EGFP, Ad5/3GFP) eine Möglichkeit. So haben Takayama et al. zur Erweiterung des Tropismus ein Mosaik-Virus mit der Ad3- und Ad5-Knob-Domäne etabliert (Takayama et al., 2003).

5.2 Auswirkung der Viruskonzentration auf die Zellviabilität

Bei EpCAM-exprimierenden Zellen ist es mit dem CellSearch®-System möglich, eine Zelle in 7.5 ml Blut zu detektieren (Franken et al., 2012; Kraan et al., 2011; Miller et al., 2010). Jedoch hat dieses System wie alle CTC-Nachweisverfahren, die auf epithelialen Markern beruhen, Limitationen bezüglich der Detektion von CTCs mit mesenchymalen Eigenschaften, bei denen die zur Detektion eingesetzten epithelialen Marker herunterreguliert sein können (Armstrong et al., 2011; Gorges et al., 2012; Kallergi et al., 2011; Steinert et al., 2014). Daher

ist die genaue Zahl der CTCs im Blut weiterhin ungeklärt. Darüber hinaus detektieren und isolieren viele dieser Systeme keine lebenden Zellen. Denn sie weisen häufig Fixierungsschritte bei der Präparation der Proben auf oder sind abhängig von intrazellulären Färbungen mit Permeabilisierungs-Schritten, welche alle einen Verlust der Viabilität nach sich ziehen (Allard et al., 2004; Liu et al., 2011; Thege et al., 2014). Da aber ein Ziel dieser Arbeit war, detektierte Zellen kultivieren zu können, sollte die Viabilität der infizierten Zellen gewahrt bleiben. Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden ursprünglich für die Gentherapie entwickelt (Benihoud et al., 1999; Kanerva et al., 2002a). Dort gilt es, möglichst geringe Viruskonzentrationen einzusetzen, um eine Immunantwort des Körpers zu verhindern (Bessis et al., 2004; Liu and Muruve, 2003; Muruve et al., 1999). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch ausschließlich *ex-vivo*-Experimente durchgeführt wurden, konnte der Aspekt der Immunantwort vernachlässigt werden. Aufgrund der geringen Anzahl der CTCs im Blut sollten in der vorliegenden Arbeit für eine erfolgreiche Detektion der CTCs allerdings hohe Viruskonzentrationen eingesetzt werden. Dies sollte gewährleisten, dass jede CTC von wenigstens einem Viruspartikel infiziert wird, so dass sogar eine einzelne CTC in einem hohen Hintergrund von Blutzellen detektiert werden kann. Doch Teramato et al. haben an primären Lungenepithelzellen beobachtet, dass der adenovirale Vektor Ad5 sich dosisabhängig negativ auf die Zellproliferation und –viabilität auswirkt (Teramoto et al., 1995). Tumorzelllinien wurden hier steigenden Viruskonzentrationen beider viraler Vektoren (Ad5 und Ad5/3) ausgesetzt. Jedoch konnte die von Teramato et al. beschriebene Auswirkung auf die Viabilität infizierter Zelllinien (Teramoto et al., 1995) in dieser Arbeit für Ad5 nicht bestätigt werden. Der tropismusmodifizierte Ad5/3-Vektor bewirkte lediglich bei extrem hohen Viruskonzentrationen eine signifikante Reduktion der Viabilität einiger Tumorzelllinien. In den für diese Arbeit angestrebten Viruskonzentrationen konnte somit kein erheblicher Einfluss auf die Viabilität festgestellt werden. Das von Kojima et al. verwendete adenovirale Detektionssystem ermöglicht aufgrund eines Telomerasepromotors die tumorspezifische Expression des nachgeschalteten Transgens GFP (Kojima et al., 2009). Die von Kojima et al. etablierten Adenoviren sind im Gegensatz zu den hier verwendeten Adenoviren replikativ. Infolge der aktiven Virusreplikation in den Tumorzellen kommt es gleichzeitig zu einer Amplifikation des GFP-Fluoreszenzsignals. Dies führt dazu, dass die infizierten Tumorzellen bereits 24 h nach der Infektion aufgrund einer starken GFP-Expression deutlich zu erkennen und zu detektieren sind (Kojima et al., 2009). Auch

kann aufgrund der Amplifikation des Fluoreszenzsignals schon mit einer geringen Viruskonzentration eine gute Detektierbarkeit der Zielzellen erlangt werden. Die Virusreplikation hat aber den Nachteil, dass die infizierten Zellen aufgrund des lytischen Zyklus zugrunde gehen (Maida et al., 2009). Somit stellt dieses System anlässlich zukünftig angestrebter Kultivierungsversuche keine Alternative dar.

5.3 Kultivierung von Tumorzellen nach adenoviraler Infektion

Die molekulare Charakterisierung von CTCs konnte bereits erste Einblicke in die Biologie dieser Zellen auf genotypischer und phänotypischer Ebene ermöglichen. Unter anderem war es möglich, die Heterogenität zwischen den CTCs und dem korrespondierenden Primärtumor bzw. innerhalb einer CTC-Population darzustellen (Pestrin et al., 2009, 2015). Um die gesamte Biologie dieser Zellen zu erfassen, wäre eine Kultivierung der CTCs und die Etablierung permanenter Zelllinien oder die Möglichkeit von Kurzzeitkulturen wünschenswert. Die Kultivierung nachgewiesener und markierter CTCs ist jedoch häufig ausgeschlossen, da der immunzytochemische Nachweis i. d. R. Fixierungsschritte und/oder die Permeabiliserung der Zellmembran erfordert. Zellbiologische Eigenschaften, wie Invasions-, Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen können somit nicht analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die Zellen nach einer adenoviralen Infektion und GFP/EGFP-Markierung weiterhin vital und kultivierbar waren. Dabei konnte zunächst für die hier verwendeten Systeme bestätigt werden, dass die adenovirale Transduktion ein vorrübergehender Zustand ist. Die EGFP- bzw. GFP-Expression hat in den adenoviral-infizierten Zellen über einen Kultivierungszeitraum von 15 Tagen kontinuierlich abgenommen. Dies beweist, dass das virale Genom wie vorgesehen nicht in das Wirtsgenom integriert wurde, sondern episomal vorlag (Benihoud et al., 1999; Robbins et al., 1998; Thomas et al., 2003). Durch die Zellteilungen wurde das virale Episom verdünnt, bis es nicht mehr nachweisbar war.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Infektion mit Ad5EGFP im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte. Hiermit konnten die bereits ermittelten Ergebnisse zur Zellviabilität bestätigt werden. Die Infektion des Ad5/3GFP-Virus zeigte bei einer eingesetzten Konzentration von 1×10^4 VP/Z einen signifikant erhöhten

Anteil toter Zellen ($p < 0.0001$). Zwar blieb der Anteil der toten Zellen in der behandelten Probe über den gesamten Zeitraum relativ stabil, dennoch betrug der Median der toten Zellen in den behandelten Zellen 28 % und 17 % in unbehandelten Kontrollzellen.

Einige wenige Arbeitsgruppen konnten CTCs bereits kultivieren und auch permanente Zelllinien etablieren (Cayrefourcq et al., 2015; Yu et al., 2014; Zhang et al., 2014). Die Arbeitsgruppe um Zhang verwendete zur Isolierung und anfänglichen Kultivierung den sogenannten CTC-Chip. Eine anschließende Kultivierung wurde erfolgreich in herkömmlichen Zellkulturgefäßen weitergeführt. Mit diesen expandierten CTCs konnten sie u. a. molekulare Analysen zur Gen-Expression und zum Mutationsstatus anfertigen. Darüber hinaus war es möglich, die Invasionsfähigkeit der CTCs, welche eine wichtige Fragestellung bezüglich der Metastasierung darstellt, zu untersuchen (Zhang et al., 2014). Cayrefourcq et al. konnten anhand ihrer etablierten CTC-Zelllinie, zusätzlich zu Informationen auf Genom-, Transkriptom-, Sekretom- und Proteomebene, auch Erkenntnisse zur weiteren Differenzierung dieser Zellen und zum tumoriniziierenden Potential *in vivo* gewinnen (Cayrefourcq et al., 2015). Neben molekularen Analysen untersuchte die Arbeitsgruppe um Yu auch die Tumorigenität der CTC-Zelllinien *in vivo.* Außerdem wurde anhand von bereits bekannten Arzneimitteln und experimentellen Wirkstoffen das Ansprechen der CTCs auf diese Behandlung beobachtet. Dadurch konnten neue, potentielle therapeutische Zielstrukturen aufgedeckt werden (Yu et al., 2014). Alles in allem war die Kultivierung aller drei Arbeitsgruppen jedoch sehr ineffizient. Die Gruppe um Yu konnte aus sechs von insgesamt 36 Patientenproben (17 %) und Cayrefourcq et al. lediglich aus zwei von 71 Proben (3 %) Zelllinien etablieren (Cayrefourcq et al., 2015; Yu et al., 2014). Zhang et al. war es zwar gelungen aus 14 von 19 (74 %) Proben Zelllinien zu etablieren, jedoch betrug die Kultivierungszeit hier nicht mehr als 14 Tage (Zhang et al., 2014). Darüber hinaus waren bei Cayrefourcq et al. CTC-Zahlen von ≥ 300 für eine erfolgreiche Kultivierung essentiell (Cayrefourcq et al., 2015). Da keine einleitenden Untersuchungen zur Vitalität der isolierten CTCs durchgeführt wurden (Cayrefourcq et al., 2015; Yu et al., 2014; Zhang et al., 2014) besteht die Möglichkeit, dass viele der isolierten CTCs nicht mehr vital waren und eine effiziente Kultivierung somit unmöglich war. Weiterhin ist wichtig zu betonen, dass in den beschrieben Versuchen keine positiv markierten CTCs kultiviert wurden, sondern nur angereicherte Zellfraktionen. Das adenovirale Detektionssystem könnte die Effizienz der CTC-Kultivierung steigern, da nur vitale Zellen mit GFP markiert und identifiziert werden.

5.4 Vergleich der Effizienz der Infektion von Ad5EGFP und Ad5/3GFP

Bei der Überprüfung der transienten Infektion mittels FACS-Analyse fiel bereits auf, dass die Infektion mit dem adenoviralen Vektor Ad5/3 im Vergleich zum Ad5-Vektor deutlich effizienter war. Dies zeigte sich durch einen deutlich höheren Anteil GFP-positiver Zellen zu Beginn des Versuchs (69 %) im Vergleich zu EGFP-positiven Zellen (45 %).

Da in dieser Arbeit aber eine visuelle, mikroskopische Auswertung von CTC aus Patientenproben geplant war, wurde die Effizienz der Infektion ebenfalls mikroskopisch analysiert. In der mikroskopischen Auswertung der Infektionseffizienz ergab sich zunächst, dass alle getesteten Zelllinien mit beiden adenoviralen Vektoren (Ad5 und Ad5/3) infiziert werden konnten. Dabei stellte sich aber heraus, dass die Infektion mit Ad5/3 deutlich effizienter war als mit Ad5. Die mit Ad5/3 infizierten Zellen konnten bereits bei geringeren Viruskonzentrationen und zu einem früheren Zeitpunkt visuell detektiert werden als solche Zellen, die mit Ad5 infiziert wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression des Rezeptors für Ad5/3 stärker und dichter auf den Zellen exprimiert war als der Rezeptor CAR für das Ad5-Virus, so dass mehr Ad5/3-Virus an die Zellen binden und in diese aufgenommen werden konnte. In Ovarialkarzinomzellen konnte bereits von Kanerva et al. gezeigt werden, dass die höhere Infektiösität des Ad5/3-Vektors im Vergleich zum Ad5-Vektor auf eine höhere Dichte des jeweiligen Rezeptors zurückzuführen ist (Kanerva et al., 2002a). Des Weiteren belegen Untersuchungen an Proben aus primären Ovarialkarzinomen und einer Adenokarzinom-Zelllinie des Pharynx eine ebenfalls effizientere Infektion mit Ad5/3 als mit Ad5 (Kanerva et al., 2002b; Stevenson et al., 1997). Diese Ergebnisse deuten bereits darauf hin, dass Ad5/3 für die Infektion von CTCs bezüglich verschiedener Tumorentitäten universeller einsetzbar sein könnte als Ad5. Eine Bestärkung dieser Vermutung ist die äußerst effiziente Infektion der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 mit Ad5/3. Denn hier zeigte sich deutlich, dass auch Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp (Chao et al., 2010) sehr gut infiziert und detektiert werden können. Die Infektion von Ad5 ist auf die Expression von CAR auf epithelialen Zellen angewiesen. Diese unterliegt in verschiedenen Tumorentitäten jedoch starken Schwankungen (Chen et al., 2013; Korn et al., 2006; Martin et al., 2005; Rauen et al., 2002). Dies könnte die Folge einer EMT sein, bei der die CTCs ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen (Brüning and Runnebaum, 2003; Driemel et al., 2014; Gorges et al., 2012; Lacher et al., 2006,

2011). Da Ad5/3 überzeugendere Ergebnisse hinsichtlich der Infektionseffizienz lieferte, wurde für weitere Versuche ausschließlich das Ad5/3-Virus verwendet.

5.5 Spezifität und Sensitivität der adenoviralen Infektion mit Ad5/3GFP

Bereits publizierte Daten weisen darauf hin, dass nicht-epitheliale Zellen bzw. Blutzellen nur schlecht durch Ad5/3 infiziert werden können. So war es beispielsweise in Mausversuchen nach intraperitonealer Injektion von Ad5/3-Viren für Kanerva et al. kaum möglich, eine Infektion der Blutzellen im Vergleich zu epithelialen Geweben zu messen (Kanerva et al., 2002b). Lyons et al. konnten hingegen zeigen, dass insbesondere *ex vivo* eine Bindung von Ad5-Viren an Blutzellen stattfindet (Lyons et al., 2006). Hierbei waren bis zu 95 % der Adenoviren mit Erythrozyten assoziiert, wohingegen lediglich für 1 bis 5 % der Viren eine Bindung an PBMCs nachgewiesen werden konnte. Für CD14-positive Monozyten konnte sogar eine Infektion durch Ad5 beobachtet werden. Wang et al. wiesen nach, dass der zelluläre Rezeptor DSG2 auf Thrombozyten und Granulozyten exprimiert wird und Ad3 an diese beiden Zelltypen binden kann. Darüber hinaus konnten sie beobachten, dass Ad3 in Granulozyten aufgenommen wird (Wang et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnten die Beobachtungen von Wang et al. (Wang et al., 2011) nicht nachvollzogen werden. Mithilfe des sehr sensitiven Luciferase-Assays konnte eine epithelspezifische Infektion durch Ad5/3 untermauert werden. Das adenovirale System bewies deutlich, dass selbst bei sehr hohen Viruskonzentrationen (5×10^5 VP/Z) keine Infektion von PBMCs durch das Ad5/3-Virus auftrat. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass keine falsch-positiven Zellen nach der Infektionen von Patientenproben detektiert werden würden. Die gleichzeitige Infektion der Zelllinie MDA-MB-231 mit PBMCs zeigte eine Abnahme in der Effizienz der Infektion gegenüber der Infektion ohne PBMCs, die jedoch nicht statistisch signifikant war ($p = 0.6753$). Dies könnte auf eine Bindung der Ad5/3-Viren an Blutzellen hinweisen, welche daraufhin für eine Infektion der MDA-MB-231-Zellen nicht mehr zur Verfügung standen (Lyons et al., 2006). Eine Infektion der PBMCs in dieser gemischten Zellpopulation kann ausgeschlossen werden, da bei der separaten Behandlung der PBMCs mit Ad5/3 keine Luziferaseaktivität nachgewiesen werden

konnte. Auch bei der mikroskopischen Betrachtung von Tumorzellen und PBMCs, die mit Ad5/3GFP infiziert wurden, konnten keine GFP-positiven PBMCs beobachtet werden.

Alle vorangegangen Versuche wiesen auf eine epithelspezifische Infektion von Ad5/3 hin. Bei der Infektion von Patientenmaterial fiel jedoch die Probe eines gesunden Spenders auf, in der nahezu alle Zellen GFP-positiv waren. Eventuell wies die Kontrollprobe epitheliale Zellen auf, die aufgrund einer Entzündungsreaktion ins Blut gelangt waren (Allard et al., 2004; Pantel et al., 2012). Jedoch scheint dies eher unwahrscheinlich, da in diesen Fällen im Vergleich mit Tumorpatienten deutlich geringere Zellzahlen beschrieben wurden. Somit muss dieses Einzelereignis weitgehend unverstanden bleiben. Um nun die Gefahr solcher falsch-positiven Ergebnisse zu verhindern, wurde in den experimentellen Aufbau eine Kontrollfärbung für den Leukozytenmarker CD45 eingeführt. Diese Färbung sollte zu einer sicheren Differenzierung zwischen CTCs und Blutzellen beitragen. Weitere auf diese Weise analysierte Patientenproben wiesen keine doppelt-positiven Zellen (GFP-positiv, CD45-positiv) auf, so dass davon auszugehen ist, dass keine falsch-positiven Blutzellen detektiert wurden.

