

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Wolfram Trudo Knoefel

Methylierungsanalysen der miR200-Familie
bei Zirkulierenden Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Constantin Frederic Pixberg

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Zweitgutachter: PD. Dr. med. Thomas Schroeder

Gewidmet

PgM

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Pixberg CF, Raba K, Müller F, Behrens B, Honisch E, Niederacher D, Neubauer , H,Fehm T, Goering W, Schulz WA, Flohr P, Boysen G, Lambros M, de Bono JS, Knoefel WT, Sproll C, Stoecklein NH, Neves RPL

Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells. *Oncogene* 2017, **36**, 3223–3231

Pixberg CF, Schulz WA, Stoecklein NH and Neves RPL

Characterization of DNA Methylation in Circulating Tumor Cells. *Genes* 2015, **6(4)**, 1053-1075

Zusammenfassung

Die epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT), bei der epitheliale Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp erlangen können, gilt als wichtiger Treiber der Tumorprogression und Metastasierung. Bei der Steuerung von EMT-Prozessen scheint die Regulierung EMT-assoziiierter Gene durch DNA-Methylierung entscheidend zu sein. Die Methylierungsanalyse von aus der Blutzirkulation angereicherten und isolierten zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), die als potentielle Vorläuferzellen von Metastasen gelten, eröffnet in diesem Sinne neue Möglichkeiten, den Einfluss von DNA-Methylierung auf die EMT nachvollziehen zu können. Tatsächlich können meist nur wenige CTCs pro Patient angereichert und isoliert werden, so dass Analysen mit sehr wenigen Zellen oder gar Einzelzellen als Ausgangsmaterial durchgeführt werden müssen. Während dieser Arbeit wurde multiplexed-single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (multiplexed-scAEBS) für die Methylierungsanalyse von Einzelzellen mittels Bisulfit-Sequenzierung etabliert. Mit multiplexed-scAEBS konnte der Methylierungsstatus der drei EMT-assoziierten Genpromotoren miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 bei einer einzelnen Zelle analysiert werden. Der komplette Workflow wurde an Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 und der Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 getestet und validiert. Anschließend wurde multiplexed-scAEBS an 94 EpCAM^{pos} CTCs von 11 Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom (mBC), 65 EpCAM^{pos} CTCs von sechs Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom (mCRPC) und 30 CD45^{pos} Zellen von drei mBC-Patienten angewendet. Insgesamt konnten abhängig von der jeweiligen Zelllinie 80-90% der Einzelzellen erfolgreich analysiert werden. Die mit multiplexed-scAEBS generierten Einzelzell-Profile der drei EMT-assoziierten Gene der Zelllinien MDA-MB-231 (eher mesenchymaler Phänotyp) und MCF-7 (eher epithelialer Phänotyp) bestätigten die zuvor mit Standardmethoden und hohen DNA-Ausgangsmengen veröffentlichten Daten. Einzelzellen der eher mesenchymalen Zelllinie MDA-MB-231 zeigten ein hypermethyliertes Methylierungsmuster, während bei Einzelzellen der eher epithelialen Zelllinie MCF-7 ein hypomethyliertes Methylierungsmuster beobachtet wurde. Bei der Analyse der CTCs waren die drei EMT-assoziierten Gene hypomethyliert und wiesen Methylierungsmuster auf, welche eher auf einen epithelialen Phänotyp schließen lassen. Jedoch war der Methylierungsstatus der miR200-Familie bei mCRPC-CTCs besonders heterogen, wobei einzelne CTCs Methylierungsprofile zeigten, die auf einen eher mesenchymalen Phänotyp hinweisen. Diese Ergebnisse deuten zum einen auf eine inter-tumorspezifische, zum anderen auf eine inter-zelluläre Heterogenität bezüglich der epigenetischen Regulation der drei EMT-assoziierten Gene hin, die einzelnen Tumorzellen die dynamische Regulierung der Genexpression von EMT-assoziierten Genen erlaubt. Einige CTCs könnten dabei die epigenetische Regulation von EMT-assoziierten Genen für eine Art phänotypisches Feintuning nutzen. Durch die erhobenen Daten konnte das Potenzial von Methylierungsmustern bei CTCs als Biomarker gezeigt werden. Es ist weiter interessant, inwiefern die Methylierungsmuster der miR200-Familie bei CTCs beispielsweise bei der Resistenzbestimmung von Chemotherapien genutzt werden könnten.

Abstract

The epithelial mesenchymal transition (EMT), in which epithelial tumor cells can attain a mesenchymal-like phenotype, is regarded as an important driver of tumor progression and metastasis. In the control of EMT processes, the regulation of EMT-associated genes by DNA methylation appears to be crucial. The methylation analysis of circulating tumor cells (CTCs) enriched and isolated from the blood circulation, which are regarded as potential precursor cells of metastases, opens new possibilities to understand the influence of DNA methylation on EMT. In fact, in most cases only a few CTCs per patient can be enriched and isolated, so that molecular analyses have to be performed with very few cells or even single cells as starting material. Within the scope of this work, multiplexed-single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (multiplexed-scAEBS) was established for the methylation analysis of single cells by bisulfite sequencing. With multiplexed-scAEBS the methylation status of the three EMT-associated gene promoters miR200c/141, miR200b/a/429 and CDH1 could be analyzed in single cells. The complete workflow was tested and validated on single cells of the lymphocyte cell line GM14667 and the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. Subsequently, multiplexed-scAEBS was applied to 94 EpCAM^{pos} CTCs from 11 patients with metastatic breast cancer (mBC), 65 EpCAM^{pos} CTCs from six patients with castration-resistant prostate cancer (mCRPC) and 30 CD45^{pos} cells from three mBC patients. Depending on the cell line, 80-90% of the single cells from cell lines could be successfully analyzed. The single-cell profiles of the three EMT-associated genes of the cell lines MDA-MB-231 (more mesenchymal-like phenotype) and MCF-7 (more epithelial-like phenotype) generated with multiplexed-scAEBS confirmed the data previously published with standard methods and high DNA starting material. Single cells of MDA-MB-231 were rather hypermethylated while single cells of MCF-7 were hypomethylated. The analysis of the CTCs revealed overall hypomethylation of the three EMT-associated genes and exhibited methylation patterns that were more indicative of an epithelial phenotype. However, the methylation status of the miR200 family was heterogeneous in mCRPC-CTCs with individual CTCs exhibiting methylation profiles indicative of a more mesenchymal-like phenotype. These results might reflect an inter-tumor-specific heterogeneity and an inter-cellular heterogeneity with respect to the epigenetic regulation of the three EMT-associated genes. That might allow individual tumor cells to dynamically regulate the gene expression of EMT-associated genes. Some CTCs could use the epigenetic regulation of EMT-associated genes for a kind of phenotypic fine-tuning.

The data collected show the potential of methylation patterns in CTCs as biomarkers. It is also interesting to what extent the methylation patterns of the miR200 family in CTCs could be used in clinical utility to determine the resistance to chemotherapies.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Epitheliale Mesenchymale Transition.....	1
1.1.1 Molekulare Regulatoren von EMT/MET.....	3
1.2 Epigenetik.....	7
1.2.1 DNA Methylierung.....	8
1.3 CTCs als Biomarker für systemische Krebserkrankungen	13
2 Fragestellung	17
3 Materialien	19
3.1 Zelllinien	19
3.2 Chemikalien.....	19
3.3 Enzyme	20
3.4 Instrumente	20
3.5 Software	21
3.6 Kits	21
3.7 Selbsthergestellte Lösungen	21
4 Methoden	23
4.1 Untersuchtes Zellmaterial von Patienten	23
4.2 Zellkultur.....	23
4.2.1 Kultivierung der Lymphozytenzelllinie GM14667.....	23
4.2.2 Kultivierung der Brustkrebszelllinie MCF-7.....	23
4.2.3 Kultivierung der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231.....	24
4.3 Isolierung von Zellmaterial.....	24
4.3.1 Isolierung von Zelllinien-Zellen durch Fluroesence-activated cell sorting (FACS) mittels MoFlo XDP Sorter.....	24

4.3.2 Isolierung und Analyse von einzelnen CTCs und CD45 ^{pos} Zellen von klinischen Proben	25
4.4 Etablierung der Primer für miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1.....	25
4.4.1 Primerdesign für die Analyse von bisulfitkonvertierter DNA	25
4.4.2 Primervalidierung an bsc-DNA	27
4.4.3 Gelelektrophorese	28
4.4.4 Analyse der Amplifikate mittels Sanger-Sequenzierung	28
4.5 Agarose-Embedded Bisulfite Sequencing nach Tierling (AEBS _{Tierling})	29
4.5.1 Immobilisation der Zellen in Agarose	29
4.5.2 Proteinase-K-Verdau	29
4.5.3 Aufreinigung des Agarose-Beads nach dem Proteinase-K-Verdau	30
4.5.4 Bisulfit-Konvertierung	30
4.5.5 Aufreinigung des Agarose-Beads nach der Bisulfit-Inkubation	30
4.5.6 Locus-spezifische PCR von miR200c/141	31
4.6 Optimierung von AEBS _{Tierling} zu scAEBS _{pre}	31
4.6.1 Validierung von scAEBS _{pre}	32
4.7 Single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (scAEBS)	33
4.7.1 Proteinase-K-Verdau	33
4.7.2 Einzelzell DNA Präzipitation	34
4.7.3 Immobilisierung der Einzelzell-DNA in Agarose	34
4.7.4 Aufreinigung des Agarose-Beads	34
4.7.5 Bisulfit-Konvertierung der Einzelzell-DNA	35
4.7.6 Aufreinigung des Agarose-Beads von der Bisulfit-Lösung	35
4.7.7 Amplifikation des miR200c/141 Genpromoter nach scAEBS	35
4.8 Amplifikation der miR200/141, miR200a/b und CDH1 Genpromotoren nach scAEBS (multiplexed-scAEBS)	36
4.9 Analyse von Zelllinien-Zellen und CellSave-fixierten MCF-7 Zellen mittels multiplexed-scAEBS.....	38
4.10 Auswertung der DNA-Sequenzen nach Sanger-Sequenzierung.....	39
4.11 Chi-Quadrat-Testung.....	40
5 Ergebnisse.....	41

5.1	Etablierung und Optimierung von PCR-Bedingungen der Primer von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1	41
5.2	Testung von AEBS _{Tierling} mittels Amplifikation von miR200c/141	41
5.3	scAEBS _{pre} – Parameteroptimierung von AEBS _{Tierling}	42
5.4	Testung von scAEBS mittels Amplifikation von miR200c/141	44
5.5	Testung von multiplexed-scAEBS an Lymphozyten	46
5.6	Validierung des Multiplex-PCR-Assays	48
5.7	Analyse von zirkulierenden Tumorzellen und CD45 ^{pos} Zellen	50
6	Diskussion.....	53
6.1	Etablierung von multiplexed-scAEBS	53
6.2	Vergleich von multiplexed-scAEBS mit Einzelzellmethoden für genomweite Bisulfit-Sequenzierung	57
6.3	Methylierungs-Analyse von EMT-assoziierten Genen in CellSearch TM angereicherten CTCs von mBC- und mCRPC-Patienten	58
7	Ausblick	61
8	Abbildungsverzeichnis.....	63
9	Tabellenverzeichnis	66
10	Abkürzungsverzeichnis.....	67
11	Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Die Epitheliale Mesenchymale Transition

Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) beschreibt einen Prozess, bei dem epitheliale Zellen durch Verlust von Zell-Adhäsionen und Änderung der Zellplastizität einen Wechsel hin zu einem mesenchymalen Phänotyp vollziehen können. Hierdurch erlangen diese Zellen mesenchymale Eigenschaften, wie z. B. die Fähigkeit zur Migration aus ihrem epithelialen Ursprungsgewebe. Dieser Prozess wurde das erste Mal von Trelstad und Hay zu Beginn der 1980er Jahre bei der Gastrulation von Hühnerembryonen beschrieben (1, 2). Hay beschrieb diesen Prozess noch als epitheliale mesenchymale Transformation. In Anbetracht der dynamischen Reversibilität dieses Prozesses und einer damit bedingten Rückerlangung der epithelialen Eigenschaften spricht man heutzutage von einer Transition. Die Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) beschreibt dabei den umgekehrten Prozess, bei dem die Zellen ihren epithelialen Phänotyp zurückerlangen (3).