Um die Sensitivität des adenoviralen Detektionssystems mit bereits bestehenden Verfahren vergleichen zu können, wurden definierte Zellzahlen der Zelllinien MDA-MB-231 in PBMC-Präparationen eingebracht. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie sich gut mit Ad5/3 infizieren ließ. Hierbei konnte eine Wiederfindungsrate von $r^2 = 0.9994$ (an Tag zwei nach Infektion) erreicht werden, welche vergleichbar mit anderen Detektionssystemen ist. So konnte eine ähnlich gute Wiederfindungsrate von Kojima et al. mithilfe eines replikationskompetenten Virussystems erzielt werden ($r^2 = 0.9996$) (Kojima et al., 2009). Die Wiederfindungsrate des sogenannten CTC-Chips liegt bei $r^2 = 0.999$ (Nagrath et al., 2007) und beim Goldstandard CellSearch® liegt diese für die Analyse von Blutproben bei $r^2 = 0.99$ (Naoe et al., 2007) und bei der Verwendung von DLA-Proben bei $r^2 = 0.996$ (Fischer et al., 2013).

5.6 Anwendung des adenoviralen Systems bei klinischen Proben von Tumorpatienten

Im menschlichen Körper zirkulieren 4-6 Liter Blut. Bei der Suche nach CTCs wird in den gängigen Verfahren ein limitiertes Blutvolumen von 1-10 ml untersucht, so dass immer nur

ein Ausschnitt der Situation im Körper eines Patienten abgebildet wird. Insbesondere Analysen der Proben von Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren führen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die Detektionsspanne von CTCs ist hier mit 5-62 % in einigen Studien sehr weit (Gaforio et al., 2003; Karhade et al., 2014; Loh et al., 2014; Thalgott et al., 2013; Thorsteinsson et al., 2011). Mit dem CellSearch®-System werden routinemäßig 7.5 ml Blut analysiert, wobei auch hier in Proben von Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren deutlich seltener CTCs (5-24 %) gefunden werden als in Patienten mit nachgewiesenen Metastasen (61-84 %) (Cristofanilli et al., 2004; Lucci et al., 2012; Thalgott et al., 2013). Solch eine unzuverlässige Detektionsrate erschwert die Aussagekraft der CTCs im klinischen Kontext als Biomarker, u. a. bei der Überwachung des Ansprechens auf eine Therapie oder bei Therapieentscheidungen. Die Analyse eines größeren Blutvolumens könnte daher verlässlichere und aussagekräftigere Daten über die Prognose und den Therapieverlauf liefern. Fischer et al. konnten tatsächlich mit Hilfe der DLA nachweisen, dass die deutliche Erhöhung des analysierten Blutvolumens eine Steigerung der CTC-Detektion insbesondere bei Patienten ohne Metastasen bewirkt. So konnten mittels CellSearch® bei 72 % der DLA-Proben CTCs nachgewiesen werden, jedoch nur in 28 % der analog untersuchten peripheren Blutproben (Fischer et al., 2013).

Da die Wahrscheinlichkeit, hohe CTC-Zahlen detektieren zu können, durch die Verwendung von DLA-Proben gesteigert werden kann, wurden bei der Detektion von CTCs mit dem adenoviralen System ebenfalls DLA-Proben verwendet. Für einen direkten Vergleich des adenoviralen Detektionssystems mit dem CellSearch®-System wurden parallel DLA- und Blutproben desselben Patienten mittels CellSearch® analysiert. Mit dem adenoviralen Detektionssystem wurden 1×10^7 Zellen der DLA-Proben (WBCs) untersucht, wohingegen mittels CellSearch® in der Regel 2×10^8 WBCs analysiert wurden. Die im CellSearch® analysierten Blutproben wiesen ein definiertes Volumen von 7.5 ml auf. Bezüglich der untersuchten DLA-Proben von 31 Tumorpatienten stellte sich ein klarer Detektionsunterschied zwischen CellSearch® und dem adenoviralen System heraus (61 % adenoviral vs. 29 % CellSearch®). Mittels CellSearch® analysierte periphere Blutproben (n = 29) waren in lediglich 7 % der Fälle positiv für CTCs. In den meisten Fällen, in denen mithilfe des adenoviralen Systems CTCs detektiert werden konnten, wurden in den Blutproben mittels CellSearch® keine oder weniger Zellen detektiert. Lediglich in einer Probe einer Mammakarzinom-Patientin war die Detektionsrate höher als mit dem virusbasierten

System. Diese enorme Diskrepanz zwischen den Detektionsraten in DLA- und Blutproben kann darauf zurückzuführen sein, dass durch die Verwendung der DLA-Proben ein höheres Blutvolumen untersucht wurde (ca. 60 ml vs. 7.5 ml) (Fischer et al., 2013). Hierdurch wurde die Wahrscheinlichkeit, CTCs zu detektieren, deutlich erhöht. Die bei der Etablierung des adenoviralen Detektionssystems beobachtete hohe Sensitivität konnte hier bei der Analyse von Patientenproben bestätigt werden. Es war möglich, bereits eine CTC in 1 x 10^7 WBCs zu detektieren. Dies ist vergleichbar mit den Nachweisgrenzen des CellSearch®-Systems und des AdnaTests (Hartkopf et al., 2015; Zieglschmid et al., 2005).

Auffallend war, dass die CTC-Detektionsfrequenz bei DLA-Proben von Pankreaskarzinom-Patienten im adenoviralen Detektionsassay am höchsten war. Im Vergleich dazu wurden mehr Zellen in Proben (*n* = 5) von Brustkrebspatientinnen mittels CellSearch® gefunden. Im Durchschnitt wurde in DLA-Proben von Brustkrebspatientinnen mittels adenoviralem System eine CTC identifiziert, wohingegen mittels CellSearch® in DLA-Proben 41 CTCs und in Blutproben 3.8 CTCs detektiert werden konnten. Die beobachteten Unterschiede in der Anzahl der detektierten CTCs zwischen beiden Detektionssystemen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die mittels CellSearch® detektierten CTCs der Mammakarzinom-Proben apoptotisch waren. Solche Zellen könnten durch das adenovirale System nicht mehr detektiert werden, da für die Markierung der CTCs durch GFP vitale Zellen benötigt werden. Apoptotische CTCs wurden bereits bei Prostata- und Mammakarzinom-Patienten beschrieben (Kallergi et al., 2013; Larson et al., 2004). Kallergi et al. haben festgestellt, dass Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom seltener apoptotische CTCs aufwiesen als solche Proben von Patientinnen, die sich in einem frühen Tumorstadium befanden. Lediglich 32 % der untersuchten CTCs waren in Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom apoptotisch, wohingegen der Anteil apoptotischer CTCs in frühen Stadien bei 77 % lag (Kallergi et al., 2013). Beim Prostatakarzinom konnten Larson et al. feststellen, dass lediglich 17 % der untersuchten Zellen intakte CTCs waren (Larson et al., 2004). Beim Nierenkarzinom wurden in 84 % der Patientenproben apoptotische Zellen nachgewiesen (Rossi et al., 2012) und beim kleinzelligen Lungenkarzinom konnten sogar in 93 % der Patientenproben apoptotische Zellen detektiert werden (Hou et al., 2009).

Ein weiterer, interessanter Befund dieser Arbeit war, dass mithilfe des adenoviralen Detektionssystems häufiger Zellen in Proben aggressiverer Tumoren wie des Pankreas und

des Ösophagus gefunden wurden als mit dem CellSearch®-System. Hier wäre es möglich, dass der virale Rezeptor DSG2 für Ad5/3 auf den CTCs dieser Tumorentitäten stärker exprimiert war als EpCAM. Die höheren Detektionsraten in den Proben von Mammakarzinom-Patientinnen durch das CellSearch®-System sowohl in Blut- als auch DLA-Proben gründen möglicherweise darin, dass die in diesen Proben detektierten CTCs mehr EpCAM als DSG2 exprimiert haben. Khoja et al. haben festgestellt, dass die von ihnen untersuchten Primärtumoren des Pankreas alle EpCAM-positiv waren. Hierbei zeigte sich aber bereits, dass einige Tumoren eine starke EpCAM-Expression aufwiesen wohingegen bei anderen Tumoren lediglich eine schwache Expression dokumentiert werden konnte. Die EpCAM-Expression der korrespondierenden CTCs hingegen war sehr heterogen. Einige Patientenproben wiesen ausschließlich EpCAM-negative CTCs auf, so dass solche Zellen durch das CellSearch®-System nicht angereichert und detektiert werden können (Khoja et al., 2012). Die Herunterregulation eines epithelialen Markers wie EpCAM kann durch den Vorgang der EMT verursacht werden (Gorges et al., 2012). Neben der EMT können auch intrinsische Vorgänge wie die Hypermethylierung des EpCAM-Promotors zu einer transkriptionellen Herunterregulation von EpCAM führen (Spizzo et al., 2007). Ebenfalls kann die proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne von EpCAM zu einer verminderten Präsenz des Proteins auf der Zelloberfläche führen (Maetzel et al., 2009). Dies führt dazu, dass solch eine EpCAM-negative CTC-Population durch das CellSearch®-System nicht erfasst werden kann. Aufgrund dessen stehen Informationen, die diese Zellen liefern würden, nicht zur Verfügung.

Für eine genauere Gegenüberstellung der Detektionsraten des adenoviralen Detektions- und des etablierten CellSearch®-Systems wurden weitere Proben (n = 5) analysiert. Hierfür wurden Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom verwendet. Für die adenovirale Detektion wurden wie in den vorangegangenen Versuchen 1×10^7 PBMCs untersucht. Im CellSearch®-System wurden standardmäßig 7.5 ml Blut analysiert. Die Gesamtzellzahl in den hier mittels CellSearch® analysierten Blutproben lag zwischen 1.6×10^7 und 2.2×10^7. Dies ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit der detektierten Zellzahlen. Bei der Gegenüberstellung der detektierten CTC-Zahlen in 7.5 ml Blut mittels CellSearch® und in 1×10^7 PBMCs war noch ein deutlicher Unterschied zu erkennen, der aber durch die Normalisierung der CellSearch®-Werte auf 1×10^7 PBMCs deutlich verringert werden konnte. Es zeigte sich erneut, dass mittels CellSearch® mehr CTCs detektiert werden

konnten als mit dem adenoviralen System (CellSearch® : Mittelwert = 6.8, *n* = 5; Virus: Mittelwert = 2, *n* = 5). Lediglich in einer Probe konnte das CellSearch®-System keine CTCs auffinden, wohingegen mittels adenoviraler Infektion zwei CTCs detektiert wurden. Die Diskrepanz in der jeweiligen Anzahl der CTCs könnte darin begründet sein, dass nicht mehr alle CTCs vital waren, so dass diese durch das adenovirale System nicht markiert werden konnten. Das CellSearch®-System hingegen reichert die Zellen nur in Hinblick auf ihre EpCAM-Expression an.

5.7 Experimente zur genetischen Analyse der Ad5/3-angereicherten Zellen mittels aCGH

Ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen ist ihre chromosomale Instabilität (Gao et al., 2007; Geigl et al., 2008; Lengauer et al., 1997). Genome von Tumorzellen zeigen oft typische Muster chromosomaler Zugewinne und Verluste. Einige chromosomale Zugewinne oder Verluste scheinen eher typisch für bestimmte Tumorentitäten zu sein, wohingegen Zugewinne der chromosomalen Regionen 1q, 3q und 8q sowie Verluste der Regionen 8p, 13q, 16q und 17p sehr häufig bei verschiedenen Tumortypen auftreten (Forozan et al., 1997). Die aCGH ist eine geeignete Methode, um einen Überblick über CNAs des gesamten Genoms von Zellen zu erlangen (Haraksingh et al., 2011; Kallioniemi, 2008). Da die aCGH nicht speziell ein Verfahren für die Analyse von Einzelzellen ist, wurde hierzu ein Protokoll von Möhlendick et al. etabliert (Möhlendick et al., 2013). Die hierfür benötigte Amplifikation der gesamtgenomischen Einzelzell-DNA beruhte auf Protokollen von Klein et al. und Stoecklein et al. (Klein et al., 1999; Stoecklein et al., 2002). Die Voraussetzung für eine erfolgreiche aCGH-Analyse ist, dass das Genom der Einzelzell-DNA erfolgreich amplifiziert wurde und das resultierende WGA-Produkt das gesamte Genom vollständig repräsentiert. Hierzu wurden in den WGA-Produkten verschiedene Loci, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, mit spezifischen Kontroll-PCRs nachgewiesen. Da eine erfolgreiche aCGH-Analyse mit Nachweis von mindestens drei Amplikons in der Multiplex-PCR (Möhlendick et al., 2013) bzw. zwei Banden in einer weiteren Kontroll-PCR assoziiert ist, wurden nur Proben, die dieses Kriterium erfüllten, in die weiteren Versuche eingeschlossen. Bei der PCR-basierten Überprüfung der Qualität der WGA-Produkte fiel auf, dass nicht alle Proben die Qualitätsanforderungen für den Einsatz in der aCGH-Analyse nach

der gesamtgenomischen Amplifikation erfüllten. In den Kontroll-PCRs zeigte sich, dass die Amplifikation nicht bei allen Zellen erfolgreich war. Es war anzunehmen, dass Faktoren im Versuchsaufbau die reibungslose Amplifikation des Genoms der Einzelzellen verhindert haben. Insbesondere die starke Fixierung mit 4 %igem PFA könnte sich negativ ausgewirkt haben. Andere Detektions- und Isolierungsverfahren verwenden schonendere Verfahren zur Fixierung oder verzichten gänzlich darauf (Binder et al., 2014; Möhlendick et al., 2013; Neves et al., 2014). Bei der hier angewendeten Adapter-Linker-PCR zur gesamtgenomischen Amplifikation wurde die DNA zu Beginn enzymatisch von Zellproteinen befreit. In einem nächsten Schritt wurde das Genom der Einzelzelle mithilfe des Restriktionsenzyms *Mse*I fragmentiert. An die so entstandenen Fragmente wurden Adapter ligiert, die anschließend eine globale Genomamplifikation ermöglichten. Infolge der PFA-Fixierung wäre es möglich, dass Formaldehyd-Reste die in der WGA verwendeten Enzyme in ihrer Aktivität inhibiert haben. Hierdurch könnten Proteinbestandteile der Zelle nicht komplett durch die Proteinase K verdaut oder die DNA durch *Mse*I nicht ausreichend fragmentiert worden sein. Des Weiteren könnte eine durch das PFA-verursachte Vernetzung der DNA mit Proteinen (Magana-Schwencke and Ekert, 1978; Ross and Shipley, 1980; Wilkins and Macleod, 1976) dazu geführt haben, dass die in der Adapter-Linker-PCR verwendeten Enzyme keinen ausreichenden Zugang mehr zur DNA bekommen haben (Dietrich et al., 2013). Aufgrund dessen könnte es zu einer unzureichenden Fragmentierung und Amplifikation des Einzelzell-Genoms gekommen sein. Weiterhin könnte es infolge der Formalin-Fixierung auch zu Degradierungsprozessen bei der DNA gekommen sein, die ebenfalls eine erfolgreiche Amplifikation verhindern (Ross and Shipley, 1980).

In die aCGH wurden zunächst fünf Einzelzell-Genome aus DLA-Proben eingesetzt, welche in den durchgeführten Kontroll-PCRs eine gute Qualität des WGA-Produkts aufwiesen. Von diesen fünf Proben wurden vier von der Auswertung ausgeschlossen. Da alle Proben von unterschiedlichen Tumorentitäten abstammten, wurden große Unterschiede in den aCGH-Profile erwartet. Hierbei zeigte sich aber ein nahezu identisches aCGH-Profil für alle Proben, so dass davon auszugehen war, dass hier falsch-positive Veränderungen dargestellt wurden. Auffällig war, dass es in GC-reichen Regionen zu Verlusten von Genmaterial kam, wohingegen in AT-reichen Regionen Zugewinne beobachtet wurden. In der aCGH-Analyse können sogenannte GC-Wellen abgebildet werden, wodurch es zu falschen Ergebnissen kommen kann. GC-reiche Regionen werden dann als deletiert und

GC-arme Regionen als amplifiziert dargestellt (Marioni et al., 2007; Vanneste et al., 2009). GC-reiche Regionen stellen bereits bei der Amplifikation des Einzelzell-Genoms ein Problem dar. Denn diese Regionen neigen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, so dass sich eine erfolgreiche Amplifikation GC-reicher Sequenzen als schwierig erweist (Frey et al., 2008; McDowell et al., 1998; Varadaraj and Skinner, 1994). Die fünfte analysierte Probe stammte von einer Mammakarzinom-Patientin. Der Vergleich dieses stark aberranten aCGH-Profils mit bereits publizierten aCGH-Daten lässt erkennen, dass es sich bei den hier gefundenen Veränderungen um für das Mammakarzinom typische CNAs handelt. Die aCGH-Analysen der CTCs aus den Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom lieferten auf den ersten Blick auswertbare Ergebnisse. Deren aCGH-Profile verhielten sich aber im Vergleich zu den CTCs aus der DLA-Probe eher unauffällig und wiesen so gut wie keine chromosomalen Veränderungen auf. Lediglich einige wenige, distinkte Ausschläge waren zu beobachten. Zwar konnte man in zwei Zellen derselben Patientin eine chromosomale Veränderung in *TP53* beobachten, aber weil diese Veränderung gegensätzlich auftrat (T1 = Verlust; T2 = Zugewinn), ist die Interpretation dieses Ergebnisses schwierig. Da in der parallelen Analyse der Blutproben mittels CellSearch® CTCs gefunden wurden, war davon auszugehen, dass mittels adenoviraler Infektion ebenfalls CTCs detektiert worden sind. Darüber hinaus weisen CTCs häufig chromosomale Aberrationen auf (Heitzer et al., 2013; Magbanua et al., 2012, 2013; Neves et al., 2014), so dass in den mittels adenoviraler Detektion isolierten CTCs ein aberrantes aCGH-Profil zu erwarten gewesen wäre. Um bestätigen zu können, dass die aCGH-Analyse generell funktionierte, wurde in einem nächsten Schritt mit einer CTC aus den Blutproben eine sogenannte Geschlechtsfehlpaarung während der aCGH-Analyse durchgeführt. Durch die Verwendung der geschlechtlich gegensätzlichen Kontroll-DNA (in diesem Fall eine männliche Kontroll-DNA), sollte bei einer korrekt ablaufenden aCGH nun für die weibliche Proben-DNA ein Verlust im Y-Chromosom und ein Zugewinn für das X-Chromosom abgebildet werden. Dies konnte in der so analysierten CTC beobachtet werden. Die Werte der $\log_2$-Ratio geben hierbei die logarithmierten Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisse der Fluoreszenzfarben der Probe und der Kontrolle an. Die Kopienzahl kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Kopienanzahländerung} = 2^{\log_2\text{-Ratio}}$$

Hierbei zeigte sich für das X-Chromosom im Mittel eine log_2-Ratio von 0.6 was einer 1.5-fachen Kopienzahl entspricht. Die negative log_2-Ratio des Y-Chromosoms betrug im Mittel -1.5 und entspricht hierbei einer 0.3-fachen Kopienzahl. Für gesamtgenomische Amplifikate und ohne Kenntnis der Zell-Ploidie können diese Werte nur Annäherungen sein, zeigen hier jedoch sehr deutlich, dass die aCGH erfolgreich war. Für die punktuellen und distinkten Veränderungen in den sonst eher unauffälligen aCGH-Profilen von Zellen aus den Blutproben kann es mehrere Erklärungen geben. Diese distinkten Aberrationen, die eine hohe negative log_2-Ratio aufwiesen, bildeten Deletionen ab. Dies kann darauf hindeuten, dass das Genom der Einzelzelle nicht richtig amplifiziert wurde, wodurch es zu einer unzureichenden Bindung an die komplementären Nukleotidsequenzen auf dem Array gekommen sein könnte. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass größere Veränderungen mit einer log_2-Ratio von 0.26 bis 0.4 knapp über der gewählten Nachweisgrenze (log_2-Ratio von 0.25) lagen. Hierdurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den dargestellten Veränderungen um falsch-positive handelt. Somit ist es möglich, dass es sich bei den detektierten Zellen um chromosomal unveränderte Zellen handelt. Mögliche Erklärungen hierfür liefern Daten von Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Erkrankung wie Morbus Crohn, bei denen zirkulierende epitheliale Zellen im Blut nachweisbar waren (Allard et al., 2004; Pantel et al., 2012). Tumoren können durch Ausschüttung verschiedener Cytokine und Chemokine Leukozyten anlocken und so ein entzündliches Tumormikromilieu fördern (Coussens and Werb, 2002). Infolgedessen könnten ebenfalls normale, epitheliale Zellen ins Blut gelangen und falsch-positive Ergebnisse bei der Detektion hervorrufen, da die meisten Detektionssysteme mangels eines spezifischen CTC-Markers auf epithelialen Markern wie EpCAM oder Cytokeratinen beruhen. Eine andere, näherliegende Erklärung könnte die Kontamination der Präparate mit zellfreier DNA von zugrunde gegangenen Leukozyten, insbesondere Neutrophilen sein, welche eine Lebensspanne in der Blutzirkulation von nur wenigen Tagen aufweisen (Pillay et al., 2010). Somit ist es möglich, dass es bei der Proben-Präparation *ex vivo* einschließlich der Infektionszeitspanne zum Absterben von Zellen und der Freisetzung zellulärer DNA kommen kann. Diese DNA verteilt sich im Präparat und kann zusätzlich auch an Tumorzellen gebunden werden (Tamkovich et al., 2008), so dass diese bei der Mikromanipulation der Zielzellen ebenfalls isoliert und amplifiziert wird. Nachweisverfahren wie CellSearch® arbeiten mit milden Fixativen, in die das Blut direkt bei Abnahme verbracht wird (Sieuwerts

et al., 2009), so dass hier die Zellen sofort intakt präserviert werden und daher die Kontaminationsgefahr mit „normaler“, unveränderter DNA geringer ist.

Deutlich unklarer blieb jedoch der Befund, dass ein Großteil der analysierten DLA-Proben keine auswertbaren aCGH-Ergebnisse lieferte. Um der Frage nach einer möglichen, unzureichenden Fragmentierung des Einzelzell-Genoms weiter nachzugehen, wurde eine weitere Fragmentlängen-Analyse der WGA-Produkte aus Blut- und DLA-Proben mittels Bioanalyzer durchgeführt. Als Referenzproben dienten WGA-Produkte, die nicht über das adenovirale System detektiert wurden und gute Ergebnisse in aCGH-Analysen erzielt haben. Im Durchschnitt wiesen die WGA-Produkte der Einzelzell-DNA aus den DLA-Proben deutlich größere Fragmente auf als die Einzelzell-DNA der Blut- und Referenzproben. Die Unterschiede in den Fragmentlängen zwischen den DLA-Proben und den Blut- ($p = 0.0012$) bzw. Referenzproben ($p = 0.0097$) erwiesen sich als signifikant. Dabei wies der Fragmentlängenvergleich zwischen Blut- und Referenzproben keinen statistisch signifikanten Unterschied auf ($p = 0.4545$). Dies bestätigte die Vermutung, dass die Fragmentierung der Einzelzell-DNA aus den DLA-Proben in vielen Fällen gestört war. Was zu den statistisch signifikanten Unterschieden in den Fragmentlängen geführt haben könnte, lässt sich derzeit nicht vollständig beantworten, da im experimentellen Aufbau keine Veränderungen vorgenommen wurden, wodurch eine solche Ungleichheit möglicherweise hätte erklärt werden können. Hierzu müssen in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Aufarbeitung der Einzelzellen nach adenoviraler Detektion gestaltete sich zwar als schwierig, aber dennoch war es möglich, das Genom einer Zelle mittels aCGH abzubilden. Die analysierte Einzelzelle stammte aus einer DLA-Probe einer Patientin mit einem metastasierten Mammakarzinom. Das stark aberrante aCGH-Profil spiegelt den malignen Charakter dieser Zelle wider. Darüber hinaus konnte durch einen grafischen Vergleich der chromosomalen Zugewinne und Verluste mit bereits publizierten aCGH-Daten von Mammakarzinom-Patientinnen gezeigt werden, dass es sich bei den hier vorliegenden Veränderungen um typische CNAs des Mammakarzinoms handelt (Andre et al., 2009).

Bereiche im Genom von Mammakarzinomen, die häufig von chromosomalen Zugewinnen betroffen sind, liegen auf den Chromosomenarmen 1q, 8q, 11q, 13q, 17q, 20q (Han et al., 2010; Staaf et al., 2010) und solche die von Verlusten betroffen sind wurden u. a. auf 1p, 8p, 11q, 16q, und 17p beobachtet (Han et al., 2010; Reis-Filho et al., 2006).

Die Region 8p11-12 ist in etwa 10 - 15 % der Mammakarzinome amplifiziert (Adélaïde et al., 1998; Gelsi-Boyer et al., 2005; Theillet et al., 1993). Eine Untersuchung zeigte sogar die Amplifikation dieser Region in 24 % der untersuchten Brusttumoren (Garcia et al., 2005). Rund 40 % der Tumoren, die eine Amplifikation im *FGFR1*-Lokus (8p11.23) aufweisen, zeigen ebenfalls eine Amplifikation im *CCND1* (Cyclin D1, 11q13.3)-Lokus (Bautista and Theillet, 1998; Cuny et al., 2000). Diese Ko-Amplifikation von *FGFR1* und *CCND1* konnte in der hier analysierten CTC beobachtet werden. Darüber hinaus ist solch eine Ko-Amplifikation dieser beiden Onkogene mit einer Verminderung des Überlebens assoziiert (Cuny et al., 2000). Eine Amplifikation des Gens *CCND1* kann in etwa 15 % der primären Brusttumoren beobachtet werden (Bautista and Theillet, 1998). Einige Arbeiten zeigen, dass es eine Korrelation zwischen der Amplifikation von *CCND1* und der Positivität für den Östrogenrezeptor gibt (Al-Kuraya et al., 2004; Courjal et al., 1997; Seshadri et al., 1996).

Das auf Chromosom 8q24.21 gelegene Onkogen *MYC* zeigte genauso wie *FGFR1* eine Amplifikation. *MYC* ist eines der am häufigsten aktivierten Onkogene und in zahlreichen humanen Tumoren überaktiviert (Bandla et al., 2012; Dang et al., 2006). Als Transkriptionsfaktor nimmt MYC eine entscheidende Rolle im Zellzyklus ein. Bei der Zellproliferation fördert MYC den Zellzyklus u. a. durch die Aktivierung verschiedener Cycline, darunter Cyclin D1 (*CCND1*) (Meyer and Penn, 2008). Damit die Zellen in einem Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden können, ist die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) essentiell (Hillen and Griffioen, 2007). Ohne Neoangiogenese ist das Wachstum eines Tumors limitiert. Baudino et al. konnten nachweisen, dass MYC die Angiogenese in Tumoren fördert (Baudino et al., 2002) und somit auch das Wachstum eines Tumors vorantreiben kann.

Für den Tumorsuppressor und Wachstumsregulator *PTEN* (*phosphatase tensin homolog,* 10q23.3) konnte in der aCGH-Analyse der CTC ein chromosomaler Verlust festgestellt werden. Seine Funktion übt PTEN über eine Herunterregulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signaltransduktionskaskade aus (Goberdhan and Wilson, 2003; Myers et al., 1998). Hier wird durch PTEN die Aktivierung von AKT verhindert. Dies hat zur Folge, dass die Apoptose nicht länger blockiert und die Zellproliferation nicht länger stimuliert wird (Goberdhan and Wilson, 2003; Myers et al., 1998). Die Expression von *PTEN* inhibiert die Zellmotilität und -streuung (Gu et al., 1999; Liliental et al., 2000; Tamura et al., 1998) sowie die Angiogenese (Jiang et al., 2000; Wen et al., 2001; Zhong et al., 2000; Zundel et al., 2000).

Somit kann ein Verlust der *PTEN*-Genfunktion die migratorischen Fähigkeiten einer metastasierenden Zelle verbessern und zu einem verstärkten Tumorwachstum führen.

In der hier analysierten CTC zeigte sich, neben dem chromosomalen Verlust von *PTEN*, auch ein Verlust für *TP53* (17p13.1). Es gibt Hinweise darauf, dass die beiden häufigsten Tumorsuppressorgene *TP53* und *PTEN* miteinander agieren. Der Abbau von P53 wird über den PI3K-Signalweg gesteuert, welcher wiederum durch PTEN reguliert wird (Goberdhan and Wilson, 2003; Mayo and Donner, 2001; Myers et al., 1998). Im Gegenzug fördert P53 die Transkription von *PTEN*, was zu einer positiven Rückkopplungsschleife in der P53-Aktivierung führt (Stambolic et al., 2001). Solch eine verminderte Apoptose-Fähigkeit ist für eine CTC die Voraussetzung, in der Zirkulation zu überleben und sich an einem vom Primärtumor entfernten Ort anzusiedeln. Dies steigert darüber hinaus die Möglichkeit, solcherart genetisch ausgestattete Zellen mithilfe des adenoviralen Detektionssystem zu isolieren.

Die aCGH-Analyse konnte in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* (17q21) und *BRCA2* (13q12.3) chromosomale Verluste aufdecken. Kommt es zu einem Verlust in diesen beiden Genen, können Doppelstrangbrüche der DNA durch BRCA-Proteine nicht mehr repariert werden (Yoshida and Miki, 2004). Hierdurch kann es zum Verlust ganzer Chromosomenstücke oder zu einer Umgestaltung ganzer Chromosomen kommen. Vererbte Mutationen in diesen beiden Genen sorgen für ein erhöhtes Risiko, an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken (Karami and Mehdipour, 2013; Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995).

5.8 Ausblick

Die Detektion und Isolierung von CTCs stellt aufgrund ihrer geringen Anzahl im Blut und fehlender spezifischer Marker nach wie vor eine große Herausforderung dar. Das in dieser Arbeit etablierte adenovirale CTC-Detektionssystem adressiert nun einige der bestehenden Probleme. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das virusbasierte Detektionssystem lebende Zellen auffinden kann und darüber hinaus eine Kultivierung der Zellen ermöglicht. Die derzeitig noch verwendete Fixierung der infizierten Zellen könnte für zukünftige Kultivierungsexperimente entfallen. Die Daten belegen, dass durch die hier verwendeten Viruskonzentrationen die Viabilität der Zellen nicht beeinflusst wurde. Da aber über die Stabilität der CTCs gegenüber einer viralen Infektion wenig bekannt ist, wäre es

erstrebenswert, die für die Infektion verwendeten Viruskonzentrationen zu reduzieren. Um im Gegenzug keinen Verlust bei der Effizienz der Infektion und Nachteil bei der mikroskopischen Detektion der CTCs zu erleiden, wäre der Austausch von GFP gegen das hellere EGFP im viralen Vektor eine Option. Das adenovirale System war in der Lage, ein breites Spektrum an Tumorzelllinien effizient zu infizieren, so dass die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass das virusbasierte System bei vielen epithelialen Tumorerkrankungen zum Einsatz kommen kann. Eine zusätzliche Färbung der DLA- oder Blutproben gegen EpCAM würde Aufschluss darüber geben, ob die mittels adenoviraler Infektion detektierten Zellen eine Subpopulation von CTCs darstellen, die mithilfe des CellSearch®-Systems oder anderer EpCAM-basierter Systeme nicht detektiert werden. Die genetischen Analysen der isolierten Zellen aus den ersten Anwendungen der hier etablierten CTC-Nachweismethode an Patientenproben offenbarten, dass der Versuchsaufbau für solche weiterführenden Analysen nicht optimal ist und in zukünftigen Projekten optimiert werden muss. Der Schwerpunkt muss hierbei auf das Vermeiden von zellfreier DNA sowie auf die derzeit noch angewendete Fixierung der Zellen gelegt werden. Da in weiterführenden Arbeiten die Kultivierung der CTCs zur Untersuchung ihrer funktionellen Eigenschaften etabliert werden soll, werden diese beiden Probleme jedoch nachrangig betrachtet, da reine Tumorzell-Expandate angestrebt werden und bei der Kultivierung auch keine Fixierung mehr angewendet werden kann. Eine Verbesserung der DNA-Qualität der CTCs wird hierbei erwartet, sollte aber dennoch grundlegend überprüft werden.