EMT und MET sind sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen beteiligt. So geschieht die EMT/MET physiologisch unter anderem während der Embryogenese im Rahmen der Gastrulation (4), bei der Differenzierung von Geweben aus pluripotenten Stammzellen (3) und später im Rahmen der Organogenese (4). Im Rahmen der Wundheilung konnte die EMT/MET bei der Einwanderung von Fibroblasten in geschädigtes Gewebe und der nachfolgenden Narbenheilung beobachtet werden (3-5).

Pathologisch hingegen spielt die EMT/MET eine wichtige Rolle bei der Organfibrose (4). So ist mittlerweile berichtet, dass epitheliale Zellen des renalen Tubus (6), des Endothels (3), der Hepatozyten (7) und der Kardiomyozyten (8) eine EMT durchlaufen und durch Kollagenbildung eine Fibrose bedingen können.

Einen besonderen Stellenwert nimmt der dynamische Prozess von EMT/MET bei der Metastasierung von Tumorzellen ein. Während der insgesamt immer noch wenig verstandenen Kaskade der hämatogenen Metastasierung müssen mehr oder weniger differenzierte epitheliale Tumorzellen zunächst Zugang zur Blutzirkulation erlangen, was als Intravasation bezeichnet wird (9). Im Blut müssen die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) verschiedene selektive Einflüsse, unter anderem Anoikis, den Wegfall stromaler Einflüsse des Primärtumors, das Immunsystem und hydrodynamische Scherkräfte des Blutes überleben, sodass nur ein kleiner Teil der Tumorzellen in der Lage ist, die

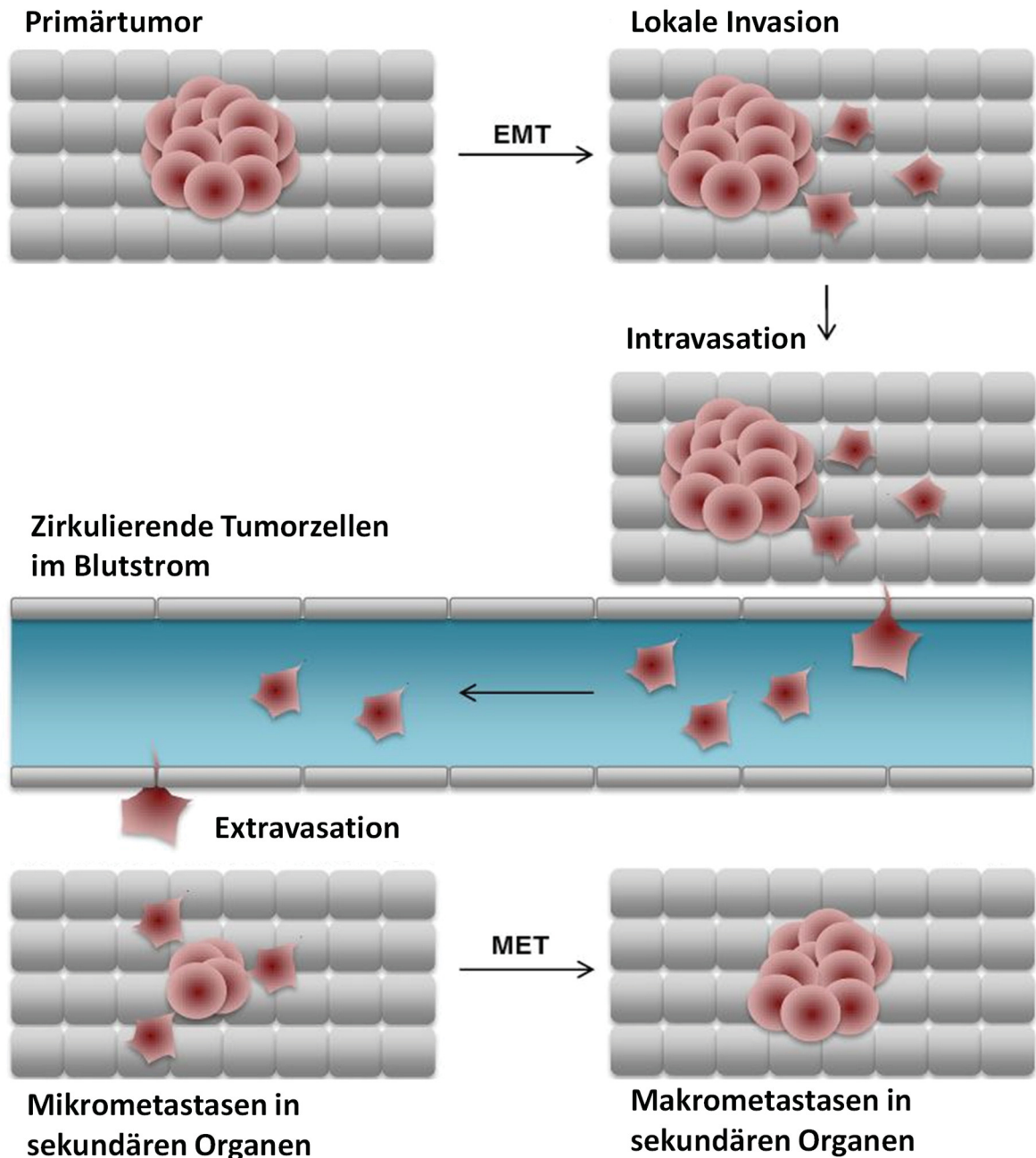


Abbildung 1.1 Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) während der Metastasierung. (Abbildung modifiziert nach Gires und Stoecklein 2014 (10))

Kapillaren anderer Organe zu erreichen, in denen sie die Blutgefäße wieder verlassen und Metastasen bilden können (Extravasation) (9) (Abbildung 1.1). Es wird angenommen, dass die Transition von einem eher epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp im Rahmen einer EMT den Tumorzellen die Herauslösung aus dem epithelialen Zellverband des Primärtumors und die aktive Intravasation in den Blutkreislauf ermöglicht (4, 11). Durch ihre neu gewonnenen mesenchymalen Eigenschaften erhöht sich

die Wahrscheinlichkeit, trotz der oben genannten selektiven Einflüsse, in der Blutzirkulation zu überleben und die Kapillaren fremder Organe zu erreichen (4, 11). Die Reversibilität durch eine MET könnte den Zellen dann eine Ansiedlung in anderen Organen erleichtern und wird für die Bildung von Metastasen als wichtig erachtet (4, 11) (Abbildung 1.1).

1.1.1 Molekulare Regulatoren von EMT/MET

1.1.1.1 E-Cadherin

Die Supprimierung des Ca^{2+} -abhängigen epithelialen Cadherin (E-Cadherin) und die Inaktivierung seines Genlocus CDH1 wird allgemein als essentieller Schritt während einer EMT angesehen (3, 4). E-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül und besteht aus einer extra- und intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Ektodomäne von E-Cadherin bildet homodimere Komplexe (selten auch heterodimere Komplexe) zu weiteren E-Cadherin-Molekülen der Nachbarzelle. Der intrazytoplasmatische Teil von E-Cadherin steht in Verbindung mit Ankerproteinen wie Vinculin, alpha-Actinin, p120 Catenin oder beta-Catenin, die wiederum mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (12). Die Gesamtheit dieser Zelladhäsionskomplexe bilden zwischen Zellen einen Adhäsionsgürtel, die sogenannte Zonula adherens. Durch Supprimierung von E-Cadherin können diese Zelladhäsionskomplexe und folglich der Zellverband aufgelöst werden. Das hierdurch freiwerdende beta-Catenin wird entweder abgebaut oder kann selbst ein Induktor von EMT als Komponente der Transkriptionsfaktoren TCF/LEF im WNT-Signalweg werden (3, 13).

Mittlerweile konnte eine ganze Reihe von Faktoren ausfindig gemacht werden, welche die E-Cadherin-Expression supprimieren können, wobei diese in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Faktoren der einen Gruppe, unter anderem TWIST und Goosecoid, regulieren die E-Cadherin Expression indirekt. Faktoren der zweiten Gruppe, wie Snail1, Snail2 (auch als Slug bekannt), ZEB1 und ZEB2, binden an den CDH1-Promoter und führen so zu einer Repression von E-Cadherin (4, 11). Darüber hinaus gibt es mittlerweile Daten, die zeigen, dass die Expression von CDH1 ebenfalls durch Genpromotermethylierung reguliert werden kann (14, 15).

1.1.1.2 ZEB1 und ZEB2

Die Zinc-finger E-box-binding (ZEB) Transkriptionsfaktoren ZEB1 und ZEB2 binden an Enhancer-Boxen der Promoterregionen und können somit deren Transkription unterdrücken oder auch aktivieren (3, 16, 17). Unter anderem wird die Transkription der Adhäsionsproteine E-Cadherin (Abbildung 1.2), Zonula occludens-1 (ZO-1) und Plakophilin inhibiert, während Gene für die Expression mesenchymaler Proteine wie Vitronectin und N-Cadherin aktiviert werden (3). Die Repression von E-Cadherin durch ZEB1 geschieht meist in Kombination mit dem Co-Faktor C-terminal-binding Protein (CTBP) oder aber mit dem Ko-Faktor Swi6/sucrose nonfermentable (SWI/SNF) chromatin remodelling protein BRG1 (3, 18). In Kombination mit den Ko-Faktoren CBP-associated factor (PCAF) und p300 kann ZEB1 auch als Aktivator von TGF-beta abhängigen Genen wirken, was ebenfalls eine EMT begünstigt (19). Somit wirken ZEBs genauso wie SNAIL und TWIST als Repressoren von Genen für Zelladhäsion und Zellpolarität sowie als Aktivatoren für mesenchymale Gene.

1.1.1.3 Postranskriptionelle Regulierung von ZEB1 und ZEB2 durch die miR200-Familie

Die Expression der ZEBs kann direkt durch Promoterbindung der Transkriptionsfaktoren SNAIL1, TWIST1 sowie durch TGF-beta-Induktion reguliert werden (3, 20). Während ZEB1 und ZEB2 durch die oben genannten Faktoren auf Transkriptionsebene gesteuert werden, kann die Expression der ZEBs auch durch post-transkriptionelle Kontrolle von mikro-RNAs (miRNAs) der miR200-Familie entscheidend beeinflusst werden. MiRNAs sind nicht kodierende RNAs, die an messenger-RNAs (mRNAs) gezielt binden und somit die Translation direkt inhibieren (21) oder aber als Bestandteil eines RNA-induced silencing complex (RISC) mRNA degradieren und abbauen können (22). MiRNAs gehen dabei die Verbindung mit der betreffenden mRNA durch komplementäre Basenbindung zwischen der sogenannten Seed-Sequenz der miRNA und dem 3' untranslatierten Bereich (3'-UTR) der mRNA ein. Die Seed Sequenz befindet sich zumeist am 5'-Ende zwischen der zweiten und siebten Base der miRNA und ist für die Spezifität gegenüber den mRNAs notwendig, wobei eine miRNA multiple mRNAs regulieren kann (23). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass bis zu zwei Drittel aller Protein-kodierenden Gene von miRNAs reguliert werden (24). MiRNAs, wie beispielsweise die miR200-Familie, spielen auch in der Tumorbilogie sowohl als aktivierende als auch als supprimierende Faktoren eine entscheidende Rolle (25).