Ein Ziel in der CTC-Forschung ist der routinemäßige Einsatz der CTCs als sogenannte *liquid biopsy* bei der Auswahl der Therapie und der Beurteilung des Therapieansprechens. Therapieempfehlungen beruhen bislang auf prädiktiven Markern des Primärtumors. Da sich jedoch das Expressionsprofil solcher therapierelevanten Marker zwischen Primärtumoren, gestreuten Zellen und Metastasen unterscheiden kann (Fehm et al., 2009; Stoecklein and Klein, 2010) und vieles darauf hindeutet, dass CTCs die Systemerkrankung besser repräsentieren als die Zellen des Primärtumors (Joosse et al., 2015), wird angenommen, dass sich systemische Therapien verbessern lassen, wenn diese an den Eigenschaften der CTCs ausgerichtet werden. Auch wenn die Nachweissysteme in Zukunft weiter verbessert werden müssen, so gibt es bereits erste Ansätze in die Richtung, dass Therapieentscheidungen auf Grundlage von CTC-Eigenschaften getroffen werden. So wird beispielsweise im Rahmen der sogenannten DETECTIII-Studie an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom die

Eigenschaft der CTCs für die Gabe einer anti-HER2 Therapie herangezogen und nicht die des Primärtumors. Da jedoch mit dem Standardverfahren CellSearch® bei etwa 40 % einer solchen Patientenpopulation keine CTCs nachweisbar sind (Budd et al., 2006; Cristofanilli et al., 2004; Nakamura et al., 2010), kann für eine erhebliche Anzahl von Patienten gar keine Aussage getroffen werden. Das hier etablierte virale Nachweissystem stellt daher in Kombination mit der DLA eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Anzahl der CTC-positiven Patienten zu erhöhen. Darüber hinaus stellen solche EpCAM-unabhängig und vital detektierten CTCs eine potentielle CTC-Subpopulation dar, welche zusätzliche Informationen über die systemische Erkrankung und weitere Therapieoptionen liefern könnte. Als Ergänzung zu den molekularen Untersuchungen der CTCs könnte die Kultivierung der adenoviral detektierten CTCs herangezogen werden. Hier wäre es möglich, eine Therapieempfehlung direkt am Patientenmaterial *in vitro* auszutesten und ihr Ansprechen zu bewerten. Da DLA-Proben konzentrierter an CTCs sind, schafft dieses Verfahren die Grundlage für die Analyse einer größeren Anzahl an CTCs pro Patient. Die Verwendung der DLA-Proben kann somit zu einem zuverlässigeren Bild der systemischen Tumorerkrankung beitragen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Metastasierung ist für die meisten krebsbedingten Todesfälle verantwortlich. Die molekularen Mechanismen der systemischen Tumorerkrankung sind weiterhin noch nicht völlig aufgeklärt. Die Wahl einer Therapie basiert i. d. R. auf den biologischen Eigenschaften des Primärtumors. Die Entscheidung für eine Therapie auf Grundlage der metastatischen Erkrankung kann von größerem Nutzen für den Patienten sein. Im Blut zirkulierende Tumorzellen (CTCs) als Vorläuferzellen der Metastasen sind vergleichsweise leicht zugänglich und damit weniger aufwändig als invasive Gewebebiopsien. Sie können als sogenannte *liquid biopsy* zur Auswahl geeigneterer und personalisierter Therapien beitragen, die möglicherweise eine Metastasierung verhindern oder in einem frühen Stadium bekämpfen. Die Detektion und Isolierung von CTCs stellt trotz bereits etablierter Detektions- und Isolierungsmethoden weiterhin eine große Herausforderung dar. Denn CTCs sind sehr selten und bis heute gibt es keinen spezifischen CTC-Marker. Daher greifen viele bestehende Systeme bei der Detektion und Isolierung der CTCs auf epitheliale Marker wie das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) zurück. Die Expression dieses Proteins kann aber z. B. aufgrund einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) auf CTCs verloren gehen, so dass EpCAM-negative Zellen nicht detektiert werden. Ein weiterer Nachteil der meisten bestehenden CTC-Detektionssysteme ist, dass keine vitalen Zellen identifiziert und isoliert werden können, so dass eine Kultivierung der CTCs zur Untersuchung ihrer funktionellen Eigenschaften nicht möglich ist. Somit bleiben Fragen bezüglich des tumorinitiierenden Potentials und einer möglichen Chemoresistenz der isolierten CTCs unbeantwortet.

Ausgehend von diesen limitierenden Faktoren bestehender CTC-Detektionssysteme wurde in der vorliegenden Arbeit ein EpCAM-unabhängiges Detektionssystem für vitale CTCs etabliert. Hierfür wurden humane Adenoviren verwendet, die einen natürlichen Tropismus für epitheliale Zellen aufweisen. Durch das zur Markierung verwendete GFP konnten ausschließlich lebende Zellen detektiert werden. Von zunächst zwei untersuchten adenoviralen Vektoren (Ad5 und Ad5/3) erwies sich das tropismusmodifizierte Ad5/3-Virus aufgrund einer sehr überzeugenden Infektionseffizienz und mikroskopischer Auswertbarkeit

als ideal. Die epithelspezifische Infektion konnte anhand zahlreicher Experimente belegt werden. In Einbringungsexperimenten mit Tumorzelllinien konnten sehr gute Wiederfindungsraten, vergleichbar mit etablierten CTC-Nachweissystemen, beobachtet werden. Bei der parallelen Analyse von DLA-Proben (DLA = Diagnostische Leukapherese) mittels virusbasiertem Detektionssystem und CellSearch® wurden mehr CTC-positive Proben nach adenoviraler Infektion beobachtet (61.3 % vs. 29 %). Darüber hinaus war in den meisten Fällen die Anzahl der adenoviral detektierten CTCs pro Probe höher als nach Detektion mit dem CellSearch®-System. Lediglich in Proben von Mammakarzinom-Patientinnen war die Detektionsrate mittels CellSearch® höher (DLA (Virus): Mittelwert = 1, $n = 5$; DLA (CellSearch®): Mittelwert = 41, $n = 5$). Ein weiterer Vergleich beider Detektionssysteme mit Blutproben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigte ein vergleichbares Bild (CellSearch® : Mittelwert = 6.8, $n = 5$; Virus: Mittelwert = 2, $n = 5$). Ein Grund für die höhere Detektionsrate von CellSearch® bei Mammakarzinom-Patientinnen kann durch eine mögliche Detektion von apoptotischen Zellen in diesem System erklärt werden. Die genomische Analyse der CTC einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom mittels Array-CGH zeigte tumortypische Kopienzahlveränderungen und bestätigte den malignen Charakter dieser Zelle. Insgesamt erwies sich die genomische Einzelzellanalyse von virusbasiert detektierten Zellen jedoch als schwierig. Dies deutet auf den Optimierungsbedarf des verwendenden Arbeitsablaufs für diese spezielle Anwendung hin. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit der Grundstein für eine alternative, EpCAM-unabhängige CTC-Detektionsmethode gelegt werden, die es ermöglichte, vitale CTCs zu identifizieren und darüber hinaus erlauben sollte, diese extrem seltenen Zellen in Kultur zu expandieren.

7 ABSTRACT

Metastasis causes most cancer related deaths. Molecular mechanisms of the systemic tumor disease are still unresolved. Usually, selection of therapy is based on biological characteristics of the primary tumor. Decision for a therapy based on metastatic disease could be of great use for a patient. Regarded as precursor cells of metastases, circulating tumor cells (CTCs) are more readily accessible than invasive tissue biopsies. As so-called liquid biopsy, CTCs can contribute to selection of more suitable and personalized therapies, which may prevent metastasis or combat it at an early stage. Detection and isolation of CTCs is still quite challenging despite established detection and isolation methods, since CTCs are quite rare and until now no CTC-specific marker exists. Therefore, many existing detection and isolation systems rely on epithelial markers like epithelial adhesion molecule (EpCAM). However, EpCAM is not expressed on every CTC, e. g. due to down regulation during epithelial-mesenchymal transition (EMT). Another drawback of most standard CTC detection systems is that they do not allow isolation of viable cells, hindering their cultivation for functional analysis. Consequently, questions such as testing their tumor-initiating potential and their chemoresistence remain largely unanswered.

Based on these limiting factors of existing CTC detection methods an EpCAM-independent detection system for viable cells was established. This detection system is based on the use of human adenoviruses with natural tropism for epithelial cells. Infected vital cells express subsequently the GFP tag enabling their identification. Hence, only viable cells are detected. Of initially two investigated adenoviral vectors (Ad5 and Ad5/3) the tropism-modified Ad5/3 virus displayed higher infection efficiency and resulted in brighter signal upon microscopic evaluation. The epithelial-specific infection could be validated on the basis of numerous experiments. In spiking experiments the adenoviral detection system revealed an excellent recovery rate similar to established detection systems. In parallel analysis of DLA samples (DLA = diagnostic leukapheresis) by virus-based detection system and CellSearch®, higher CTC detection rates could be observed by use of adenoviral infection (61.3 % vs. 29 %). Furthermore, in most cases the number of adenoviral detected CTCs per

sample was increased compared to the CellSearch® system. Only in samples of breast cancer patients the detection rate was higher by the use of CellSearch® (DLA (virus): mean = 1, *n* = 5; DLA (CellSearch®): mean = 41, *n* = 5). An additional comparison of both detection systems with blood samples of metastatic breast cancer patients resulted in comparable findings (CellSearch® : mean = 6.8, *n* = 5; virus: mean = 2, *n* = 5). The higher detection rate with the use of CellSearch® might result from detection of apoptotic cells compared to the adenoviral detection system. Array CGH analysis of a CTC detected by the adenovirus in a sample from metastatic breast cancer confirmed the malignant origin of that cell. However, single cell genetic analysis of cells detected by the currently used workflow was difficult and indicated that further optimization of the currently workflow will be necessary. However, in the present study foundation was laid for an alternative, EpCAM independent detection method for CTCs, which further may provide the opportunity for more effective CTC cultivation.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adélaïde, J., Chaffanet, M., Imbert, A., Allione, F., Geneix, J., Popovici, C., van Alewijk, D., Trapman, J., Zeillinger, R., Børresen-Dale, A.L., et al. (1998). Chromosome region 8p11-p21: refined mapping and molecular alterations in breast cancer. Genes. Chromosomes Cancer *22*, 186–199.

Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2009). Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res. *11*, R46.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition.

Alix-Panabières, C., and Pantel, K. (2013). Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. Clin. Chem. *59*, 110–118.

Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Köchli, O., et al. (2004). Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. Cancer Res. *64*, 8534–8540.

Allard, W.J., Matera, J., Miller, M.C., Repollet, M., Connelly, M.C., Rao, C., Tibbe, A.G.J., Uhr, J.W., and Terstappen, L.W.M.M. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin. Cancer Res. *10*, 6897–6904.

Anders, M., Vieth, M., Röcken, C., Ebert, M., Pross, M., Gretschel, S., Schlag, P.M., Wiedenmann, B., Kemmner, W., and Höcker, M. (2009). Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. Br. J. Cancer *100*, 352–359.

Andre, F., Job, B., Dessen, P., Tordai, A., Michiels, S., Liedtke, C., Richon, C., Yan, K., Wang, B., Vassal, G., et al. (2009). Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. Clin. Cancer Res. *15*, 441–451.

Armstrong, A.J., Marengo, M.S., Oltean, S., Kemeny, G., Bitting, R.L., Turnbull, J.D., Herold, C.I., Marcom, P.K., George, D.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2011). Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. Mol. Cancer Res. *9*, 997–1007.

Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. Trends Pharmacol. Sci. *33*, 442–448.

Auguste, P., Fallavollita, L., Wang, N., Burnier, J., Bikfalvi, A., and Brodt, P. (2007). The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. Am. J. Pathol. *170*, 1781–1792.

Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., and Litvinov, S. V (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). J. Mol. Med. (Berl). *77*, 699–712.

Bandla, S., Pennathur, A., Luketich, J.D., Beer, D.G., Lin, L., Bass, A.J., Godfrey, T.E., and Litle, V.R. (2012). Comparative genomics of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Ann. Thorac. Surg. *93*, 1101–1106.

Banys, M., Müller, V., Melcher, C., Aktas, B., Kasimir-Bauer, S., Hagenbeck, C., Hartkopf, A., and Fehm, T. (2013). Circulating tumor cells in breast cancer. Clin. Chim. Acta. *423*, 39–45.

Barber, A.G., Castillo-Martin, M., Bonal, D.M., Rybicki, B.A., Christiano, A.M., and Cordon-Cardo, C. (2014). Characterization of desmoglein expression in the normal prostatic gland. Desmoglein 2 is an independent prognostic factor for aggressive prostate cancer. PLoS One *9*, e98786.

Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., and Cleveland, J.L. (2002). c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. Genes Dev. *16*, 2530–2543.

Bautista, S., and Theillet, C. (1998). CCND1 and FGFR1 coamplification results in the colocalization of 11q13 and 8p12 sequences in breast tumor nuclei. Genes. Chromosomes Cancer *22*, 268–277.

Benedict, C. a, Norris, P.S., Prigozy, T.I., Bodmer, J.L., Mahr, J. a, Garnett, C.T., Martinon, F., Tschopp, J., Gooding, L.R., and Ware, C.F. (2001). Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. J. Biol. Chem. *276*, 3270–3278.

Benihoud, K., Yeh, P., and Perricaudet, M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. Curr. Opin. Biotechnol. *10*, 440–447.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science *275*, 1320–1323.

Bessis, N., GarciaCozar, F.J., and Boissier, M.-C. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. Gene Ther. *11 Suppl 1*, S10–S17.

Bidard, F.-C., Mathiot, C., Delaloge, S., Brain, E., Giachetti, S., de Cremoux, P., Marty, M., and Pierga, J.-Y. (2010). Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. Ann. Oncol. *21*, 729–733.

Biedermann, K., Vogelsang, H., Becker, I., Plaschke, S., Siewert, J.R., Höfler, H., and Keller, G. (2005). Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. J. Pathol. *207*, 199–206.

Binder, V., Bartenhagen, C., Okpanyi, V., Gombert, M., Moehlendick, B., Behrens, B., Klein, H.-U., Rieder, H., Ida Krell, P.F., Dugas, M., et al. (2014). A new workflow for whole-genome sequencing of single human cells. Hum. Mutat. *35*, 1260–1270.

De Boer, M., van Deurzen, C.H.M., van Dijck, J.A.A.M., Borm, G.F., van Diest, P.J., Adang, E.M.M., Nortier, J.W.R., Rutgers, E.J.T., Seynaeve, C., Menke-Pluymers, M.B.E., et al. (2009). Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. N. Engl. J. Med. *361*, 653–663.

Bohrer, M.P., Deen, W.M., Robertson, C.R., Troy, J.L., and Brenner, B.M. (1979). Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall. J. Gen. Physiol. *74*, 583–593.

De Bono, J.S., Scher, H.I., Montgomery, R.B., Parker, C., Miller, M.C., Tissing, H., Doyle, G. V, Terstappen, L.W.W.M., Pienta, K.J., and Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin. Cancer Res. *14*, 6302–6309.

Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. *49*, 4682–4689.

Botteri, E., Sandri, M.T., Bagnardi, V., Munzone, E., Zorzino, L., Rotmensz, N., Casadio, C., Cassatella, M.C., Esposito, A., Curigliano, G., et al. (2010). Modeling the relationship between circulating tumour cells number and prognosis of metastatic breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *122*, 211–217.

Boynton, R.F., Blount, P.L., Yin, J., Brown, V.L., Huang, Y., Tong, Y., McDaniel, T., Newkirk, C., Resau, J.H., Raskind, W.H., et al. (1992). Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 3385–3388.

Bøyum, A. (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. *Suppl 5*, 9–15.

Bøyum, A., Løvhaug, D., Tresland, L., and Nordlie, E.M. (1991). Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. Scand. J. Immunol. *34*, 697–712.

Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., and Pantel, K. (2000). Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. J. Clin. Oncol. *18*, 80–86.

Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., et al. (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N. Engl. J. Med. *353*, 793–802.

Bretones, G., Delgado, M.D., and León, J. (2015). Myc and cell cycle control. Biochim. Biophys. Acta *1849*, 506–516.

Broustas, C.G., and Lieberman, H.B. (2014). DNA damage response genes and the development of cancer metastasis. Radiat. Res. *181*, 111–130.

Brown, C.J., Cheok, C.F., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2011). Reactivation of p53: from peptides to small molecules. Trends Pharmacol. Sci. *32*, 53–62.

Brown, M., and Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin. Chem. *46*, 1221–1229.

Brüning, A., and Runnebaum, I.B. (2003). CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta. Gene Ther. *10*, 198–205.

Budd, G.T., Cristofanilli, M., Ellis, M.J., Stopeck, A., Borden, E., Miller, M.C., Matera, J., Repollet, M., Doyle, G. V, Terstappen, L.W.M.M., et al. (2006). Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. Clin. Cancer Res. *12*, 6403–6409.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Nat. Rev. Drug Discov. *10*, 417–427.

Carnes, A.E., Hodgson, C.P., and Williams, J.A. (2006). Inducible Escherichia coli fermentation for increased plasmid DNA production. Biotechnol. Appl. Biochem. *45*, 155–166.

Cayrefourcq, L., Mazard, T., Joosse, S., Solassol, J., Ramos, J., Assenat, E., Schumacher, U., Costes, V., Maudelonde, T., Pantel, K., et al. (2015). Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. Cancer Res. *75*, 892–901.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. Science *331*, 1559–1564.

Chao, Y.L., Shepard, C.R., and Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. Mol. Cancer *9*, 179.

Chen, X., Zehnbauer, B., Gnirke, A., and Kwok, P.Y. (1997). Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 10756–10761.

Chen, Z., Wang, Q., Sun, J., Gu, A., Jin, M., Shen, Z., Qiu, Z., Wang, J., Wang, X., Zhan, Z., et al. (2013). Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human lung cancers. Tumour Biol. *34*, 17–24.

Chu, Y.-S., Eder, O., Thomas, W.A., Simcha, I., Pincet, F., Ben-Ze'ev, A., Perez, E., Thiery, J.P., and Dufour, S. (2006). Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains. J. Biol. Chem. *281*, 2901–2910.

Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., and Bergelson, J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 15191–15196.

Cohen, S.J., Punt, C.J.A., Iannotti, N., Saidman, B.H., Sabbath, K.D., Gabrail, N.Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M.C., et al. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. *26*, 3213–3221.

Cohen, S.J., Punt, C.J.A., Iannotti, N., Saidman, B.H., Sabbath, K.D., Gabrail, N.Y., Picus, J., Morse, M.A., Mitchell, E., Miller, M.C., et al. (2009). Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. Ann. Oncol. *20*, 1223–1229.

Courjal, F., Cuny, M., Simony-Lafontaine, J., Louason, G., Speiser, P., Zeillinger, R., Rodriguez, C., and Theillet, C. (1997). Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. Cancer Res. *57*, 4360–4367.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860–867.

Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G. V, Allard, W.J., Terstappen, L.W.M.M., et al. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N. Engl. J. Med. *351*, 781–791.

Cristofanilli, M., Hayes, D.F., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Reuben, J.M., Doyle, G. V, Matera, J., Allard, W.J., Miller, M.C., et al. (2005). Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J. Clin. Oncol. *23*, 1420–1430.

Cuny, M., Kramar, A., Courjal, F., Johannsdottir, V., Iacopetta, B., Fontaine, H., Grenier, J., Culine, S., and Theillet, C. (2000). Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. Cancer Res. *60*, 1077–1083.

Cupelli, K., and Stehle, T. (2011). Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. Curr. Opin. Virol. *1*, 84–91.

Dallas, N.A., Xia, L., Fan, F., Gray, M.J., Gaur, P., van Buren, G., Samuel, S., Kim, M.P., Lim, S.J., and Ellis, L.M. (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. Cancer Res. *69*, 1951–1957.

Dang, C. V, O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. Semin. Cancer Biol. *16*, 253–264.

Danila, D.C., Pantel, K., Fleisher, M., and Scher, H.I. (2011). Circulating tumors cells as biomarkers: progress toward biomarker qualification. Cancer J. *17*, 438–450.

Dearnaley, D.P., Sloane, J.P., Ormerod, M.G., Steele, K., Coombes, R.C., Clink, H.M., Powles, T.J., Ford, H.T., Gazet, J.C., and Neville, A.M. (1981). Increased detection of mammary

carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. Br. J. Cancer *44*, 85–90.

Deming, S.L., Nass, S.J., Dickson, R.B., and Trock, B.J. (2000). C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. Br. J. Cancer *83*, 1688–1695.

Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E.E., Jung, M., Meller, S., and Kristiansen, G. (2013). Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. PLoS One *8*, e77771.

Dong, Y., Skelley, A.M., Merdek, K.D., Sprott, K.M., Jiang, C., Pierceall, W.E., Lin, J., Stocum, M., Carney, W.P., and Smirnov, D.A. (2013). Microfluidics and circulating tumor cells. J. Mol. Diagn. *15*, 149–157.

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *3*, 11–22.

Driemel, C., Kremling, H., Schumacher, S., Will, D., Wolters, J., Lindenlauf, N., Mack, B., Baldus, S.A., Hoya, V., Pietsch, J.M., et al. (2014). Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. Oncogene *33*, 4904–4915.

Egan, K., Cooke, N., and Kenny, D. (2014). Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage. Clin. Exp. Metastasis *31*, 697–704.

Eifler, R.L., Lind, J., Falkenhagen, D., Weber, V., Fischer, M.B., and Zeillinger, R. (2011). Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept. Cytometry B. Clin. Cytom. *80*, 100–111.

Ellis, W.J., Pfitzenmaier, J., Colli, J., Arfman, E., Lange, P.H., and Vessella, R.L. (2003). Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. Urology *61*, 277–281.

Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. J. Natl. Cancer Inst. *92*, 564–569.

Evnin, L.B., Vásquez, J.R., and Craik, C.S. (1990). Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 6659–6663.

Fang, W.-K., Gu, W., Liao, L.-D., Chen, B., Wu, Z.-Y., Wu, J.-Y., Shen, J., Xu, L.-Y., and Li, E.-M. (2014). Prognostic significance of desmoglein 2 and desmoglein 3 in esophageal squamous cell carcinoma. Asian Pac. J. Cancer Prev. *15*, 871–876.

Fare, T.L., Coffey, E.M., Dai, H., He, Y.D., Kessler, D.A., Kilian, K.A., Koch, J.E., Leproust, E., Marton, M.J., Meyer, M.R., et al. (2003). Effects of Atmospheric Ozone on Microarray Data Quality. *75*, 4672–4675.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell *61*, 759–767.

Fehm, T., Becker, S., Becker-Pergola, G., Sotlar, K., Gebauer, G., Dürr-Störzer, S., Neubauer, H., Wallwiener, D., and Solomayer, E.-F. (2006). Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer. Breast Cancer Res. *8*, R60.

Fehm, T., Hoffmann, O., Aktas, B., Becker, S., Solomayer, E.F., Wallwiener, D., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2009). Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. Breast Cancer Res. *11*, R59.

Fehm, T., Müller, V., Aktas, B., Janni, W., Schneeweiss, A., Stickeler, E., Lattrich, C., Löhberg, C.R., Solomayer, E., Rack, B., et al. (2010). HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. Breast Cancer Res. Treat. *124*, 403–412.

Feki, A., and Irminger-Finger, I. (2004). Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *52*, 103–116.

Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur. J. Cancer *46*, 765–781.

Fernández-Medarde, A., and Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. Genes Cancer *2*, 344–358.

Fischer, J.C., Niederacher, D., Topp, S.A., Honisch, E., Schumacher, S., Schmitz, N., Zacarias Föhrding, L., Vay, C., Hoffmann, I., Kasprowicz, N.S., et al. (2013). Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 16580–16585.

Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A., and Kallioniemi, O.P. (1997). Genome screening by comparative genomic hybridization. Trends Genet. *13*, 405–409.

Franken, B., de Groot, M.R., Mastboom, W.J., Vermes, I., van der Palen, J., Tibbe, A.G., and Terstappen, L.W. (2012). Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. Breast Cancer Res. *14*, R133.

Frey, U.H., Bachmann, H.S., Peters, J., and Siffert, W. (2008). PCR-amplification of GC-rich regions: “slowdown PCR”. Nat. Protoc. *3*, 1312–1317.

Gaforio, J.-J., Serrano, M.-J., Sanchez-Rovira, P., Sirvent, A., Delgado-Rodriguez, M., Campos, M., de la Torre, N., Algarra, I., Dueñas, R., and Lozano, A. (2003). Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. Int. J. Cancer *107*, 984–990.

Gamucci, O., Bertero, A., Malvindi, M.A., Sabella, S., Pompa, P.P., Mazzolai, B., and Bardi, G. (2014). Detection of fluorescent nanoparticle interactions with primary immune cell subpopulations by flow cytometry. J. Vis. Exp. e51345.

Gao, C., Furge, K., Koeman, J., Dykema, K., Su, Y., Cutler, M. Lou, Werts, A., Haak, P., and Vande Woude, G.F. (2007). Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 8995–9000.

Garcia, M.J., Pole, J.C.M., Chin, S.-F., Teschendorff, A., Naderi, A., Ozdag, H., Vias, M., Kranjac, T., Subkhankulova, T., Paish, C., et al. (2005). A 1 Mb minimal amplicon at 8p11-12 in breast cancer identifies new candidate oncogenes. Oncogene *24*, 5235–5245.

Geigl, J.B., Obenauf, A.C., Schwarzbraun, T., and Speicher, M.R. (2008). Defining "chromosomal instability". Trends Genet. *24*, 64–69.

Gelsi-Boyer, V., Orsetti, B., Cervera, N., Finetti, P., Sircoulomb, F., Rougé, C., Lasorsa, L., Letessier, A., Ginestier, C., Monville, F., et al. (2005). Comprehensive profiling of 8p11-12 amplification in breast cancer. Mol. Cancer Res. *3*, 655–667.

Giaretti, W., Monaco, R., Pujic, N., Rapallo, A., Nigro, S., and Geido, E. (1996). Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. Am. J. Pathol. *149*, 237–245.

Giordano, A., Gao, H., Anfossi, S., Cohen, E., Mego, M., Lee, B.-N., Tin, S., De Laurentiis, M., Parker, C.A., Alvarez, R.H., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. Mol. Cancer Ther. *11*, 2526–2534.

Gires, O., and Stoecklein, N.H. (2014). Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 4393–4402.

Goberdhan, D.C.I., and Wilson, C. (2003). PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. Hum. Mol. Genet. *12 Spec No*, R239–R248.

Gorges, T.M., Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, T.M., Krahn, T., and von Ahsen, O. (2012). Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC Cancer *12*, 178.

Goss, K.H., and Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. J. Clin. Oncol. *18*, 1967–1979.

Gradilone, A., Raimondi, C., Nicolazzo, C., Petracca, A., Gandini, O., Vincenzi, B., Naso, G., Aglianò, A.M., Cortesi, E., and Gazzaniga, P. (2011). Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal. J. Cell. Mol. Med. *15*, 1066–1070.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. *36*, 59–74.

Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C.C. (1994). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesist. 4855–4878.

Greene, B.T., Hughes, A.D., and King, M.R. (2012). Circulating tumor cells: the substrate of personalized medicine? Front. Oncol. *2*, 69.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature *446*, 153–158.

Groblewska, M., Siewko, M., Mroczko, B., and Szmitkowski, M. (2012). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. Folia Histochem. Cytobiol. *50*, 12–19.

Gu, J., Tamura, M., Pankov, R., Danen, E.H., Takino, T., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (1999). Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. J. Cell Biol. *146*, 389–403.

Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 816–826.

Gupta, G.P., and Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. Cell *127*, 679–695.

Gustavsson, B., Carlsson, G., Machover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H.-J., Tveit, K.-M., and Gibson, F. (2015). A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. Clin. Colorectal Cancer *14*, 1–10.

Hammoud, S.S., Cairns, B.R., and Jones, D.A. (2013). Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 177–183.

Han, S., Park, K., Shin, E., Kim, H.-J., Kim, J.Y., Kim, J.Y., and Gwak, G. (2010). Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. Oncol. Rep. *24*, 121–128.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Haraksingh, R.R., Abyzov, A., Gerstein, M., Urban, A.E., and Snyder, M. (2011). Genome-wide mapping of copy number variation in humans: comparative analysis of high resolution array platforms. PLoS One *6*, e27859.

Harb, W., Fan, A., Tran, T., Danila, D.C., Keys, D., Schwartz, M., and Ionescu-Zanetti, C. (2013). Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. Transl. Oncol. *6*, 528–538.

Hartkopf, A.D., Banys, M., Krawczyk, N., Staebler, A., Becker, S., Hoffmann, J., Hahn, M., Wallwiener, M., and Fehm, T. (2012). Bone marrow versus sentinel lymph node involvement in breast cancer: a comparison of early hematogenous and early lymphatic tumor spread. Breast Cancer Res. Treat. *131*, 501–508.

Hartkopf, A.D., Wallwiener, M., Hahn, M., Fehm, T.N., Brucker, S.Y., and Taran, F.-A. (2015). Simultaneous Detection of Disseminated and Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer Patients. Cancer Res. Treat.

Hay, E.D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. Dev. Dyn. *233*, 706–720.

Hayes, D.F., Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Miller, M.C., Matera, J., Allard, W.J., Doyle, G. V, and Terstappen, L.W.W.M. (2006). Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. Clin. Cancer Res. *12*, 4218–4224.

He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 2509–2514.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Res. *6*, 986–994.

Heitzer, E., Auer, M., Gasch, C., Pichler, M., Ulz, P., Hoffmann, E.M., Lax, S., Waldispuehl-Geigl, J., Mauermann, O., Lackner, C., et al. (2013). Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. Cancer Res. *73*, 2965–2975.

Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., and Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *76*, 1438–1442.

Hess, K.R., Varadhachary, G.R., Taylor, S.H., Wei, W., Raber, M.N., Lenzi, R., and Abbruzzese, J.L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. Cancer *106*, 1624–1633.

Hillen, F., and Griffioen, A.W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. Cancer Metastasis Rev. *26*, 489–502.

Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J.M., Senior, R.M., and Shibuya, M. (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. Cancer Cell *2*, 289–300.

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., and Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. Nat. Cell Biol. *8*, 1369–1375.

Hiyoshi, M., and Hosoi, S. (1994). Assay of DNA denaturation by polymerase chain reaction-driven fluorescent label incorporation and fluorescence resonance energy transfer. Anal. Biochem. *221*, 306–311.

Hoeppener, A.E.L.M., Swennenhuis, J.F., and Terstappen, L.W.M.M. (2012). Immunomagnetic separation technologies. Recent Results Cancer Res. *195*, 43–58.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 7276–7280.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørlie, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R., and Harris, C.C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res. *22*, 3551–3555.

Hosch, S.B., Knoefel, W.T., Metz, S., Stoecklein, N., Niendorf, A., Broelsch, C.E., and Izbicki, J.R. (1997). Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. Pancreas *15*, 154–159.

Hou, J.-M., Greystoke, A., Lancashire, L., Cummings, J., Ward, T., Board, R., Amir, E., Hughes, S., Krebs, M., Hughes, A., et al. (2009). Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. Am. J. Pathol. *175*, 808–816.

Hussain, S.P., and Harris, C.C. (2006). P53 Biological Network: At the Crossroads of the Cellular-Stress Response Pathway and Molecular Carcinogenesis. J. Nippon Med. Sch. *73*, 54–64.

Ibrahim, T., Leong, I., Sanchez-Sweatman, O., Khokha, R., Sodek, J., Tenenbaum, H.C., Ganss, B., and Cheifetz, S. (2000). Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases. Clin. Exp. Metastasis *18*, 253–260.

Ignatiadis, M., and Reinholz, M. (2011). Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. Breast Cancer Res. *13*, 222.

Inagaki, J., Rodriguez, V., and Bodey, G.P. (1974). Proceedings: Causes of death in cancer patients. Cancer *33*, 568–573.

Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D., and Kleinman, H.K. (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. Cancer Res. *59*, 4453–4457.

Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Aoki, M., and Vogt, P.K. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 1749–1753.

Joosse, S.A., Gorges, T.M., and Pantel, K. (2015). Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO Mol. Med. *7*, 1–11.

Jordà, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A., and Fabra, A. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. J. Cell Sci. *118*, 3371–3385.

Kallergi, G., Papadaki, M.A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulias, V., and Agelaki, S. (2011). Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res. *13*, R59.

Kallergi, G., Konstantinidis, G., Markomanolaki, H., Papadaki, M.A., Mavroudis, D., Stournaras, C., Georgoulias, V., and Agelaki, S. (2013). Apoptotic Circulating Tumor Cells in Early and Metastatic Breast Cancer Patients. Mol. Cancer Ther. *12*, 1886–1895.

Kallioniemi, A. (2008). CGH microarrays and cancer. Curr. Opin. Biotechnol. *19*, 36–40.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest. *119*, 1420–1428.

Kanerva, A., Mikheeva, G. V, Krasnykh, V., Coolidge, C.J., Lam, J.T., Mahasreshti, P.J., Barker, S.D., Straughn, M., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., et al. (2002a). Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. Clin. Cancer Res. *8*, 275–280.

Kanerva, A., Wang, M., Bauerschmitz, G.J., Lam, J.T., Desmond, R.A., Bhoola, S.M., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., Siegal, G.P., Curiel, D.T., et al. (2002b). Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. Mol. Ther. *5*, 695–704.

Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. Nature *438*, 820–827.

Karami, F., and Mehdipour, P. (2013). A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. Biomed Res. Int. *2013*, 928562.

Karhade, M., Hall, C., Mishra, P., Anderson, A., Kuerer, H., Bedrosian, I., Krishnamurthy, S., and Lucci, A. (2014). Circulating tumor cells in non-metastatic triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *147*, 325–333.