Die miR200-Familie wird durch die zwei Gencluster miR200c/141 auf Chromosom 12 und miR200b/a/429 auf Chromosom 1 kodiert. Über diese beiden Gencluster werden die fünf unterschiedlichen miRNAs miR200c, miR141, miR200b, miR200a und miR429 exprimiert (25, 26). Eine weitere Einteilung in zwei funktionelle Gruppen nach den Seed-Sequenzen ist möglich, da sich miR200b, -200c, -429 (Gruppe 1) und miR200a, -141 (Gruppe2) minimal in der Seed-Sequenz unterscheiden (31). Die miR200 Familie ist eine der am besten untersuchtesten miRNA-Familien in der Tumorbio-logie. Es konnte gezeigt werden, dass die miR200-Familie eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation spielt und das Tumorstwachstum in Schach halten kann (27). So konnte bei Xenotransplantationsmodellen das Tumorstwachstum durch forcierte Überexpression bei miR200a in Meningiomzellen (28), miR429 in kolorektalen Tumorzellen (29) und miR200b in Brust- und Prostata-tumorzellen (30, 31) gehemmt werden. Die miR200-Familie beeinflusst darüber hinaus Angiogenese durch direkte Inhibition sämtlicher pro-angiogener Wachstumsfaktoren und Rezeptoren (32-36). Ebenso wird die Invasivität von Tumorzellen durch die miR200 Familie verringert. Dies geschieht durch post-transkriptionelle Inhibition des WAS protein family member 3 (WAVE3), dessen Überexpression mit Invasivität assoziiert wird, und durch Regulation sämtlicher Faktoren, die mit der Reorganisation des Aktinzytoskelett in Verbindung stehen (37-39).

Die miR200-Familie ist ebenfalls ein wichtiger Regulator der EMT/MET durch posttranskriptionelle Regulation der Expression von ZEB1/ZEB2. Dabei inhibieren Mitglieder der miR200 Familie die Translation der mRNAs von ZEB1 und ZEB2 durch direkte Bindung an deren 3'UTR und nehmen somit direkten Einfluss auf die E-Cadherin-Expression (40) (Abbildung 1.2). ZEB1 und ZEB2 können wiederum direkt an den E-Boxen der beiden Genpromotoren der miR200-Familie binden und deren Transkription blockieren (40). Somit besteht zwischen den ZEBs und der miR200-Familie eine negative Rückkopplungsschleife (41), die je nach Konzentration der miRNAs oder von ZEB1 und ZEB2 die Expression von E-Cadherin inhibieren oder begünstigen und somit den Phänotyp der Zelle beeinflussen kann (Abbildung 1.2). So wurden während EMT-Prozessen erniedrigte Spiegel der miRNAs mit erhöhter Expression von ZEB1 und ZEB2 bei verschiedenen Tumorentitäten (41), unter anderem dem Mammakarzinom (40), dem Nierenzellkarzinom (42) oder dem Ovarialkarzinom (43) nachgewiesen. Ebenfalls zeigte sich, dass die Inhibition der miR200-Familie mit einer erhöhten Migration und Motilität von epithelialen Zellen

einhergeht (40). Damit übereinstimmend zeigte eine forcierte Expression von miR200a/c bei der eher mesenchymal differenzierten und invasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 eine Abnahme der Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (43). Auch bei Leberkarzinomzellen konnte bei Induktion von miR200 durch p53 eine EMT vermieden werden, was mit erniedrigten Expressionsleveln von ZEB1 und ZEB2 einherging (44).

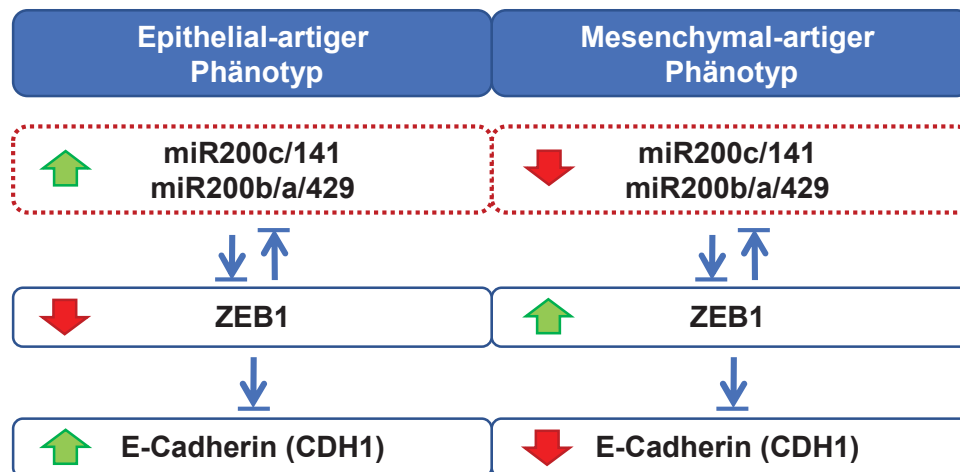


Abbildung 1.2 Regulation von E-Cadherin über die Doppel-Negativ-Rückkopplungsschleife der mikroRNAs von miR200 und dem Transkriptionsfaktor ZEB1.

1.1.1.4 Epigenetische Regulierung der miR200-Familie

In Anbetracht der Dynamik einer EMT zwischen einem epithelialen und mesenchymalen Phänotyp ist die reversible epigenetische Regulation der Genpromotoren von miR200c/141 und miR200b/a/429 von großer Bedeutung. Während der Genlocus miR200b/a/429 durch Histonmodifikation reguliert werden kann (45), konnte sowohl bei miR200c/141 als auch bei miR200b/a/429 eine Inhibierung der Transkription durch Promoterhypermethylierung festgestellt werden (46, 47). Neves et al. analysierte via Bisulfit-Sequenzierung den Genpromoter von miR200c/141 bezüglich dessen Methylierung sowie die Expression von miR200c und miR141 bei Brustkrebszelllinien mit einem eher mesenchymalen und mit einem eher epithelialen Phänotyp. Interessanterweise zeigte sich der Genpromotor bei den eher mesenchymalen Zelllinien fast vollständig methyliert, was mit einer deutlich verminderten Expression von miR200c und miR141 einherging. Dem entgegengesetzt konnte bei eher epithelial-differenzierten Brustkrebszelllinien eine erhöhte Expression dieser Faktoren gemessen werden, wobei deren Genpromotorregionen fast vollständig

unmethyliert waren. Anhand eines EMT in vitro Models, bei der eine EMT durch TWIST-Expression bei Human Mammary Epithelial (HPMLE) Zellen induziert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass neben den typischen Merkmalen, wie dem Verlust von Zelladhäsionen, Herunterregulation von E-Cadherin und vermehrter Expression von ZEB1 und ZEB2, ebenfalls die Promotermethylierung von miR200c/141 deutlich erhöht war (46). Davalos et al. konnte diese Ergebnisse an Krebszelllinien von Brust, Lunge und Kolon mit mesenchymal- und epithelial-artigem Phänotyp bestätigen. Neben dem miR200c/141-Genpromoter wurde hierbei auch der Genpromoter von miR200b/a/429 bezüglich der Methylierung analysiert und die Expression der entsprechenden miRNAs untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Transkription von miR200b/a/429 ebenfalls durch Hypermethylierung inhibiert werden kann und mit einer Hochregulation von ZEB1 und ZEB2 einhergeht. In einem weiteren Experiment wurde bei der epithelialen Madin Canine Kidney (MDCK) Zelllinie durch mehrtägige TGF-beta Behandlung eine EMT induziert. Vor der EMT-Induktion waren dabei beide miR200-Genpromotoren entsprechend dem epithelialen Phänotyp der Zellen unmethyliert. Während der TGF-beta Behandlung nahm in Analogie zu dem nun mesenchymal-artigeren Phänotyp der Zellen auch die Methylierung beider Genpromotoren zu. Nach Absetzen von TGF-Beta erlangten die mesenchymalen Zellen ihren ursprünglich epithelialen Phänotyp im Sinne einer MET wieder und auch die Methylierung der Genpromotoren war wieder fast vollständig aufgehoben (47). Dieses Experiment verdeutlicht, dass die DNA-Methylierung der Genpromotoren von miR200c/141 und miR200b/a/429 ein möglicher Mechanismus für die Regulierung des Phänotyps während einer EMT/MET ist. Allerdings konnte der Einfluss der miR200-Familie auf die Regulation von ZEB1 und ZEB2 und damit auch von E-Cadherin zumeist nur bei in vitro Modellen nachgewiesen werden. Um den Einfluss der epigenetischen Regulierung von miR200 bezüglich der EMT durch DNA-Genpromotermethylierung ex vivo nachzuweisen, bieten sich CTCs als Schnittstelle zwischen Primärtumor und Metastase an.

1.2 Epigenetik

Die Epigenetik umfasst das Fachgebiet der genetischen Modifikation. In erster Linie sind damit vererbte Faktoren gemeint, die die Genaktivitäten durch verschiedene

Modifikationen des Erbguts regulieren können, ohne dass diese auf Mutationen im Genom beruhen. Die Veränderungen bestehen in der DNA-Methylierung, der Histonmodifikation oder im Abbau von Telomeren. Durch die Epigenetik kann somit der Phänotyp einer Zelle wesentlich verändert werden, während der Genotyp unverändert persistiert (48).

1.2.1 DNA Methylierung

Die Methylierung von DNA spielt eine entscheidende Rolle während der Regulation der Genexpression, der Inaktivierung und Aktivierung ganzer Chromosomen, der Stabilisierung von Retroelementen und der genomischen Prägung (Imprinting) (49). Chemisch betrachtet besteht eine DNA-Methylierung aus der kovalenten Bindung einer Methyl-Gruppe mit dem fünften Kohlenstoffatom des Cytosin-Kohlenstoff-Ring (Abbildung 1.3). Die Methylierung von Cytosinen findet beim Menschen und bei anderen Säugern, bis auf wenige Ausnahmen (50, 51), nur bei Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) statt (52). Die Methylierung von CG-Dinukleotiden wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a und DNMT3b) katalysiert, wobei S-Adenosylmethionin der Methylgruppen-Donor ist. DNMT1 wird als verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Methylierung des zunächst unmethylierten Tochterstranges nach der Replikation und damit für das epigenetische Gedächtnis angesehen, während DNMT3a und DNMT3b mit der de-novo Methylierung assoziiert werden (53). Beide DNA-Stränge liegen normalerweise symmetrisch methyliert vor (53).

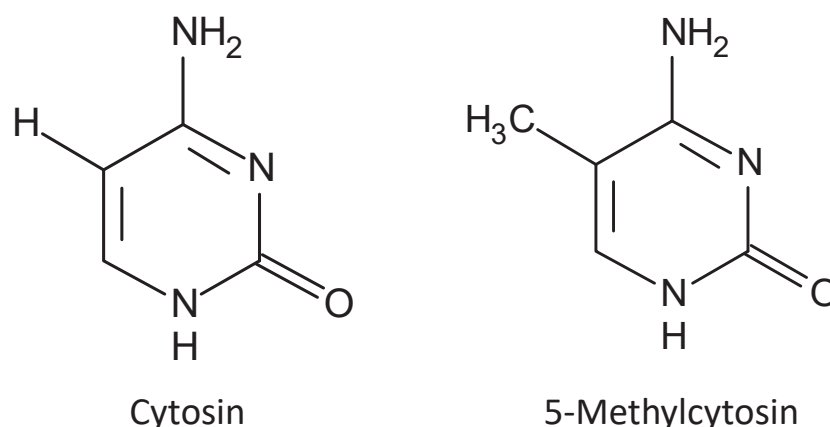


Abbildung 1.3 Strukturformeln von Cytosin und 5-Methylcytosin.

Regionen mit einer hohen Dichte an CpG-Dinukleotiden werden als CpG-Inseln bezeichnet. Diese Regionen haben per definitionem einen GC-Gehalt von mehr als 55% über eine Länge von mehr als 200 bp. Sie besitzen eine Ratio von erwarteten zu beobachteten CpGs von 0,6 (54). Innerhalb des menschlichen Genoms befinden sich insgesamt bis zu 25.000 CpG-Inseln (55) und Schätzungen zufolge besitzen mindestens 60-70% aller Gene im menschlichen Genom eine CpG-Insel innerhalb ihrer Genpromotoren (55, 56). Hypermethylierung von CpG-Inseln innerhalb eines Genpromotors werden mit einer Inhibierung der Genexpression assoziiert. CpG-Inseln von aktiv transkribierenden Genen sind dagegen meistens nicht methyliert. Allerdings sind nicht-transkribierende Gene nicht zwangsläufig methyliert, sondern können auch über andere Mechanismen reguliert werden (57).

Die Inhibierung der Genexpression durch Genpromotermethylierung wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt. 1. Durch vermehrte Methylierung kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die damit verbundene Initiation der Transkription direkt verhindert werden. 2. Nach einem alternativen Mechanismus binden m⁵-CpG-binding Domain Proteine (MBDs) an die methylierte DNA-Region. An die MBDs können nun eine Vielzahl weiterer Proteinkomplexe binden, die durch weitere komplexe Mechanismen wie Histonmodifikationen, Nukleosom-Remodeling und Chromatin-Reorganisation die Transkription blockieren können (58).

1.2.1.1 Detektion von DNA-Methylierung mit Bisulfit-Sequenzierung

Für DNA-Methylierungs-Analysen von verschiedenen Ausgangsmaterialien und -mengen sind mittlerweile eine Reihe alternativer Technologien verfügbar. Die Wahl zwischen den einzelnen Methoden hängt von dem Verwendungszweck, der gewünschten Auflösung, dem vorhandenen biologischen Ausgangsmaterial und dessen Menge sowie dem vorhandenen Budget ab (59, 60). Die einzelnen Methoden variieren bezüglich ihrer Reichweite zwischen locus-spezifischen und genomweiten Analysen der DNA-Methylierung. Neben der Reichweite können ebenfalls unterschiedliche Auflösungen bestimmt werden. Während einige Methoden die dezidierte Bestimmung der Methylierung von einzelnen CG-Dinukleotiden ermöglichen, ist mit anderen Methoden nur eine grobe Schätzung des Methylierungsstatus einer bestimmten Region oder auch des ganzen Genoms möglich (59).

Die meisten hochauflösenden Methoden für DNA-Methylierung basieren auf der DNA-Behandlung mit Bisulfit-Salz, welches in mehreren chemischen Schritten unmethyliertes Cytosin in Uracil konvertiert, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Die chemische Konvertierung besteht aus der Denaturierung der DNA durch die Behandlung mit Natriumhydrogencarbonat, der Sulfonierung und Deaminierung des Cytosin durch die Inkubation mit Bisulfit und der abschließenden Desulfonierung zu Uracil erneut durch Natriumhydrogencarbonat (Abbildung 1.4) (61). Mit Hilfe verschiedener Methoden kann nach der Bisulfit-Konvertierung zwischen den Uracilen und Cytosinen unterschieden werden, und somit können Rückschlüsse auf den Methylierungsstatus gezogen werden. Durch PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung (61, 62) oder der eher quantitativ ausgerichteten Pyrosequenzierung von bisulfitkonvertierter DNA (bscDNA) (63) lässt sich der genaue Methylierungsstatus aller CG-Dinukleotide innerhalb einer untersuchten Sequenz, die für gewöhnlich mehrere hundert Basenpaare umfasst, analysieren. Durch die Amplifikation der bscDNA werden die Uracile in Thyminen umgewandelt. Der Vergleich von Thyminen mit Cytosinen zwischen der Originalsequenz und der Sequenz nach Bisulfit-Konvertierung erlaubt nun die Aussage über den genauen Methylierungsstatus der analysierten Region.

Methoden für eine umfangreichere Analyse des Methyloms sind unter anderem Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) (64, 65) und MethylC-Seq (50, 66), welche auf Whole-Genome-Sequencing basieren. Während bei RRBS nur Regionen mit einem hohen CpG-Inhalt (insgesamt ca. 3.000.000 CpGs genomweit) angereichert und analysiert werden, können mit MethylC-Seq bis zu 28.000.000 CpGs abgedeckt werden.

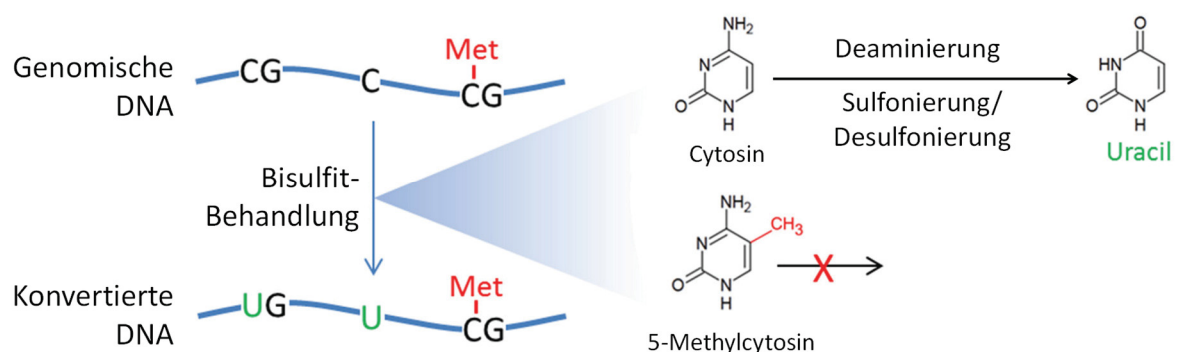


Abbildung 1.4 Bisulfit-Konvertierung von nicht methylierten Cytosinen. Bisulfit sulfoniert nicht methylierte Cytosine. Diese werden in der nachfolgenden hydrolytischen Reaktion deaminiert und durch die abschließende Behandlung mit NaOH zu Uracil desulfoniert. Methylierte Cytosine werden durch die Methylgruppe vor dem Bisulfitsalz geschützt und bleiben erhalten. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (67))

1.2.1.2 Die limitierenden Faktoren der Bisulfit-Sequenzierung

Trotz der technologischen Fortschritte stellt die Anwendung der Bisulfit-Sequenzierung bei seltenen Zellpopulationen, wie zum Beispiel bei CTCs, die zumeist auf Einzelzellniveau analysiert werden müssen, eine besondere Herausforderung dar aus den folgenden Gründen. Grunau et al. beschrieben die Degradierung und Fragmentierung der DNA unter Exposition des Bisulfit-Salzes als den stärksten limitierenden Faktor für Wenig- und Einzelzell-Analysen, da hierdurch die nachfolgende PCR erschwert wird. Dabei wurde anhand einer High Performance Liquid Chromatography-Messung (HPLC) von einzelsträngiger M13 DNA, die mit Endonuklease P1 verdaut wurde, und quantitativer PCR von ART-beta DNA nach Bisulfit-Behandlung eine Degradierung der DNA zwischen 84-96% nachgewiesen. Die Degradierung der DNA ist dabei umso schwerer, je länger die DNA dem Bisulfit-Salz ausgesetzt ist und je höher die Temperatur während der Inkubation ist (68). Durch die DNA-Degradierung bleiben nur wenige intakte DNA-Moleküle für die nachfolgende PCR als Ausgangsmenge übrig. Dementsprechend werden auch hohe DNA-Ausgangsmengen für die Bisulfit-Sequenzierung empfohlen (68, 69). Neben der Anzahl der Moleküle spielt aber auch die Länge der DNA-Moleküle eine entscheidende Rolle bei der Effizienz der nachfolgenden PCR. Ehrich et al. zeigten anhand einer Gel-basierten Fragmentierungsanalyse, dass durch Bisulfit-Behandlung die durchschnittliche Fragmentlänge in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur gegenüber genomischer DNA deutlich abnahm. Die größte Fragmentfraktion lag bei <200 bp bei 80°C Inkubationstemperatur. Dies erklärt, warum die Amplifikation von größeren Amplikons über 200-300 bp bei wenig Ausgangsmaterial zu Problemen führen kann (69).

Ein weiterer kritischer Punkt während der Bisulfit-Sequenzierung ist die notwendige Aufreinigung der bscDNA von dem Bisulfit-Salz, die bei den meisten kommerzialisierten Kits, wie dem Epiect Fast Lyse All Bisulfite Kit von Qiagen und EZ DNA Methylation Direct™ Kit von ZymoResearch, durch Kieselgelsäulen durchgeführt wird. Hierbei wird durch die Fragmentierung und Degradierung der DNA die Bindung an die Kieselgelmatrix beeinträchtigt, was gerade bei niedrigen Zellzahlen zu hohem Materialverlust führen kann (70). Tatsächlich zeigte das EZ DNA Methylation Direct™ Kit bei einer unabhängigen Analyse von Holmes et al. einen DNA-Verlust von 21%-35% bei der Anwendung an hochmolekularer DNA, je nach Messung mit UV-Spektrophotometrie oder quantitativer Real-Time PCR (70). Die oben genannten Faktoren erklären, dass zu Beginn dieser Arbeit Einzelzellanalysen mit kommerzialisierten Kits nicht möglich

waren, sondern gemäß den Herstellerangaben nur die Analyse von 10 Zellen bei den Kits Epitect Fast Lyse All Bisulfite Kit von Qiagen und EZ DNA Methylation Direct™ Kit von ZymoResearch (70).

1.2.1.3 Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (AEBS)

Zu Beginn dieser Arbeit lag lediglich ein publiziertes Protokoll von Geuns et al. für die Methylierungsanalyse von Einzelzellen vor, mit welchem in mehreren Arbeiten menschliche Oozyten und einzelne Blastomere bezüglich der Methylierung von SNRPN (71), DKL1-GTL2 (72) und KvDMR1 (73) untersucht wurden. Hierbei konnten zwischen 17,6% und 28,7% der Zellen abhängig von dem entsprechenden Target erfolgreich analysiert werden. Die Methode von Geuns et al. basiert auf einem Protokoll von Olek et al. (74). Während dieses Protokolls werden die Zellen oder die DNA in einem sogenannten Bead aus Low-Melting-Point Agarose (LMP-Agarose) immobilisiert. Der Bead wird anschließend in den verschiedenen Lösungen für die unterschiedlichen chemischen Reaktionen während der Bisulfit-Modifikation inkubiert. Nach der Bisulfit-Modifikation findet die Aufreinigung von dem Bisulfit-Salz durch Inkubation in verschiedenen Puffern statt, die dem Bead das Bisulfit-Salz durch Diffusion entziehen. Der Bead bleibt über das ganze Protokoll in demselben Reaktionsgefäß, während die einzelnen Reagenzien ausgetauscht werden. Die in der Agarose immobilisierte DNA wird abschließend direkt für die PCR oder weitere Analysen benutzt, wodurch keine weiteren Aufreinigungsschritte notwendig werden (Abbildung 1.5). Die Agarose scheint dabei einen stabilisierenden Effekt auf die Einzelstrang-DNA, die für die Bisulfit-Konvertierung notwendig ist, zu besitzen (74) und Denaturierung zu vermindern (68). So gelang es, dass mit diesem Protokoll bereits 50 pg DNA (DNA-Äquivalent zu ca. 10 Zellen) analysiert werden konnten. Im Nachfolgenden wird dieses Protokoll Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (AEBS) genannt. Mittlerweile existieren mehrere Adaptionen von AEBS. Ein von Tierling et al. etabliertes Protokoll (AEBS_{Tierling}) unterscheidet sich zu AEBS hauptsächlich in der einfacheren Handhabung (75). Für diese Arbeit bot AEBS_{Tierling} viele Modifikationsmöglichkeiten zur Etablierung einer Einzelzellmethode für Bisulfit-Sequenzierung.