Kawakami, Y., Li, H., Lam, J.T., Krasnykh, V., Curiel, D.T., and Blackwell, J.L. (2003). Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. Cancer Res. *63*, 1262–1269.

Khoja, L., Backen, A., Sloane, R., Menasce, L., Ryder, D., Krebs, M., Board, R., Clack, G., Hughes, A., Blackhall, F., et al. (2012). A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. Br. J. Cancer *106*, 508–516.

Kim, M.-Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D.X., Zhang, X.H.-F., Norton, L., and Massagué, J. (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. Cell *139*, 1315–1326.

Kim, Y.J., Borsig, L., Varki, N.M., and Varki, A. (1998). P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 9325–9330.

Klastersky, J., Daneau, D., and Verhest, A. (1972). Causes of death in patients with cancer. Eur. J. Cancer *8*, 149–154.

Klein, C.A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J.A., Pantel, K., Speicher, M.R., and Riethmüller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 4494–4499.

Klein, C.A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. Nat. Rev. Cancer *9*, 302–312.

Knijnenburg, J., van der Burg, M., Tanke, H.J., and Szuhai, K. (2007). Optimized amplification and fluorescent labeling of small cell samples for genomic array-CGH. Cytometry. A *71*, 585–591.

Kojima, T., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Kagawa, S., Uno, F., Kuroda, S., Tazawa, H., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., et al. (2009). A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. J. Clin. Invest. *119*, 3172–3181.

Korinek, V. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a beta -Catenin-Tcf Complex in APC-/- Colon Carcinoma. Science (80-.). *275*, 1784–1787.

Korn, W.M., Macal, M., Christian, C., Lacher, M.D., McMillan, A., Rauen, K.A., Warren, R.S., and Ferrell, L. (2006). Expression of the coxsackievirus- and adenovirus receptor in gastrointestinal cancer correlates with tumor differentiation. Cancer Gene Ther. *13*, 792–797.

Kovesdi, I., and Hedley, S.J. (2010). Adenoviral producer cells. Viruses *2*, 1681–1703.

Kraan, J., Sleijfer, S., Strijbos, M.H., Ignatiadis, M., Peeters, D., Pierga, J.-Y., Farace, F., Riethdorf, S., Fehm, T., Zorzino, L., et al. (2011). External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch(®) system: a feasibility study. Cytometry B. Clin. Cytom. *80*, 112–118.

Krebs, M.G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J.-M., Greystoke, A., Ward, T.H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G., et al. (2011). Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. *29*, 1556–1563.

Kubuschok, B., Passlick, B., Izbicki, J.R., Thetter, O., and Pantel, K. (1999). Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. *17*, 19–24.

Kurzen, H., Münzing, I., and Hartschuh, W. (2003). Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. J. Cutan. Pathol. *30*, 621–630.

Lacher, M.D., Tiirikainen, M.I., Saunier, E.F., Christian, C., Anders, M., Oft, M., Balmain, A., Akhurst, R.J., and Korn, W.M. (2006). Transforming growth factor-beta receptor inhibition enhances adenoviral infectability of carcinoma cells via up-regulation of Coxsackie and Adenovirus Receptor in conjunction with reversal of epithelial-mesenchymal transition. Cancer Res. *66*, 1648–1657.

Lacher, M.D., Shiina, M., Chang, P., Keller, D., Tiirikainen, M.I., and Korn, W.M. (2011). ZEB1 limits adenoviral infectability by transcriptionally repressing the coxsackie virus and adenovirus receptor. Mol. Cancer *10*, 91.

Larson, C.J., Moreno, J.G., Pienta, K.J., Gross, S., Repollet, M., O'hara, S.M., Russell, T., and Terstappen, L.W.M.M. (2004). Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. Cytometry. A *62*, 46–53.

Lee, L.G., Connell, C.R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res. *21*, 3761–3766.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. Nature *386*, 623–627.

Lianidou, E.S., Mavroudis, D., and Georgoulias, V. (2013). Clinical challenges in the molecular characterization of circulating tumour cells in breast cancer. Br. J. Cancer *108*, 2426–2432.

Liao, D.J., and Dickson, R.B. (2000). c-Myc in breast cancer. Endocr. Relat. Cancer *7*, 143–164.

Liliental, J., Moon, S.Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., and Wu, H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. Curr. Biol. *10*, 401–404.

Lisiansky, V., Naumov, I., Shapira, S., Kazanov, D., Starr, A., Arber, N., and Kraus, S. (2012). Gene therapy of pancreatic cancer targeting the K-Ras oncogene. Cancer Gene Ther. *19*, 862–869.

Liu, Q., and Muruve, D.A. (2003). Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. Gene Ther. *10*, 935–940.

Liu, Y., Liu, Q., Wang, T., Bian, L., Zhang, S., Hu, H., Li, S., Hu, Z., and Wu, S. (2013). Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients : a valuable prognostic and predictive biomarker. BMC Cancer *13*.

Liu, Z., Fusi, A., Klopocki, E., Schmittel, A., Tinhofer, I., Nonnenmacher, A., and Keilholz, U. (2011). Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. J. Transl. Med. *9*, 70.

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. *4*, 357–362.

Loberg, R.D., Bradley, D.A., Tomlins, S.A., Chinnaiyan, A.M., and Pienta, K.J. (2007). The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. CA. Cancer J. Clin. *57*, 225–241.

Loeb, K.R., and Loeb, L.A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. Carcinogenesis *21*, 379–385.

Loh, J., Jovanovic, L., Lehman, M., Capp, A., Pryor, D., Harris, M., Nelson, C., and Martin, J. (2014). Circulating tumor cell detection in high-risk non-metastatic prostate cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *140*, 2157–2162.

Luca, A.C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.-L., Baldus, S.E., Huckenbeck, W., Piekorz, R.P., Knoefel, W.T., et al. (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. PLoS One *8*, e59689.

Lucci, A., Hall, C.S., Lodhi, A.K., Bhattacharyya, A., Anderson, A.E., Xiao, L., Bedrosian, I., Kuerer, H.M., and Krishnamurthy, S. (2012). Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. Lancet. Oncol. *13*, 688–695.

Lyons, M., Onion, D., Green, N.K., Aslan, K., Rajaratnam, R., Bazan-Peregrino, M., Phipps, S., Hale, S., Mautner, V., Seymour, L.W., et al. (2006). Adenovirus type 5 interactions with human blood cells may compromise systemic delivery. Mol. Ther. *14*, 118–128.

Macintosh, C.A., Stower, M., Reid, N., and Maitland, N.J. (1998). Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. Cancer Res. *58*, 23–28.

Madjd, Z., Durrant, L.G., Pinder, S.E., Ellis, I.O., Ronan, J., Lewis, S., Rushmere, N.K., and Spendlove, I. (2005). Do poor-prognosis breast tumours express membrane cofactor proteins (CD46)? Cancer Immunol. Immunother. *54*, 149–156.

Magana-Schwencke, N., and Ekert, B. (1978). Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde. II. Induction of cross-links between DNA and protein. Mutat. Res. *51*, 11–19.

Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., et al. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. Nat. Cell Biol. *11*, 162–171.

Magbanua, M.J.M., Sosa, E. V, Scott, J.H., Simko, J., Collins, C., Pinkel, D., Ryan, C.J., and Park, J.W. (2012). Isolation and genomic analysis of circulating tumor cells from castration resistant metastatic prostate cancer. BMC Cancer *12*, 78.

Magbanua, M.J.M., Sosa, E. V, Roy, R., Eisenbud, L.E., Scott, J.H., Olshen, A., Pinkel, D., Rugo, H.S., and Park, J.W. (2013). Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. Cancer Res. *73*, 30–40.

Maida, Y., Kyo, S., Sakaguchi, J., Mizumoto, Y., Hashimoto, M., Mori, N., Ikoma, T., Nakamura, M., Takakura, M., Urata, Y., et al. (2009). Diagnostic potential and limitation of

imaging cancer cells in cytological samples using telomerase-specific replicative adenovirus. Int. J. Oncol. *34*, 1549–1556.

Maniloff, J., and Morowitz, H.J. (1972). Cell biology of the mycoplasmas. Bacteriol. Rev. *36*, 263–290.

Mansi, J.L., Berger, U., Easton, D., McDonnell, T., Redding, W.H., Gazet, J.C., McKinna, A., Powles, T.J., and Coombes, R.C. (1987). Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed). *295*, 1093–1096.

Marioni, J.C., Thorne, N.P., Valsesia, A., Fitzgerald, T., Redon, R., Fiegler, H., Andrews, T.D., Stranger, B.E., Lynch, A.G., Dermitzakis, E.T., et al. (2007). Breaking the waves: improved detection of copy number variation from microarray-based comparative genomic hybridization. Genome Biol. *8*, R228.

Markiewicz, A., Książkiewicz, M., Wełnicka-Jaśkiewicz, M., Seroczyńska, B., Skokowski, J., Szade, J., and Żaczek, A.J. (2014). Mesenchymal Phenotype of CTC-Enriched Blood Fraction and Lymph Node Metastasis Formation Potential. PLoS One *9*, e93901.

Marrinucci, D., Bethel, K., Bruce, R.H., Curry, D.N., Hsieh, B., Humphrey, M., Krivacic, R.T., Kroener, J., Kroener, L., Ladanyi, A., et al. (2007). Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells. Hum. Pathol. *38*, 514–519.

Martin, T.A., Watkins, G., and Jiang, W.G. (2005). The Coxsackie-adenovirus receptor has elevated expression in human breast cancer. Clin. Exp. Med. *5*, 122–128.

Mathis, J.M., Stewart, P.L., Zhu, Z.B., and Curiel, D.T. (2006). Advanced generation adenoviral virotherapy agents embody enhanced potency based upon CAR-independent tropism. Clin. Cancer Res. *12*, 2651–2656.

Matsumoto, K., Shariat, S.F., Ayala, G.E., Rauen, K.A., and Lerner, S.P. (2005). Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. Urology *66*, 441–446.

Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 11598–11603.

McDowell, D.G., Burns, N.A., and Parkes, H.C. (1998). Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. Nucleic Acids Res. *26*, 3340–3347.

Meyer, N., and Penn, L.Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. Nat. Rev. Cancer *8*, 976–990.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., and Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science *266*, 66–71.

Miller, M.C., Doyle, G. V, and Terstappen, L.W.M.M. (2010). Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. J. Oncol. *2010*, 617421.

Mitry, E., Fields, A.L.A., Bleiberg, H., Labianca, R., Portier, G., Tu, D., Nitti, D., Torri, V., Elias, D., O'Callaghan, C., et al. (2008). Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. J. Clin. Oncol. *26*, 4906–4911.

Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y., and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. Br. J. Cancer *90*, 1265–1273.

Möhlendick, B., Bartenhagen, C., Behrens, B., Honisch, E., Raba, K., Knoefel, W.T., and Stoecklein, N.H. (2013). A robust method to analyze copy number alterations of less than 100 kb in single cells using oligonucleotide array CGH. PLoS One *8*, e67031.

Mohamed, H., Murray, M., Turner, J.N., and Caggana, M. (2009). Isolation of tumor cells using size and deformation. J. Chromatogr. A *1216*, 8289–8295.

Molloy, T.J., Bosma, a J., and van't Veer, L.J. (2008). Towards an optimized platform for the detection, enrichment, and semi-quantitation circulating tumor cells. Breast Cancer Res. Treat. *112*, 297–307.

Mommers, E.C., van Diest, P.J., Leonhart, A.M., Meijer, C.J., and Baak, J.P. (1999). Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. Breast Cancer Res. Treat. *58*, 163–169.

Moreno, J.G., Miller, M.C., Gross, S., Allard, W.J., Gomella, L.G., and Terstappen, L.W.M.M. (2005). Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. Urology *65*, 713–718.

Morgan, T.M., Lange, P.H., and Vessella, R.L. (2007). Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells. Front. Biosci. *12*, 3000–3009.

Morton, P.E., Hicks, A., Nastos, T., Santis, G., and Parsons, M. (2013). CAR regulates epithelial cell junction stability through control of E-cadherin trafficking. Sci. Rep. *3*, 2889.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods *65*, 55–63.

Moss, T.J. (1999). Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignancies. Cancer Metastasis Rev. *18*, 91–100.

Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Goetz, A., Ja, F., and Pantel, K. (2005). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer : Correlation to Bone Marrow Micrometastases , Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity umor Cells in Breast Cancer : Correlation to Bone Marrow Micrometastases , Heterogeneous Resp. 3678–3685.

Muller, P. a J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). P53 and Its Mutants in Tumor Cell Migration and Invasion. J. Cell Biol. *192*, 209–218.

Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 3046–3050.

Muruve, D.A., Barnes, M.J., Stillman, I.E., and Libermann, T.A. (1999). Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. Hum. Gene Ther. *10*, 965–976.

Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 13513–13518.

Nagrath, S., Sequist, L. V, Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M.R., Kwak, E.L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., et al. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature *450*, 1235–1239.

Nakamura, S., Yagata, H., Ohno, S., Yamaguchi, H., Iwata, H., Tsunoda, N., Ito, Y., Tokudome, N., Toi, M., Kuroi, K., et al. (2010). Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. Breast Cancer *17*, 199–204.

Naoe, M., Ogawa, Y., Morita, J., Omori, K., Takeshita, K., Shichijyo, T., Okumura, T., Igarashi, A., Yanaihara, A., Iwamoto, S., et al. (2007). Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. Cancer *109*, 1439–1445.

Nash, G.M., Gimbel, M., Cohen, A.M., Zeng, Z.-S., Ndubuisi, M.I., Nathanson, D.R., Ott, J., Barany, F., and Paty, P.B. (2010). KRAS mutation and microsatellite instability: two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer. Ann. Surg. Oncol. *17*, 416–424.

Neumann, J., Zeindl-Eberhart, E., Kirchner, T., and Jung, A. (2009). Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. Pathol. Res. Pract. *205*, 858–862.

Neves, R.P.L., Raba, K., Schmidt, O., Honisch, E., Meier-Stiegen, F., Behrens, B., Möhlendick, B., Fehm, T., Neubauer, H., Klein, C.A., et al. (2014). Genomic high-resolution profiling of single CKpos/CD45neg flow-sorting purified circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer. Clin. Chem. *60*, 1290–1297.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat. Rev. Cancer *9*, 274–284.

Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., and Männel, D.N. (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. Cancer Res. *59*, 1295–1300.

Nims, R.W., Sykes, G., Cottrill, K., Ikonomi, P., and Elmore, E. (2010). Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. *46*, 811–819.

Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.C., Bergelson, J.M., Zhou, J., and Hsieh, J.T. (2000). The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. Cancer Res. *60*, 5031–5036.

Okegawa, T., Nutahara, K., and Higashihara, E. (2009). Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. J. Urol. *181*, 1091–1097.

Pachmann, K., Camara, O., Kavallaris, A., Krauspe, S., Malarski, N., Gajda, M., Kroll, T., Jörke, C., Hammer, U., Altendorf-Hofmann, A., et al. (2008). Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. J. Clin. Oncol. *26*, 1208–1215.

Paget, S. (1889). THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. Lancet *133*, 571–573.

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

Pantel, K., Felber, E., and Schlimok, G. (1994). Detection and characterization of residual disease in breast cancer. J. Hematother. *3*, 315–322.

Pantel, K., Denève, E., Nocca, D., Coffy, A., Vendrell, J.-P., Maudelonde, T., Riethdorf, S., and Alix-Panabières, C. (2012). Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. Clin. Chem. *58*, 936–940.

Patanaphan, V., Salazar, O.M., and Risco, R. (1988). Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis. South. Med. J. *81*, 1109–1112.

Penna, C., and Nordlinger, B. (2002). Surgery of liver metastases from colorectal cancer: new promises. Br. Med. Bull. *64*, 127–140.

Persson, B.D., Müller, S., Reiter, D.M., Schmitt, B.B.T., Marttila, M., Sumowski, C.V., Schweizer, S., Scheu, U., Ochsenfeld, C., Arnberg, N., et al. (2009). An arginine switch in the species B adenovirus knob determines high-affinity engagement of cellular receptor CD46. J. Virol. *83*, 673–686.

Pestrin, M., Bessi, S., Galardi, F., Truglia, M., Biggeri, A., Biagioni, C., Cappadona, S., Biganzoli, L., Giannini, A., and Di Leo, A. (2009). Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat. *118*, 523–530.

Pestrin, M., Salvianti, F., Galardi, F., De Luca, F., Turner, N., Malorni, L., Pazzagli, M., Di Leo, A., and Pinzani, P. (2015). Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. Mol. Oncol. *9*, 749–757.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. *29*, e45.