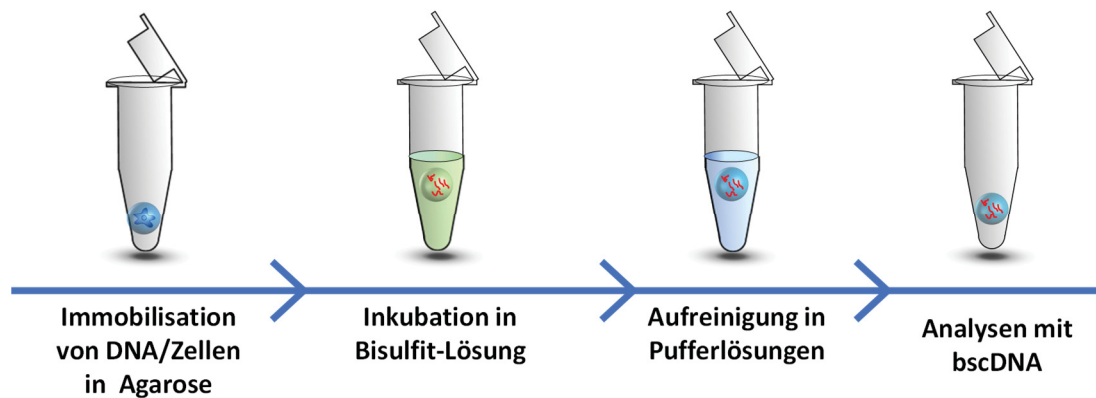


Abbildung 1.5 Prinzip des Agarose Embedded Bisulfite Sequencing.

1.3 CTCs als Biomarker für systemische Krebserkrankungen

CTCs sind einzelne oder in Clustern vorkommende Krebszellen, die sich aus dem Verbund ihres Primärtumors gelöst haben und in die Blutzirkulation gelangt sind (11). CTCs sind im Vergleich zum Primärtumor und den Metastasen über das Blut minimal invasiv zugänglich. Sie bieten so die Möglichkeit, Tumormaterial für die Charakterisierung des Tumors, für die Prognose, für die Therapieplanung und Überwachung im Rahmen einer sogenannten Liquid Biopsy zu gewinnen (76).

Mittlerweile wurden etliche Technologien entwickelt, um CTCs anhand ihres Phänotyps (z.B. Expression von Oberflächenmarkern) oder ihrer biophysikalischen Eigenschaften (z.B. Größe, Dichte, Verformbarkeit) anzureichern und zu isolieren (77, 78). Das CellSearch™-System ist das erste halbautomatische System für die standardisierte Anreicherung und Enumeration von CTCs, welches von der Food and Drug Administration offiziell zugelassen wurde. CellSearch™ separiert CTCs von den übrigen Blutzellen durch Eisenpartikel, die mit Antikörpern gegen den Oberflächenmarker Epithelial-Cell-Adhesion-Molecule (EpCAM) gekoppelt sind. Die CTCs werden anschließend mit Fluoreszenz markierten monoklonalen Anti-Zytokeratin-Antikörpern (anti CK8/18/19) gefärbt, welche für epitheliale Zellen spezifisch sind sowie mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), um den Nukleus darzustellen. Um Kontaminationen mit Leukozyten auszuschließen, findet ebenfalls eine Färbung mit monoklonalen Anti-CD45-Antikörpern statt. Die Auswertung, ob es sich bei den angereicherten Zellen um CTCs handelt, wird von einem semi-automatischen Mikroskop durchgeführt (79).

Die klinische Relevanz der mittels CellSearch™ detektierten CTCs konnte für Patienten mit Mamma-, Prostata und kolorektalen Karzinomen hinsichtlich Prognostik und teilweise für Therapie-Ansprechen nachgewiesen werden. Bei diesen Entitäten wurde beobachtet, dass ab einem bestimmten Grenzwert die Anzahl der CTCs mit der Dauer des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens korrelieren (80-87). Beim Mammakarzinom konnten einige Studien den Nutzen von CTCs bei der Überwachung der Therapie während unterschiedlicher Tumorstadien belegen. So konnte das Persistieren von CTCs nach neoadjuvanter Therapie mit einem erhöhten Risiko für Metastasenbildung und niedrigerem Gesamtüberleben assoziiert werden (88, 89). Bei der SUCCESS Studie konnte gezeigt werden, dass die Identifikation von CTCs in 30 ml Patientenblut vor einer neoadjuvanten Therapie mit einem verminderten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert ist (90). Beim Monitoring von Patienten mit metastasierten Mammakarzinom (mBC) hatten solche Patienten mit fünf oder mehr CTCs pro 7,5 ml Blut ein vermindertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben (80). Bei mBC-Patienten konnte ebenfalls die detektierte CTC-Zahl als Marker für die Therapieantwort genutzt werden (91, 92). Insgesamt geht der Nachweis und die Persistenz von hohen CTC-Zahlen während der Therapie mit einem hohen Risiko für Tumorprogression und verringerten Gesamtüberleben einher (81, 82, 84). Bei 711 Patienten mit einem metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom (mCRPC) wurde beobachtet, dass eine Kombination aus CTC-Zählung und LDH-Bestimmung nach 12 Wochen Therapie als Surrogatmarker für den Endpunkt klinischer Studien genutzt werden kann (93). In derselben Studie zeigte sich, dass Patienten mit weniger als fünf CTCs pro 7,5 ml Blut nach 12 Wochen ein längeres Gesamtüberleben aufweisen.

Neben dem Nutzen für Prognostik und Therapie-Überwachung durch CTC-Zählung bei Patienten rückt die molekulare Charakterisierung von CTCs immer mehr in den Vordergrund. So konnten bei Brustkrebspatienten Unterschiede zwischen CTCs und dem entsprechenden Primärtumor bezüglich der Expression des Human Epidermal Growth Factor Rezeptor 2 (HER2) (94-96), des Östrogenrezeptors (ER) und Progesteronrezeptors (PR) festgestellt werden (97, 98). In einer Studie von Meng et al. konnten bei mBC-Patienten CTCs mit einer Expression von HER2 gefunden werden, im Gegensatz zu einer negativen Expression bei dem Primärtumor. Tatsächlich profitierten drei von vier dieser Patienten von einer zusätzlichen HER2-angepassten Therapie

(94). Der Nutzen der Therapieanpassung bei HER2 positiven CTCs gegenüber einem HER2 negativen Primärtumor wird aktuell in der DETECT-III-Studie untersucht (99). Bei Patienten mit mCRPC, bei denen CTCs mit der Splicevariante AR-V7 des Androgenrezeptors entdeckt wurden, zeigten sich Resistenzen gegenüber den Androgenrezeptorblockern Enzalutamid und Abirateron. In dieser Studie, welche 62 CTC-positive mCRPC-Patienten einschloss, sprach keiner der 18 Patienten mit der AR-V7-Splicevariante auf einen Androgenrezeptorblocker an. Die Positivität von AR-V7 in CTCs wurde statistisch mit einem niedrigeren Gesamtüberleben assoziiert (100).

Auch wenn die klinische Relevanz von EpCAM^{pos} CTCs durch mehrere Studien angedeutet werden konnte, ist es fraglich, welche biologische Rolle CTCs in der Kaskade der Metastasierung einnehmen. So wurde bei der Injektion von Patienten-CTCs mit kleinzelligem Lungenkarzinom in immunsupprimierte Mäuse gezeigt, dass CTCs das Potential zur Tumorinitiation besitzen (101). In einem Xenograft-Modell konnten EpCAM^{pos}/CD44^{pos}/CD47^{pos}/MET^{pos} CTCs als Ursprung für Metastasen in Knochen, Lunge und Leber beschrieben werden (102). Diese Daten deuten an, dass CTCs in vivo direkte Vorläuferzellen von Metastasen sein könnten. Für die weitere molekulare Analyse von CTCs ist jedoch die Analyse von einzelnen isolierten CTCs hilfreich. Neves et al. konnte ein Protokoll zur Isolierung von einzelnen via CellSearchTM angereicherten CTCs entwickeln. Hierbei werden die mittels CellSearchTM angereicherten Zellen mittels Durchflusszytometrie als einzelne CTCs, definiert als DAPI^{pos}/Zytokeratin^{pos}/CD45^{neg}, in Reaktionsgefäßen abgelegt und können für weitere Downstream-Analysen verwendet werden (103). So wurden während dieser Studie die Einzelzell-DNA der CTCs von Patienten mit mBC mittels Whole Genome Amplification (WGA) amplifiziert und genetische Aberrationen anhand von Array-basierter komparativer genomischer Hybridisierung (aCGH) detektiert. Hierbei zeigten nahezu alle CTCs für die Tumorentität typische Änderungen der Kopienanzahl. Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie belegt werden (104). Problematisch bei den genetischen Analysen von CTCs bleibt die sehr geringe Anzahl an Zellen, die pro Patient isoliert werden kann. So sind selbst bei manchen metastasierten Patienten nur eine CTC pro 10⁵ -10⁷ mononukleäre Zellen isolierbar (105). Die niedrige CTC-Zahl liegt unter anderem an dem geringen verwendeten Blutvolumen von 7,5-30 ml. Durch die sogenannte diagnostische Leukapherese können jedoch mittlerweile bis zu 2,5 l Patientenblut nach CTCs durchsucht werden (106).

Die geringe Zellzahl als Ausgangsmaterial ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass zu Beginn dieser Arbeit keine veröffentlichten epigenetischen Analysen von einzelnen CTCs vorlagen. Tatsächlich bieten CTCs als mögliche Schnittstelle zwischen Primärtumor und Metastase eine einzigartige Möglichkeit, den Einfluss der epigenetischen Regulation während der Metastasierung besser zu verstehen. In diesem Sinne ist ein epigenetisches Profiling von EMT-assoziierten Genen bei CTCs interessant, konnte doch bei diversen in vitro Modellen eine Assoziation des Methylierungsmusters von Genen, wie der miR200-Familie, zu dem Phänotyp beobachtet werden (46, 47). Hiermit könnten neue Hinweise auf den Phänotyp von CTCs und den Einfluss der Regulation von EMT-assoziierten Genen auf die Metastasierung gewonnen werden. Aufgrund der gut etablierten Methoden für die Isolierung bieten sich EpCAM^{pos} CTCs als Ausgangsmaterial für solche Analysen an. Vor dem Hintergrund einer Phänotypisierung anhand epigenetischer Marker ist jedoch kritisch zu sehen, dass EpCAM^{pos} CTCs anhand von epithelialen Markern angereichert und isoliert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass insbesondere nach dem Eintritt von CTCs in die Zirkulation, EpCAM herunterreguliert werden kann (107). Xenotransplantat Modelle deuten sogar an, dass eine Herunterregulation innerhalb der ersten Stunde in der Zirkulation möglich ist (108). Die Supprimierung von EpCAM kann unter anderem durch einen mesenchymalen Phänotypen-Shift der CTCs im Rahmen einer EMT erklärt werden (10). Solche CTCs würden folglich nur zu einem geringen Teil angereichert werden. Allerdings wurde festgestellt, dass die durch CellSearchTM erfasste Population auch CTCs mit einer geringen EpCAM-Expression (107, 109) und einer heterogenen Zytokeratin-Expression beinhaltet (110). Darüber hinaus scheinen sich die meisten CTCs nicht in einem reinen EMT-Status zu befinden (111-113), sondern weisen sowohl mesenchymale als auch epitheliale Merkmale auf. In diesem Sinne ist die Untersuchung von mesenchymalen Markern, wie die DNA-Methylierung der miR200-Familie bei EpCAM^{pos} CTCs von großem Interesse, um den Phänotyp dieser Zellen detaillierter zu charakterisieren und Hinweise auf einen möglichen EMT-Status zu sammeln.

2 Fragestellung

Der Einfluss der epigenetischen Regulation der miR200 Familie sowie von CDH1 hinsichtlich der Dynamik einer EMT/MET konnte bereits in mehreren unabhängigen Arbeiten an in vitro Modellen gezeigt werden. Dabei konnte der Methylierungsstatus der miR200 Familie mit der aktiven Transkription und mit dem Phänotyp von verschiedenen Zelllinien assoziiert werden. Darüber hinaus spiegelten sich auch phänotypische Veränderungen im Rahmen einer EMT/MET in dem Methylierungsstatus von miR200 wider. Die bisherigen Erkenntnisse beschränkten sich zu Beginn dieser Arbeit jedoch lediglich auf in vitro Modelle. CTCs bilden ein geeignetes Ausgangsmaterial, um Genpromotermethylierung von EMT-assoziierten Genen zu analysieren und so Rückschlüsse auf den Phänotyp dieser Zellen zu ziehen. Die Malignität und das metastatische Potenzial von CTCs, die anhand des epithelialen Markers EpCAM mit dem CellSearch™ System angereichert wurden, sind mittlerweile weitgehend anerkannt. Auch wenn diese Zellen anhand von epithelialen Markern angereichert werden, wird vermutet, dass die Plastizität dieser Zellen im Rahmen einer EMT durch Genpromoterhypermethylierung der EMT-assoziierten Gene miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 reguliert werden kann. Zu Beginn dieser Arbeit bestanden jedoch keinerlei Analysen über die Genpromotermethylierung von EMT-assoziierten Genen bei CTCs, was an der Seltenheit dieser Zellen liegen könnte, so dass Analysen meist auf Einzelzellniveau durchgeführt werden müssen.

Um die Methylierung EMT-assoziiierter Gene bei individuellen CTCs untersuchen zu können, musste im Rahmen dieser Arbeit zunächst das Protokoll multiplexed-single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (multiplexed-scAEBS) basierend auf Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (AEBS) etabliert werden. Multiplexed-scAEBS beinhaltet die Bisulfit-Konvertierung von in Agarose immobilisierter Einzelzell-DNA. Nachfolgend werden die EMT-assoziierten Gene miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 in einer Multiplex-PCR amplifiziert und eine separate Amplifikation von jedem einzelnen Genpromoter durchgeführt. Der Workflow wurde an Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667, der eher mesenchymalen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und der eher epithelialen Brustkrebszelllinie MCF-7 etabliert. Final wurde multiplexed-scAEBS bei EpCAM^{pos} CTCs von mBC- und mCRPC-Patienten angewendet. Der Hypothese nach sollte bei CTCs, obwohl diese anhand von epithelialen Markern angereichert und isoliert wurden, Genpromotermethylierung bei

den drei EMT-assoziierten Genen im Sinne einer mesenchymalen Differenzierung nachgewiesen werden.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien und deren Ursprung

Bezeichnung	Geschlecht	Ursprung des Gewebes	Quelle
GM14667	M	Non-aberrante Lymphozyten	Coriell Institut, New Jersey
MDA-MB-231	W	Brustkrebs, Adenokarzinom	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
MCF-7	W	Mammakarzinom, Adenokarzinom	Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf

3.2 Chemikalien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
carrier RNA (1µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Roche, Mannheim
DMEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Gene Ruler 50 bp	Thermo Scientific, Karlsruhe
Destilliertes Wasser	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (0,5 M)	G-Biosciences, St. Louis, USA
Ethanol (99,9%)	Merck, Darmstadt
GelRed (10.000x Konzentrat)	Biotium Inc., Fremont, USA
FCS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Heavy Mineral Oil	Sigma, Deisenhofen
Hydrochinon	Sigma, Deisenhofen
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Natriumdisulfid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (5 M)	Promega, Madison
Natriumhydroxid (10 M)	Sigma, Deisenhofen
Non Essential Amino Acids	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Propidium Iodid (3 µM)

Molecular Probes, Karlsruhe

1x PBS

Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

RPMI 1640 + Glutamax™-I

Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

SeaPlaque GTG Agarose

Biozym, Hessisch Oldendorf

TE Puffer (1x)

Promega, Mannheim

Tween 20 %

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.3 Enzyme

Trypsin 0,05% + 0,02% EDTA

Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Proteinase-K (20 mg/ml)

Roche, Mannheim

3.4 Instrumente

S 1000 Thermal Cycler

BioRad, München

C 1000 Thermal Cycler

BioRad, München

Infinite M200 Spektrometer

Tecan, Crailsheim

Versa Doc Gel Imaging System

BioRad, München

Heizblock Dry Bath System

StarLab, Hamburg

Heizblock neoBlock II

neoLab, Heidelberg

Thermomixer comfort 1,5 ml

Eppendorf, Wesseling Berzdorf

Thermostatic Waterbath WBS

Fried Electric, Haifa, Israel

Heraeus Multifuge X1R Zentrifuge

Thermo Scientific, Karlsruhe

Heraeus Fresco 17 Zentrifuge

Thermo Scientific, Karlsruhe

Mikrozentrifuge Galaxy Mini

VWR International GmbH, Darmstadt

MoFlo XDP Sorter

Beckmann Coulter, Sinsheim

CellSearch™-System

Menarini Silicon Biosystems Inc,
Huntington Valley USA

3.5 Software

Bisulfite Primer Seeker 12S	ZymoResearch, Freiburg
http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker	
BiQAnalyzer	Max Planck Institut für Informatik, Saarbrücken
	http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/
i.control 1.9	Tecan, Crailsheim
ChromasLite 2.6.4	Technelysium, Sout Brisbane, Australien

3.6 Kits

EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
CellSearch Circulating Tumor Cell Kit	Menarini Silicon Biosystems Inc, Huntington Valley USA

3.7 Selbsthergestellte Lösungen

Lösung A (25 mM EDTA + 75 mM NaCl)	2,5 ml EDTA (0,5M) + 750 µl NaCl (5 M) ad. 50 ml Aqua dest.
NaOH (2 M)	10 ml NaOH (10 M) ad 50 ml Aqua dest.
NaOH (0,3 M)	1,5 ml NaOH (10 M) ad 50 ml Aqua dest.
Hydrochinon-Lösung	55 mg Hydrochinon gelöst in 500 ml Aqua dest. (die Lösung wurde bei 50°C

so lange inkubiert, bis das Salz sichtbar gelöst war)

Pre-Bisulfit-Lösung

1,9 g Natriumdisulfid gelöst in 2,5 ml Aqua dest.

+ 750 µl NaOH (2 M)

(die Lösung wurde bei 50°C so lange inkubiert, bis das Salz sichtbar gelöst war)

Bisulfit-Lösung

komplette Pre-Bisulfit-Lösung

+ komplette Hydrochinon-Lösung

OPA-Puffer

1,25 g Trisacetat (99%)

5 ml Mg-Acetat (100 mM)

5 ml K-Acetat (500 mM)

ad 50 ml Aqua dest.

4 Methoden

4.1 Untersuchtes Zellmaterial von Patienten

Für die Analysen von CTCs und CD45^{pos} Zellen wurden bereits mit CellSearchTM prozessierte Proben von Patienten mit mBC sowie Patienten mit mCRPC verwendet. Die entsprechenden Analysen von CTCs und CD45^{pos} Zellen aus klinischen Proben von mBC-Patienten (Studien-Aktenzeichen 3430) sowie von mCRPC-Patienten (Studien-Aktenzeichen 5654) wurden von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf positiv beurteilt.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Kultivierung der Lymphozytenzelllinie GM14667

Die Lymphozytenzelllinie GM14667 wurde in 10 ml Kulturmedium RPMI1640 + GlutaMax mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte als Suspensionskultur in einer 75 cm² Kulturflasche kultiviert. Die Zelllinie GM14667 wurde alle drei Tage 1:4 passagiert. Hierfür wurde die Zellsuspension für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 15 ml PBS resuspendiert, erneut für 5 min bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und mit einer 1:4 Verdünnung neu ausgesät.

4.2.2 Kultivierung der Brustkrebszelllinie MCF-7

Die adhärent wachsende epitheliale Zelllinie MCF-7 wurde in 10 ml Kulturmedium RPMI1640 + GlutaMax mit 15-20% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte in einer 75 cm² Kulturflasche kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit 3 ml Trypsin von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde mit 12 ml des Kulturmediums gestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 15 ml PBS resuspendiert, erneut für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in dem Kulturmedium resuspendiert und mit einer 1:3 - 1:6 Verdünnung neu ausgesät.

4.2.3 Kultivierung der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231

Die adhärent wachsende mesenchymale Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurde, wie in 4.2.2 beschrieben, kultiviert und passagiert. Jedoch wurde als Kulturmedium DMEM plus GlutaMax mit 10% FCS plus 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 1% Penicilin/Streptomycin benutzt.

4.3 Isolierung von Zellmaterial

4.3.1 Isolierung von Zelllinien-Zellen durch Fluorescence-activated cell sorting (FACS) mittels MoFlo XDP Sorter

Für die Etablierung und Validierung von multiplexed-scAEBS wurden verschiedene Zellzahlen der Zelllinien GM14667, MDA-MB-231 und MCF-7 in 200 µl oder 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit dem MoFlo XDP Sorter abgelegt. Während der Passage aller drei Zelllinien wurden Zellen in 1 ml 1xPBS gelöst. Um lebende Zellen von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen mit 3 µl Propidium Iodid (PI) (3 µM) gefärbt und für 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellablage mittels des MoFLO XDP Sorter beinhaltet die Analyse der Vorwärtsstreuung (FSC= Forward Scatter) und Seitwärtsstreuung (SSC= Sideward Scatter) des Lichts, um Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität zu charakterisieren. Die Höhe der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC-Height und SSC-Height) wurde verwendet, um intakte Zellen von Zell-Fragmenten zu unterscheiden. Die Analyse der PI-Färbung wurde benutzt, um lebende Zellen von toten Zellen zu diskriminieren. Die Analyse der Signalweite der Seitwärtsstreuung (SSC-Width) wurde genutzt, um die Ablage von einzelnen Zellen zu gewährleisten und Zellagglomerate auszuschließen. Es wurden nur Zellen unter den Bedingungen $\text{FSC-Height}^{\text{high}}/\text{PI}^{\text{neg}}/\text{SSC-Width}^{\text{low}}$ abgelegt (Abbildung 4.1). Die Zellen wurden anschließend entweder direkt bearbeitet oder bei -20°C eingefroren.