Phillips, K.G., Velasco, C.R., Li, J., Kolatkar, A., Luttgen, M., Bethel, K., Duggan, B., Kuhn, P., and McCarty, O.J.T. (2012). Optical quantification of cellular mass, volume, and density of circulating tumor cells identified in an ovarian cancer patient. Front. Oncol. *2*, 72.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood *116*, 625–627.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature *359*, 235–237.

Psaila, B., and Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. Nat. Rev. Cancer *9*, 285–293.

Qian, B., Deng, Y., Im, J.H., Muschel, R.J., Zou, Y., Li, J., Lang, R.A., and Pollard, J.W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. PLoS One *4*, e6562.

Rack, B., Schindlbeck, C., Jückstock, J., Andergassen, U., Hepp, P., Zwingers, T., Friedl, T.W.P., Lorenz, R., Tesch, H., Fasching, P.A., et al. (2014). Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. *106*.

Raimondi, C., Gradilone, A., Naso, G., Vincenzi, B., Petracca, A., Nicolazzo, C., Palazzo, A., Saltarelli, R., Spremberg, F., Cortesi, E., et al. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat. *130*, 449–455.

Rauen, K.A., Sudilovsky, D., Le, J.L., Chew, K.L., Hann, B., Weinberg, V., Schmitt, L.D., and McCormick, F. (2002). Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. Cancer Res. *62*, 3812–3818.

Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *62*, 1094–1156.

Reeh, M., Bockhorn, M., Görgens, D., Vieth, M., Hoffmann, T., Simon, R., Izbicki, J.R., Sauter, G., Schumacher, U., and Anders, M. (2013). Presence of the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) in human neoplasms: a multitumour array analysis. Br. J. Cancer *109*, 1848–1858.

Reimer, D., Steppan, I., Wiedemair, A., Concin, N., Hofstetter, G., Marth, C., Müller-Holzner, E., and Zeimet, A.G. (2007). Soluble isoforms but not the transmembrane form of coxsackie-adenovirus receptor are of clinical relevance in epithelial ovarian cancer. Int. J. Cancer *120*, 2568–2575.

Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Turner, N.C., Lambros, M.B., Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Sarrio, D., Savage, K., Dexter, T., et al. (2006). FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. Clin. Cancer Res. *12*, 6652–6662.

Renan, M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. Mol. Carcinog. *7*, 139–146.

Renaut, L., Bernard, C., and D'Halluin, J.C. (2002). A rapid and easy method for production and selection of recombinant adenovirus genomes. J. Virol. Methods *100*, 121–131.

Riethdorf, S., and Pantel, K. (2010). Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1210*, 66–77.

Rivera, E., and Gomez, H. (2010). Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone. Breast Cancer Res. *12 Suppl 2*, S2.

Robbins, P.D., Tahara, H., and Ghivizzani, S.C. (1998). Viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol. *16*, 35–40.

Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I., and Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. J. Virol. *72*, 7909–7915.

Ross, W.E., and Shipley, N. (1980). Relationship between DNA damage and survival in formaldehyde-treated mouse cells. Mutat. Res. *79*, 277–283.

Ross, J.S., Ali, S.M., Wang, K., Palmer, G., Yelensky, R., Lipson, D., Miller, V.A., Zajchowski, D., Shawver, L.K., and Stephens, P.J. (2013). Comprehensive genomic profiling of epithelial ovarian cancer by next generation sequencing-based diagnostic assay reveals new routes to targeted therapies. Gynecol. Oncol. *130*, 554–559.

Rossi, E., Fassan, M., Aieta, M., Zilio, F., Celadin, R., Borin, M., Grassi, A., Troiani, L., Basso, U., Barile, C., et al. (2012). Dynamic changes of live/apoptotic circulating tumour cells as predictive marker of response to sunitinib in metastatic renal cancer. Br. J. Cancer *107*, 1286–1294.

Rottem, S., and Barile, M.F. (1993). Beware of mycoplasmas. Trends Biotechnol. *11*, 143–151.

Russell, W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. J. Gen. Virol. *81*, 2573–2604.

Russell, W.C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. J. Gen. Virol. *90*, 1–20.

Sachs, M.D., Rauen, K.A., Ramamurthy, M., Dodson, J.L., De Marzo, A.M., Putzi, M.J., Schoenberg, M.P., and Rodriguez, R. (2002). Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer. Urology *60*, 531–536.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harb. Lab. *3*, 1–2344. Seshadri, R., Lee, C.S., Hui, R., McCaul, K., Horsfall, D.J., and Sutherland, R.L. (1996). Cyclin DI amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis. Clin. Cancer Res. *2*, 1177–1184.

Sceneay, J., Smyth, M.J., and Möller, A. (2013). The pre-metastatic niche: finding common ground. Cancer Metastasis Rev. *32*, 449–464.

Schleger, C., Verbeke, C., Hildenbrand, R., Zentgraf, H., and Bleyl, U. (2002). c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. Mod. Pathol. *15*, 462–469.

Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Göttlinger, G., Schmidt, G., Häuser, H., Swierkot, S., Warnecke, H.H., Schneider, B., and Koprowski, H. (1987). Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *84*, 8672–8676.

Schneck, H., Blassl, C., Meier-Stiegen, F., Neves, R.P., Janni, W., Fehm, T., and Neubauer, H. (2013). Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. Mol. Oncol. *7*, 976–986.

Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat. Rev. Cancer *7*, 295–308.

Seeberg, L.T., Waage, A., Brunborg, C., Hugenschmidt, H., Renolen, A., Stav, I., Bjørnbeth, B.A., Brudvik, K.W., Borgen, E.F., Naume, B., et al. (2015). Circulating Tumor Cells in Patients With Colorectal Liver Metastasis Predict Impaired Survival. Ann. Surg. *261*, 164–171.

Seya, T., Hirano, A., Matsumoto, M., Nomura, M., and Ueda, S. (1999). Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. Int. J. Biochem. Cell Biol. *31*, 1255–1260.

Shan, L., Cui, S., Du, C., Wan, S., Qian, Z., Achilefu, S., and Gu, Y. (2012). A paclitaxel-conjugated adenovirus vector for targeted drug delivery for tumor therapy. Biomaterials *33*, 146–162.

Shang, Y., Chai, N., Gu, Y., Ding, L., Yang, Y., Zhou, J., Ren, G., Hao, X., Fan, D., Wu, K., et al. (2014). Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer. Arch. Pathol. Lab. Med. *138*, 910–919.

Shangary, S., and Wang, S. (2008). Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. Clin. Cancer Res. *14*, 5318–5324.

Shigeyasu, K., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., et al. (2015). Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. Gut *64*, 627—35.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 5522–5527.

Sieuwerts, A.M., Kraan, J., Bolt, J., van der Spoel, P., Elstrodt, F., Schutte, M., Martens, J.W.M., Gratama, J.-W., Sleijfer, S., and Foekens, J.A. (2009). Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. J. Natl. Cancer Inst. *101*, 61–66.

Sigurdsson, V., Hilmarsdottir, B., Sigmundsdottir, H., Fridriksdottir, A.J.R., Ringnér, M., Villadsen, R., Borg, A., Agnarsson, B.A., Petersen, O.W., Magnusson, M.K., et al. (2011). Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties. PLoS One *6*, e23833.

Singletary, S.E., Walsh, G., Vauthey, J.-N., Curley, S., Sawaya, R., Weber, K.L., Meric, F., and Hortobágyi, G.N. (2003). A role for curative surgery in the treatment of selected patients with metastatic breast cancer. Oncologist *8*, 241–251.

Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kälin, S., Boucke, K., Beerli, R.R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M.F., Greber, U.F., et al. (2004). The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. J. Virol. *78*, 4454–4462.

Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C.P., Finch, A.J., Murphy, D.J., Sodir, N.M., Karnezis, A.N., Swigart, L.B., Nasi, S., and Evan, G.I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. Nature *455*, 679–683.

Spizzo, G., Gastl, G., Obrist, P., Fong, D., Haun, M., Grünewald, K., Parson, W., Eichmann, C., Millinger, S., Fiegl, H., et al. (2007). Methylation status of the Ep-CAM promoter region in human breast cancer cell lines and breast cancer tissue. Cancer Lett. *246*, 253–261.

Staaf, J., Jönsson, G., Ringnér, M., Vallon-Christersson, J., Grabau, D., Arason, A., Gunnarsson, H., Agnarsson, B.A., Malmström, P.-O., Johannsson, O.T., et al. (2010). High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. Breast Cancer Res. *12*, R25.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. Mol. Cell *8*, 317–325.

Stecker, K., Vieth, M., Koschel, A., Wiedenmann, B., Röcken, C., and Anders, M. (2011). Impact of the coxsackievirus and adenovirus receptor on the adenoma-carcinoma sequence of colon cancer. Br. J. Cancer *104*, 1426–1433.

Steeg, P.S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nat. Med. *12*, 895–904.

Steinert, G., Schölch, S., Niemietz, T., Iwata, N., García, S.A., Behrens, B., Voigt, A., Kloor, M., Benner, A., Bork, U., et al. (2014). Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. Cancer Res. *74*, 1694–1704.

Stevenson, S.C., Rollence, M., Marshall-Neff, J., and McClelland, A. (1997). Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. J. Virol. *71*, 4782–4790.

Stockert, J.C., Blázquez-castro, A., Ca, M., and Horobin, R.W. (2012). Acta Histochemica MTT assay for cell viability : Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *114*, 785–796.

Stoecklein, N.H., Erbersdobler, A., Schmidt-Kittler, O., Diebold, J., Schardt, J.A., Izbicki, J.R., and Klein, C.A. (2002). SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. Am. J. Pathol. *161*, 43–51.

Stoecklein, N.H., and Klein, C.A. (2010). Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. Int. J. Cancer *126*, 589–598.

Stott, S.L., Hsu, C.-H., Tsukrov, D.I., Yu, M., Miyamoto, D.T., Waltman, B.A., Rothenberg, S.M., Shah, A.M., Smas, M.E., Korir, G.K., et al. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 18392–18397.

Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. Nature *458*, 719–724.

Sun, Y.-F., Yang, X.-R., Zhou, J., Qiu, S.-J., Fan, J., and Xu, Y. (2011). Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *137*, 1151–1173.

Tai, K.-Y., Shiah, S.-G., Shieh, Y.-S., Kao, Y.-R., Chi, C.-Y., Huang, E., Lee, H.-S., Chang, L.-C., Yang, P.-C., and Wu, C.-W. (2007). DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. Oncogene *26*, 3989–3997.

Takayama, K., Reynolds, P.N., Short, J.J., Kawakami, Y., Adachi, Y., Glasgow, J.N., Rots, M.G., Krasnykh, V., Douglas, J.T., and Curiel, D.T. (2003). A mosaic adenovirus possessing serotype Ad5 and serotype Ad3 knobs exhibits expanded tropism. Virology *309*, 282–293.

Tamkovich, S.N., Litviakov, N. V, Bryzgunova, O.E., Dobrodeev, A.Y., Rykova, E.Y., Tuzikov, S.A., Zav'ialov, A.A., Vlassov, V. V, Cherdyntseva, N. V, and Laktionov, P.P. (2008). Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1137*, 214–217.

Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., and Yamada, K.M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. Science *280*, 1614–1617.

Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993). E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. Nucleic Acids Res. *21*, 1677–1678.

Teramoto, S., Johnson, L.G., Huang, W., Leigh, M.W., and Boucher, R.C. (1995). Effect of adenoviral vector infection on cell proliferation in cultured primary human airway epithelial cells. Hum. Gene Ther. *6*, 1045–1053.

Tewes, M., Aktas, B., Welt, A., Mueller, S., Hauch, S., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2009). Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. Breast Cancer Res. Treat. *115*, 581–590.

Thalgott, M., Rack, B., Maurer, T., Souvatzoglou, M., Eiber, M., Kreß, V., Heck, M.M., Andergassen, U., Nawroth, R., Gschwend, J.E., et al. (2013). Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *139*, 755–763.

Thege, F.I., Lannin, T.B., Saha, T.N., Tsai, S., Kochman, M.L., Hollingsworth, M.A., Rhim, A.D., and Kirby, B.J. (2014). Microfluidic immunocapture of circulating pancreatic cells using parallel EpCAM and MUC1 capture: characterization, optimization and downstream analysis. Lab Chip *14*, 1775–1784.

Theillet, C., Adelaide, J., Louason, G., Bonnet-Dorion, F., Jacquemier, J., Adnane, J., Longy, M., Katsaros, D., Sismondi, P., and Gaudray, P. (1993). FGFRI and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. Genes. Chromosomes Cancer *7*, 219–226.

Theys, J., Jutten, B., Habets, R., Paesmans, K., Groot, A.J., Lambin, P., Wouters, B.G., Lammering, G., and Vooijs, M. (2011). E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells. Radiother. Oncol. *99*, 392–397.

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

Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nat. Rev. Genet. *4*, 346–358.

Thorsteinsson, M., Söletormos, G., and Jess, P. (2011). Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer. Anticancer Res. *31*, 613–617.

Tisdale, M.J. (2010). Cancer cachexia. Curr. Opin. Gastroenterol. *26*, 146–151.

Tjensvoll, K., Nordgård, O., and Smaaland, R. (2014). Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. Int. J. Cancer *134*, 1–8.

Trinh, H. V, Lesage, G., Chennamparampil, V., Vollenweider, B., Burckhardt, C.J., Schauer, S., Havenga, M., Greber, U.F., and Hemmi, S. (2012). Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. J. Virol. *86*, 1623–1637.

Trojan, L., Schaaf, A., Steidler, A., Haak, M., Thalmann, G., Knoll, T., Gretz, N., Alken, P., and Michel, M.S. (2005). Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. Anticancer Res. *25*, 183–191.

Tuve, S., Wang, H., Ware, C., Liu, Y., Gaggar, A., Bernt, K., Shayakhmetov, D., Li, Z., Strauss, R., Stone, D., et al. (2006). A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. J. Virol. *80*, 12109–12120.

Uenosono, Y., Arigami, T., Kozono, T., Yanagita, S., Hagihara, T., Haraguchi, N., Matsushita, D., Hirata, M., Arima, H., Funasako, Y., et al. (2013). Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. Cancer *119*, 3984–3991.

Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell *147*, 275–292.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. *3*, RESEARCH0034.

Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., et al. (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. Nat. Med. *15*, 577–583.

Varadaraj, K., and Skinner, D.M. (1994). Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. Gene *140*, 1–5.

Vita, M., and Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. Semin. Cancer Biol. *16*, 318–330.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. Trends Genet. *9*, 138–141.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. Nat. Med. *10*, 789–799.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. Nature *408*, 307–310.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. Science *339*, 1546–1558.

Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Franco, D., Pazzagli, M., Vekemans, M., Lacour, B., and Paterlini-bre, P. (2000). Technical Advance Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells A New Method for the Immunomorphological and Molecular. *156*, 57–63.

Wang, H., Li, Z.-Y., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Möller, T., Koyuncu, D., Drescher, M.R., Strauss, R., Zhang, X.-B., et al. (2011). Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. Nat. Med. *17*, 96–104.

Wang, H., Beyer, I., Persson, J., Song, H., Li, Z., Richter, M., Cao, H., van Rensburg, R., Yao, X., Hudkins, K., et al. (2012). A new human DSG2-transgenic mouse model for studying the tropism and pathology of human adenoviruses. J. Virol. *86*, 6286–6302.

Wang, H., Chen, N.G., Minev, B.R., Zimmermann, M., Aguilar, R.J., Zhang, Q., Sturm, J.B., Fend, F., Yu, Y.A., Cappello, J., et al. (2013). Optical detection and virotherapy of live metastatic tumor cells in body fluids with vaccinia strains. PLoS One *8*, e71105.

Wang, S.-P., Wang, W.-L., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Chao, Y.-C., Kao, S.-H., Yuan, A., Lin, C.-W., Yang, S.-C., Chan, W.-K., et al. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. Nat. Cell Biol. *11*, 694–704.

Wang, Y., Wang, S., Bao, Y., Ni, C., Guan, N., Zhao, J., Salford, L.G., Widegren, B., and Fan, X. (2006). Coxsackievirus and adenovirus receptor expression in non-malignant lung tissues and clinical lung cancers. J. Mol. Histol. *37*, 153–160.

Weinstein, I.B. (1988). The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Res. *48*, 4135–4143.

Welcsh, P.L., and King, M.C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. Hum. Mol. Genet. *10*, 705–713.

Wen, S., Stolarov, J., Myers, M.P., Su, J.D., Wigler, M.H., Tonks, N.K., and Durden, D.L. (2001). PTEN controls tumor-induced angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 4622–4627.

Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., and Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. Hum. Pathol. *35*, 122–128.

Wilkins, R.J., and Macleod, H.D. (1976). Formaldehyde induced DNA-protein crosslinks in Escherichia Coli. Mutat. Res. *36*, 11–16.