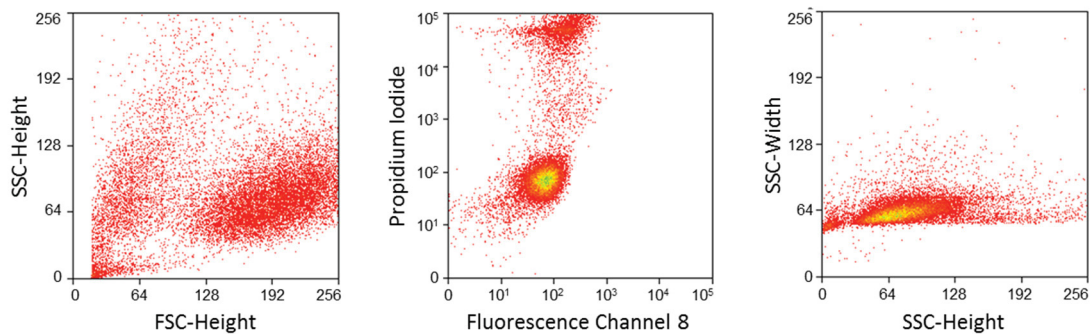


Abbildung 4.1 FACS-Analyse einer Probe mit Lymphozyten von GM14667 mit den zuvor festgelegten Bedingungen R1, R2, R3 zum Ablegen von intakten Zellen. Eine intakte Zelle wurde nur definiert als $\text{FSC-Height}^{\text{high}}/\text{PI}^{\text{neg}}/\text{SSC-Width}^{\text{low}}$ abgelegt. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

4.3.2 Isolierung und Analyse von einzelnen CTCs und CD45^{pos} Zellen von klinischen Proben

Für die hier beschriebenen Experimente wurden CTC-positive Blutproben von 11 mBC-Patienten und von sechs mCRPC-Patienten verwendet. Die Prozessierung und Analyse der CTCs erfolgte anhand des CellSearch Circulating Tumour Cell Kit mit dem CellSearchTM-System nach den Herstellerangaben. Die folgende Isolierung der einzelnen CTCs erfolgte mittels MoFloXDP-Sorter in einzelne leere 200 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße. Es wurden nur $\text{DAPI}^{\text{pos}}/\text{CK}^{\text{pos}}/\text{CD45}^{\text{neg}}$ CTCs isoliert, wie es bereits beschrieben wurde (115). Zusätzlich wurde die Seitwärtsstreuung genutzt, um einzelne Zellen von Zellkonglomeraten zu differenzieren. Die Detektion und die Isolation waren nicht Teil der hier beschriebenen Dissertationsarbeit. Für die vorliegende Arbeit wurden die aus den CellSearch Cartridges isolierten CTCs und Leukozyten zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 94 CTCs von 11 mBC-Patienten und 65 CTCs von sechs mCRPC-Patienten sowie 30 einzelne CD45^{pos} Zellen von drei verschiedenen Patienten mit der nachfolgend beschriebenen multiplexed-scAEBS Methode (ab 4.7) analysiert.

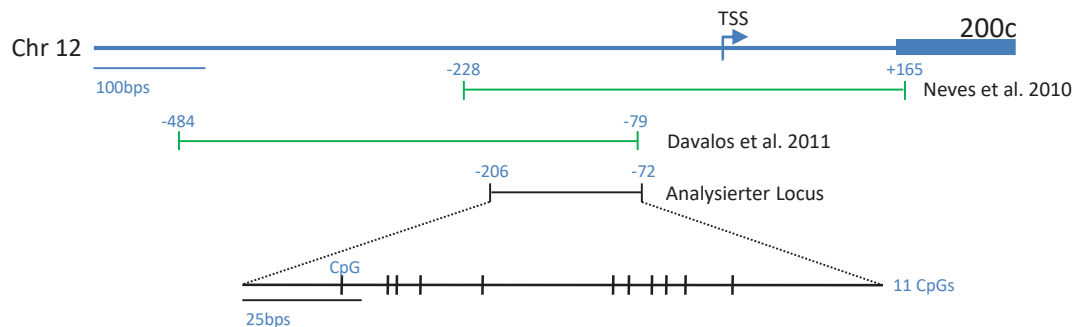
4.4 Etablierung der Primer für miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1

4.4.1 Primerdesign für die Analyse von bisulfitkonvertierter DNA

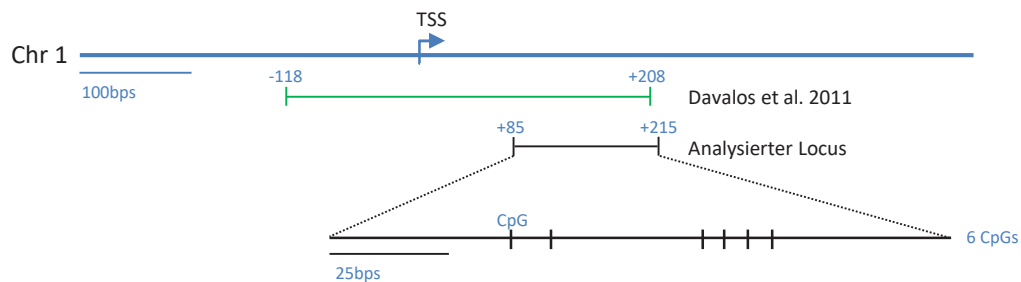
Für die Methylierungsanalyse von bscDNA der Genpromoter von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 auf Einzelzellniveau wurden neue Primerpaare konzipiert. Innerhalb der entsprechenden Genpromotoren wurde eine Region ausgewählt, die bereits mehrfach in der Literatur mittels Bisulfit-Sequenzierung an großen Mengen DNA

von diversen Zelllinien analysiert wurden (14, 15, 46, 47) (Abbildung 4.2). Die entsprechenden Genpromoterregionen wurden mit der Software Bisulfite Primer Seeker 12S von ZymoResearch (<http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker>) für mögliche Primerpaare analysiert. Alle während dieser Arbeit gebrauchten Primer (Tabelle 2) wurden bei der Firma MWG Eurofins Genomics HPSF-aufgereinigt bestellt und mit Aqua dest. auf 100 pm/µl verdünnt.

miR200c/141



miR200b/a/429



CDH1

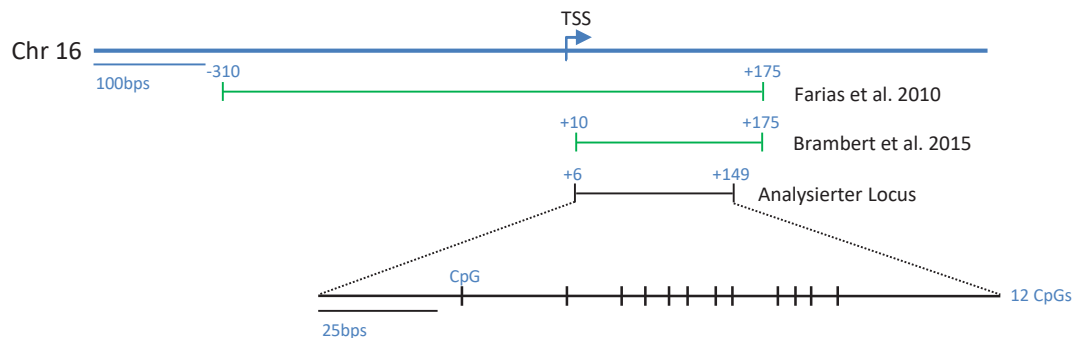


Abbildung 4.2 Abgebildet sind die Ausschnitte der drei Promoterregionen von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1. In jedem Diagramm ist die Promoterregion durch die blaue Linie, die den Transkriptionsstart (TSS) flankiert, dargestellt. Die grünen Linien zeigen mittels Bisulfit-Sequenzierung bereits analysierte Abschnitte, welche zuvor publiziert wurden (14, 15, 46, 47). Die schwarzen Linien repräsentieren die während dieser Arbeit analysierten Abschnitte mit einer zusätzlichen höheren Auflösung, um die einzelnen CpG-Lokalisationen (vertikale schwarze Striche) darzustellen. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

Tabelle 2 Primersequenzen

Locus	Orientierung	Sequenz	Amplikon Länge
miR200c/ 141	forward	GGGATGAGGGTGGGTAAAT	134 bps
	reverse	RAAACCCAAATTACAATCCAAAC	
miR200b/a /429	forward	ATTTGTGTAGGTTTGAATTGATTTTTGTGTTAGGG	130 bps
	reverse	TAAATACTCTACCTCAACCAAAATCAAACCTCAAAAC	
CDH1	forward	GTYGGAATTGTAAAGTATTTGTGAGTTTG	143 bps
	reverse	AAAACTACRACTCCAAAAACCCATAACTAACC	

4.4.2 Primervalidierung an bsc-DNA

Die Primerpaare wurden an verschiedenen Mengen von bscDNA von der Zelllinie MDA-MB-231 getestet. Hierfür wurde DNA von MDA-MB-231 mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert und in 20 µl Aqua dest. gelöst. 1 µg DNA wurde mit dem EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen) konvertiert und in 20 µl Aqua dest. gelöst. Die bscDNA wurde 1:10, 1:100 sowie 1:1000 mit Aqua dest. verdünnt als PCR Template benutzt. Das PCR-Programm wurde mit einem 51,2-60,9°C Temperaturgradienten durchgeführt, um die effizienteste Annealing-Temperatur zu bestimmen (Tabelle 3).

PCR Reaktionsmix für eine Probe:

12,5	µl	PyroMark PCR Master Mix
2,5	µl	Coral Load Puffer
0,05	µl	Primer ^{forward} (100 pmol/µl)
0,05	µl	Primer ^{reverse} (100 pmol/µl)
8,9	µl	Aqua dest.
1	µl	DNA Template

Tabelle 3 PCR Programm für die Primeretablierung mit dem Temperaturgradient a-e

1x	50x				1x	-
95°C für 15min	94°C für 30 sec	a) 60,9°C	für je 30 sec	72 °C für 30 sec	72 °C für 10 min	4°C ohne Zeitbegren- zung
		b) 58,7°C				
		c) 55,9°C				
		d) 52,3°C				
		e) 51,2°C				

4.4.3 Gelelektrophorese

Um den Erfolg der Amplifikation zu evaluieren, wurden von dem PCR-Amplifikat je 5 µl PCR-Produkt auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurden 5 µl des 50 bp DNA-Leiter (GenRuler) verwendet, um die erwartete spezifische Größe des Amplikons zu überprüfen und mögliche unspezifische PCR-Produkte auszuschließen. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mittels Elektrophorese bei 140 V für 40 min. Die Gele wurden mithilfe des Versadoc Imaging-Systems dokumentiert.

4.4.4 Analyse der Amplifikate mittels Sanger-Sequenzierung

Nachdem der Amplifikationserfolg mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte, wurden positive Proben für die Sanger Sequenzierung ausgewählt, um die Spezifität des PCR-Produktes final zu bestätigen. Hierfür wurden 20 µl des 25 µl PCR-Reaktionsmix mit dem MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt und in 22 µl Aqua dest. gelöst. 2 µl wurden zur Messung der DNA-Konzentration mittels des Infinite M200 Spektrometer benutzt. Die restlichen 20 µl wurden mit Aqua dest. auf 10 ng/µl verdünnt. Die Proben wurden von der Firma GATC Biotech per Sanger-Sequenzierung prozessiert. Die Primer für die Sequenzierung (Tabelle 4) wurden mit einer Konzentration von 5 pM mitgeschickt. Die Sequenzen wurden mit der Software BiQ-Analyzer oder manuell mit ChromasLite ausgewertet (4.10).