Winter, M.J., Nagtegaal, I.D., van Krieken, J.H.J.M., and Litvinov, S. V (2003). The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. Am. J. Pathol. *163*, 2139–2148.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature *378*, 789–792.

Wunder, T., Schumacher, U., and Friedrich, R.E. (2012). Coxsackie adenovirus receptor expression in carcinomas of the head and neck. Anticancer Res. *32*, 1057–1062.

Wunder, T., Schmid, K., Wicklein, D., Groitl, P., Dobner, T., Lange, T., Anders, M., and Schumacher, U. (2013). Expression of the coxsackie adenovirus receptor in neuroendocrine lung cancers and its implications for oncolytic adenoviral infection. Cancer Gene Ther. *20*, 25–32.

Yashiro, M., Nishioka, N., and Hirakawa, K. (2006). Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. Eur. J. Cancer *42*, 2397–2403.

Yoshida, K., and Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer Sci. *95*, 866–871.

Yu, D., Wolf, J.K., Scanlon, M., Price, J.E., and Hung, M.C. (1993). Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. Cancer Res. *53*, 891–898.

Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., and Haber, D.A. (2011). Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. J. Cell Biol. *192*, 373–382.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. Science *339*, 580–584.

Yu, M., Bardia, A., Aceto, N., Bersani, F., Madden, M.W., Donaldson, M.C., Desai, R., Zhu, H., Comaills, V., Zheng, Z., et al. (2014). Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. Science (80-.). *345*, 216–220.

Zeng et al. (2001). AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. Biotechniques *31*, 260–262.

Zhang, Z., Shiratsuchi, H., Lin, J., Chen, G., Reddy, R.M., Azizi, E., Fouladdel, S., Chang, A.C., Lin, L., Jiang, H., et al. (2014). Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. Oncotarget *5*, 12383–12397.

Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res. *60*, 1541–1545.

Zieglschmid, V., Hollmann, C., Gutierrez, B., Albert, W., Strothoff, D., Gross, E., and Böcher, O. (2005). Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. Anticancer Res. *25*, 1803–1810.

Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., et al. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. Genes Dev. *14*, 391–396.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

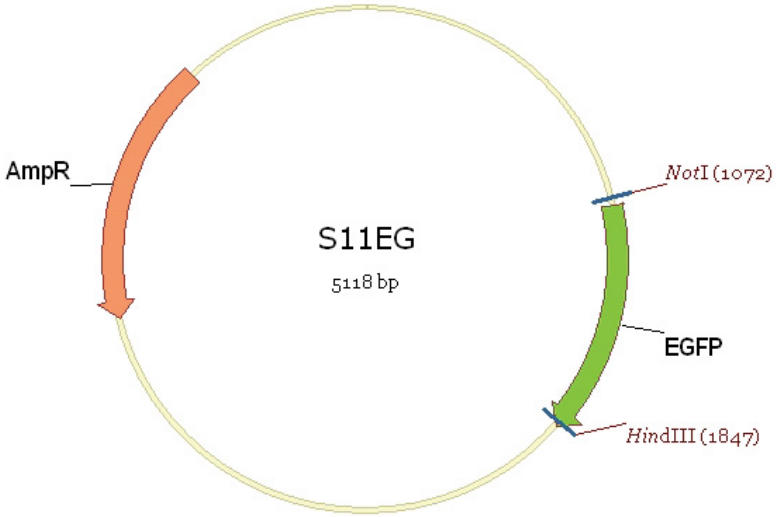
ACDA	*Acid Citrate Dextrose solution A* (saure Citrat-Dextroselösung A)
aCGH	Array-CGH
Ad5	Adenovirus Typ 5
Ad5/3	Adenovirus Typ 5/ knob-Domäne Adenovirus Typ 3
ATCC	*American Type Culture Collection*
BM	Basalmembran
bp	Basenpaar(e)
C(t)	*cycle threshold* (Zyklusschwellenwert)
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	*complementary DNA* (komplementäre DNA)
CGH	*comparative genomic hybridisation* (vergleichende genomische Hybridisierung)
CK	Cytokeratin
CMV	cytomegalovirus (Cytomegalievirus)
CNAs	*copy number alterations* (Kopienzahlveränderungen)
CPE	*cytopathic effect* (zytopathischer Effekt)
CTC	*circulating tumor cell* (zirkulierende Tumorzelle)
DLA	Diagnostische Leukapherese
DLRSD	Derivative Log Ratio Standard Deviation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
DSG2	Desmoglein 2
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTC	*disseminated tumor cell* (disseminierte Tumorzelle)
E. coli	*Escherichia coli*
ECACC	*European Collection of Cell Cultures*
ECM	*extracellular matrix* (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	*enhanced GFP* (verstärktes GFP)
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	*epithelial cell adhesion molecule* (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
Fa.	Firma
FACS	*fluorescence activated cell sorting* (Durchflusszytometrie)
FAM	Fluoreszein
FBS	*fetal bovine serum* (fötales Kälberserum)
FDA	*U.S. Food and Drug Administration*
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	*forward scatter* (Vorwärtsstreulicht)

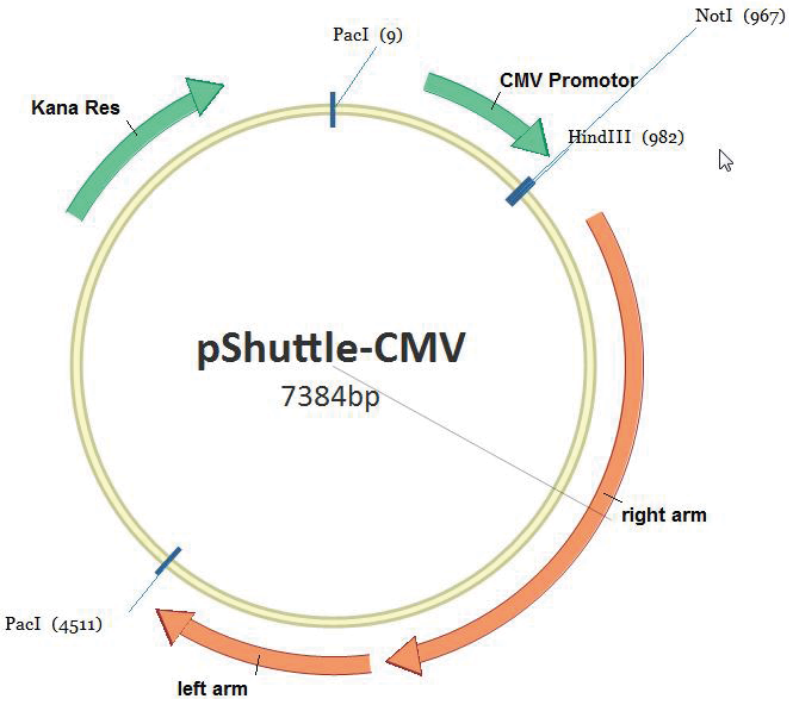
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V.
GFP	*green fluorescent protein* (grünfluoreszierendes Protein)
h	Stunde(n)
HEK	*human embryonic kidney*
HSA	*human serum albumin* (Humanalbumin)
IAC	Interdisziplinäres Zentrum für ambulante Chemotherapie
IARC	*International Agency for Research of Cancer*
ISET	*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	*lysogeny broth*
LK	Lymphknoten
Luc	*Luciferase* (Luziferase)
MCS	*multiple cloning site* (multiple Klonierungsstelle)
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRD	*minimal residual disease* (minimale Resterkrankung)
mRNA	*messenger RNA*
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OPA	*One Phor All Buffer*
OS	*overall survival* (Gesamtüberleben)
PBMCs	*peripheral blood mononuclear cells* (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)
PBS	*phosphate buffered saline* (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PFS	*progression-free survival* (progressionsfreies Überleben)
PFU	*plaque forming units*
PI	Propidiumiodid
pmol	Pikomol
PT	Primärtumor
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
RNA	*ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease

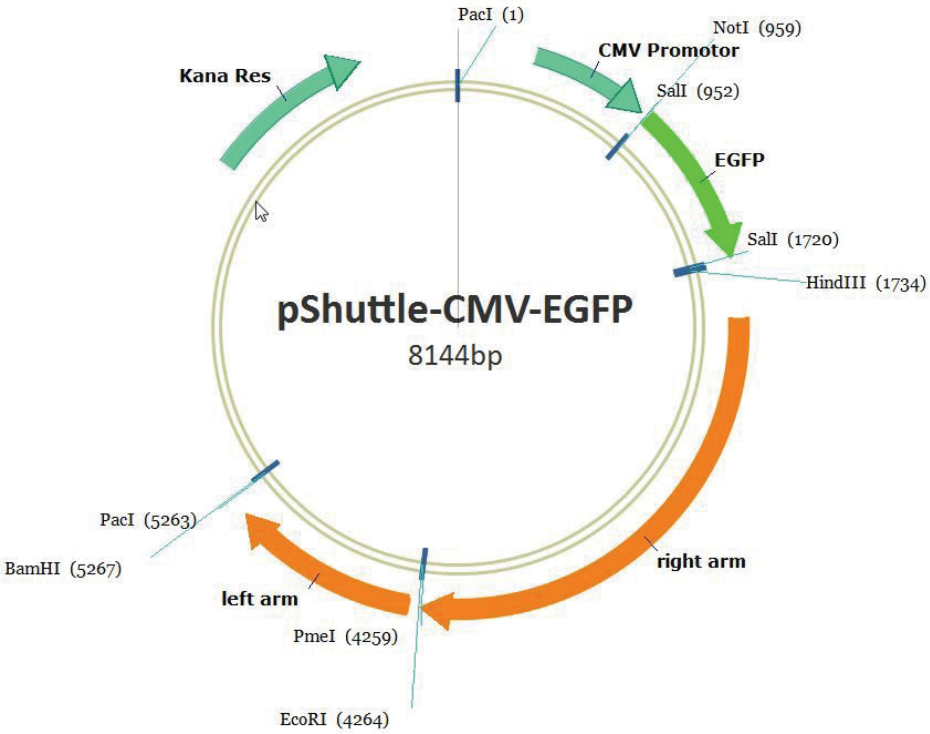
RT	Raumtemperatur
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
SOC	*super optimal broth with catabolite repression*
SSC	*side scatter* (Seitwärtsstreulicht)
STR	*short tandem repeat*
***T**aq*	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCID	*tissue culture infection dosis*
TE	Tris-EDTA
TGF-β	*transforming growth factor*-β
U	units (Einheiten)
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	*volume/volume* (Volumen/Volumen)
VLB	*viral lysis buffer* (Viruslysispuffer)
VP	Viruspartikel
w/v	*weight/volume* (Masse/Volumen)
WBC	*white blood cells* (weiße Blutkörperchen, Leukozyten)
WGA	*whole genome amplification* (gesamtgenomische Amplifikation)
WHO	*World Health Organization* (Weltgesundheitsorganisation)
Z	Zelle
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
λ	Lambda
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Ω	Ohm

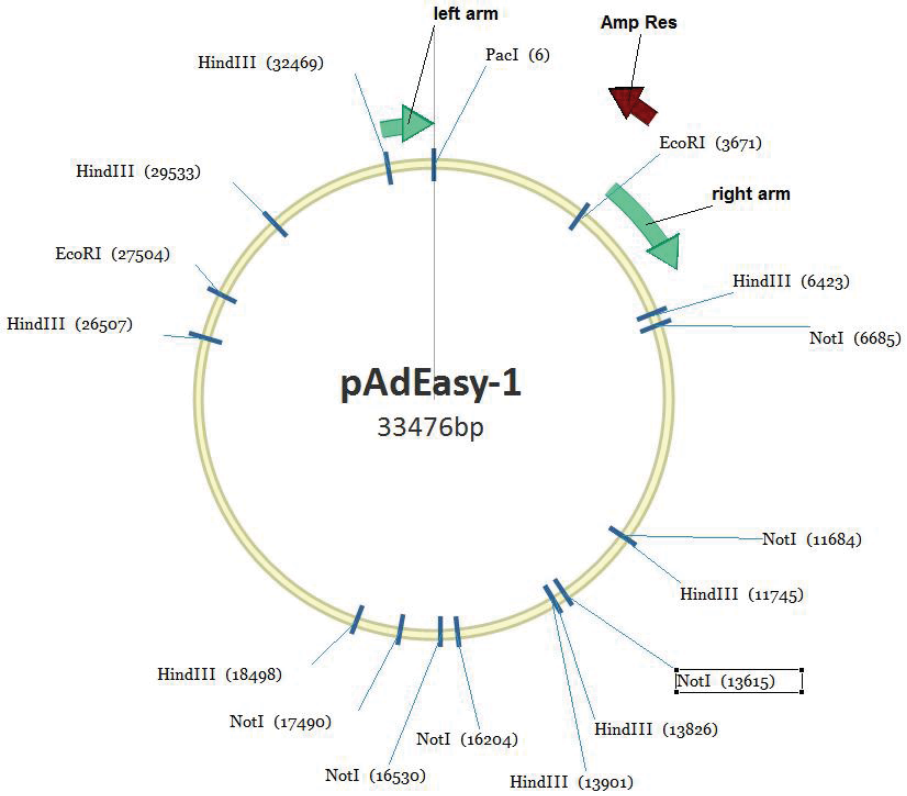
ANHANG

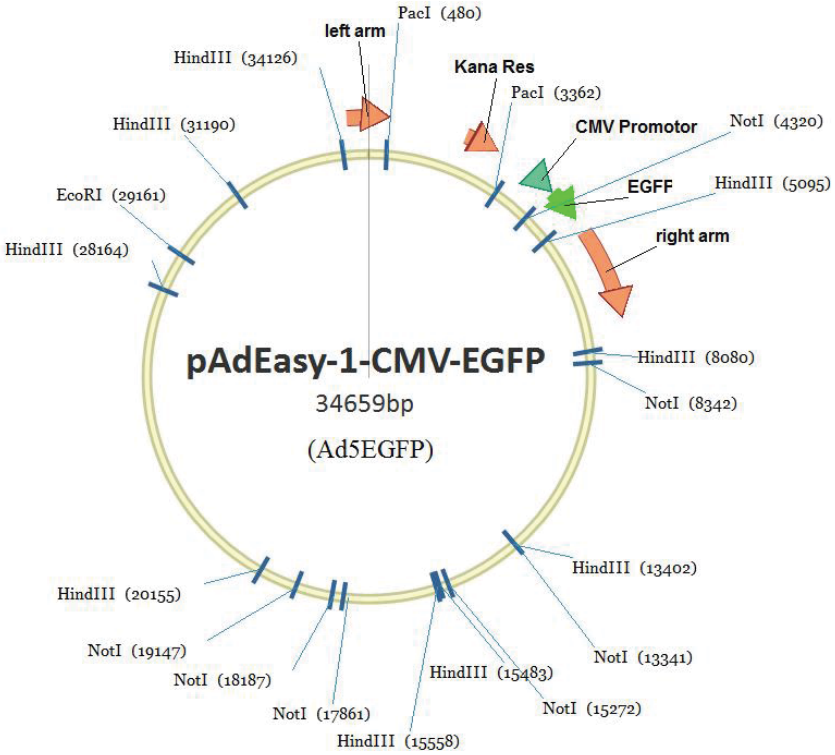
Plasmidkarten der Vektoren, die zur Herstellung von Ad5EGFP (pAdEasy-1-CMV-EGFP) verwendet wurden.






PacI (1)
NotI (959)
CMV Promotor
Kana Res
SalI (952)
EGFP
SalI (1720)
HindIII (1734)
pShuttle-CMV-EGFP
8144bp
PacI (5263)
BamHI (5267)
right arm
left arm
PmeI (4259)
EcoRI (4264)


left arm
Amp Res
HindIII (32469)
PacI (6)
EcoRI (3671)
HindIII (29533)
right arm
EcoRI (27504)
HindIII (6423)
HindIII (26507)
NotI (6685)
pAdEasy-1
33476bp
NotI (11684)
HindIII (11745)
HindIII (18498)
NotI (13615)
NotI (17490)
HindIII (13826)
NotI (16204)
NotI (16530)
HindIII (13901)


PacI (480)
left arm
HindIII (34126)
Kana Res
PacI (3362)
HindIII (31190)
CMV Promotor
NotI (4320)
EGFF
HindIII (5095)
EcoRI (29161)
HindIII (28164)
right arm
pAdEasy-1-CMV-EGFP
34659bp
(Ad5EGFP)
HindIII (8080)
NotI (8342)
HindIII (13402)
HindIII (20155)
NotI (13341)
NotI (19147)
HindIII (15483)
NotI (18187)
NotI (15272)
NotI (17861)
HindIII (15558)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
Ferner versichere ich, dass ich weder an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf noch an einer anderen Universität versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ebenso habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 12.08.2015