Tabelle 4 Primersequenzen für die Sequenzierung

Locus	Orientierung	Sequenz
miR200c/141	forward	GGGATGAGGGTGGGTAAAT
	reverse	RAAACCCAAATTACAATCC
miR200b/a/429	forward	ATTTGTGTAGGTTTGAATTG
	reverse	TAAATACTCTACCTCAACCA
CDH1	forward	GTYGGAATTGTAAAGTATTTG
	reverse	AAAACTACRACTCCAAAAA

4.5 Agarose-Embedded Bisulfite Sequencing nach Tierling (AEBS_{Tierling})

Aufgrund der in Kapitel 1.2.1.3 beschriebenen Vorteile wurde das Protokoll AEBS_{Tierling} (75) als Ausgangsprotokoll für die schrittweise Optimierung eines Einzelzellprotokolls für Bisulfit-Sequenzierung genutzt. Zuvor wurden jedoch je viermal 10, 20, 30, 40 und 50 Zellen sowie je zweimal 100 Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit je 5 µl 1x PBS, gemäß dem in 4.3.1 beschriebenen Procedere, abgelegt. Anschließend wurde die Bisulfit-Konvertierung exakt nach dem Protokoll von AEBS_{Tierling}, wie in den nachfolgenden Kapiteln ab 4.5.1 beschrieben, durchgeführt (Abbildung 4.3). Es wurden vier leere 1,5 ml Reaktionsgefäße parallel als Negativkontrollen prozessiert.

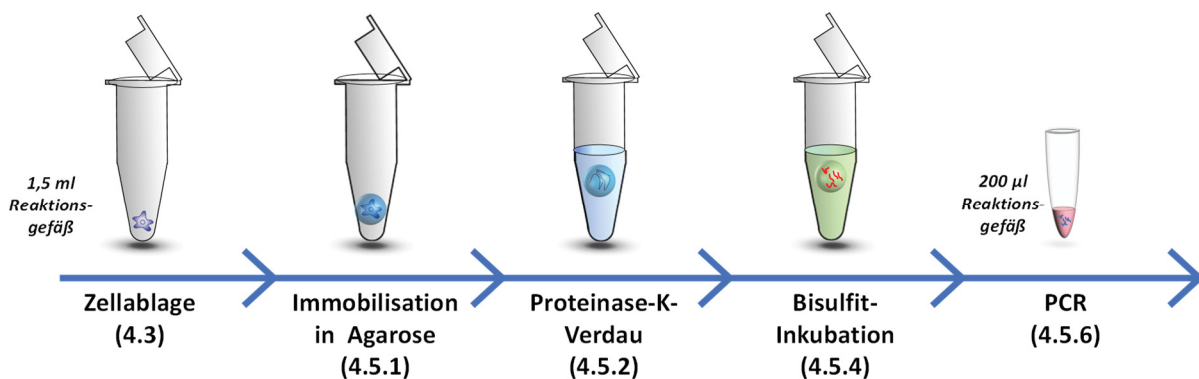


Abbildung 4.3 Illustration des originalen Protokolls AEBS_{Tierling}. Nicht dargestellt sind die Aufreinigung des Agarose-Beads vor und nach der Bisulfit-Inkubation. Während alle Schritte von der Zellablage an in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß durchgeführt werden, wird die PCR in einem separaten 200 µl Eppendorf-Gefäß durchgeführt.

4.5.1 Immobilisation der Zellen in Agarose

Nach der Zellablage wurde den Proben 15 µl von 2%iger Low Melting Temperature Agarose (SeaPlaque GTG Agarose) hinzugefügt, welche zuvor auf 75°C erhitzt wurde. Die Agarose wurde anschließend mit 200 µl Mineralöl (Heavy Mineral Oil) überdeckt. Anschließend wurden die Proben für 10 min in einem Wasserbad (Thermostatic Waterbath WBS) bei kochendem Wasser inkubiert. Hierdurch werden die Zellen zerstört und es entwickelt sich ein kleines Agarose-Kügelchen (Agarose-Bead). Die Proben wurden dann 10 min auf Eis inkubiert, bis der Agarose-Bead fest war. Das Öl wurde nun wieder vorsichtig mit der Pipette entfernt.

4.5.2 Proteinase-K-Verdau

Nachdem das Öl vorsichtig entfernt worden war, wurde den Proben 400 µl der Lösung A (25 mM EDTA und 75 mM NaCl) und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt. Um

rückständiges Öl zwischen dem Bead und der Lösung zu vermeiden, wurden die Proben kurz anzentrifugiert. Die Proben wurden über Nacht bei 50°C in einem Thermoblock (neoBlock II) für den Proteinase-K-Verdau inkubiert. Der Proteinase K-Mix wurde am nächsten Tag vorsichtig mit der Pipette entfernt.

4.5.3 Aufreinigung des Agarose-Beads nach dem Proteinase-K-Verdau

Nachdem der Proteinase-K-Mix entfernt wurde, wurde der Bead in verschiedenen Puffern gewaschen, um alle rückständigen Reagenzien des Proteinase-K-Mix vollständig zu entfernen. Dies geschah in folgenden Schritten:

1. 400 µl TE (1x) wurden über den Bead pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das TE wurde wieder vorsichtig mittels Pipette entfernt.
2. Wiederholung von Schritt 1.
3. 400 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und sofort wieder entfernt.
4. 400 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das NaOH wieder vorsichtig mittels Pipette entfernt.
5. Wiederholung von Schritt 4.
6. Nacheinander Wiederholung von Schritt 1 und 2.

4.5.4 Bisulfit-Konvertierung

Nach der Aufreinigung des Agarose-Beads wurden 400 µl der frisch zubereiteten Bisulfit-Lösung (Zubereitung s. 3.7) über den Bead pipettiert und mit 200 µl von schwerem Mineralöl überdeckt. Die Proben wurden dann für 3,5 h bei 50°C in einem Heizblock (neoblock II) inkubiert. Hiernach wurden die Proben für 10 min auf Eis gekühlt, um den Agarose-Bead zu festigen. Das Öl und die Bisulfit-Lösung wurden vorsichtig mittels Pipette entfernt.

4.5.5 Aufreinigung des Agarose-Beads nach der Bisulfit-Inkubation

Nachdem die Bisulfit-Lösung entfernt wurde, wurde der Bead in verschiedenen Puffern gewaschen, um alle rückständigen Reagenzien vollständig zu entfernen. Dies geschah in folgenden Schritten:

1. 400 µl TE (1x) wurden über den Bead pipettiert und sofort wieder mittels Pipette entfernt.

2. 400 µl TE (1x) wurden über den Bead pipettiert und der Bead hierin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das TE wieder vorsichtig mittels Pipette entfernt.
3. Wiederholung von Schritt 2.
4. 400 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und sofort wieder mittels Pipette entfernt.
5. 400 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das NaOH wieder vorsichtig mit der Pipette entfernt.
6. Wiederholung von Schritt 5.
7. Nacheinander Wiederholung von Schritt 2 und 3.

4.5.6 Locus-spezifische PCR von miR200c/141

Nach der Bisulfit-Konvertierung wurde eine locus-spezifische PCR des miR200/141 Genpromoter durchgeführt. Hierfür wurde der Bead bei 75°C erwärmt und 3 µl des Agarose-Beads als Template in den PCR-Reaktionsmix pipettiert. Das PCR-Programm ist in Tabelle 5 dargestellt. Zum Schluss wurden 5 µl des PCR-Produkts mittels Gelelektrophorese ausgewertet (4.4.3).

PCR Reaktionsmix für eine Probe:

12,5 µl	PyroMark PCR Master Mix
2,5 µl	Coral Load Puffer
0,05 µl	miR200c/141 Primer ^{Forward} (100pmol/µl)
0,05 µl	miR200c/141 Primer ^{Reverse} (100pmol/µl)
6,9 µl	Aqua dest.
3 µl	Agarose-DNA Template

Tabelle 5 PCR-Programm für die Amplifikation von miR200c/141

1x	50x			1x	-
95°C für 15 min	94°C für 30 sec	58,7°C für 30 sec	72 °C für 30 sec	72 °C für 10 min	4°C für unbe- grenzte Zeit

4.6 Optimierung von AEBS_{Tierling} zu scAEBS_{pre}

Für die Optimierung von AEBS_{Tierling} zu einem Einzelzellprotokoll wurde zunächst das Protokoll scAEBS_{pre} entwickelt. In diesem Protokoll wurden alle Volumina von

AEBS^{Tierling} um den Faktor 0,4 reduziert, um alle Schritte von der Zellablage bis zur PCR in einem 0,2 µl Reaktionsgefäß durchführen zu können. Hierdurch wird der DNA-Verlust durch Pipettenttransfer in andere Reaktionsgefäße minimiert. Ebenfalls wurden die Inkubationszeiten der Waschschrirte von 15 min auf 5 min reduziert (Abbildung 6.1). Ansonsten wurden alle Reaktionsschritte und Konzentrationen, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, beibehalten.

4.6.1 Validierung von scAEBS_{pre}

Für die Validierung von scAEBS_{pre} wurden je Triplikate mit einer, 10, 20 und 50 Zellen sowie je eine Kontrolle mit 100 Zellen der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 gemäß 4.3.1 in 200 µl Eppendorf-Gefäße mit 2 µl 1xPBS abgelegt und mittels scAEBS_{pre} prozessiert. Parallel wurden je drei Negativkontrollen (leere Reaktionsgefäße) prozessiert, um Kontaminationen auszuschließen. Hierbei handelte es sich um leere 200 µl Reaktionsgefäße, die genauso wie die Proben mit Zellen bearbeitet wurden. Für die abschließende PCR des miR200c/141-Genpromoters wurde der Agarose Bead für 5 min bei 75°C in einem Heizblock (neoBlock II) erhitzt und der PCR-Reaktionsmix auf den geschmolzenen Bead pipettiert. Die Probe wurde kurz gevortext und anzentrifugiert, damit sich die Agarose ganz in dem PCR-Reaktionsmix löst. Das PCR-Programm ist in Tabelle 5 dargestellt.

PCR Reaktionsmix für eine Probe:

12,5	µl	PyroMark PCR Master Mix
2,5	µl	Coral Load Puffer
0,05	µl	miR200c/141 Primer ^{Forward} (100 pmol/µl)
0,05	µl	miR200c/141 Primer ^{Reverse} (100 pmol/µl)
1,9	µl	Aqua dest.
8	µl	Agarose-DNA Template

5 µl von jedem PCR-Produkt wurden erneut für die Gelelektrophorese gemäß 4.4.3 benutzt. Hierfür mussten die PCR-Proben wegen der gehärteten Agarose erneut für 5 min auf 75°C erhitzt werden, bevor das Gel beladen werden konnte.

4.7 Single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (scAEBS)

Um die Effizienz von scAEBS_{pre} weiter zu erhöhen, wurde die Einzelzelle nach der Zellablage zuerst mittels Proteinase-K lysiert, die Einzelzell-DNA anschließend mit carrier RNA präzipitiert und dann die präzipitierte DNA in Agarose immobilisiert (Abbildung 4.4). Somit sollte der DNA-Verlust durch Diffusion aus dem Agarose-Bead vermindert werden. Ebenfalls wurde die Inkubationstemperatur während der Bisulfit-Konvertierung von 50°C auf 56°C erhöht, um die Effizienz der Konversion zu verbessern. Das finale Protokoll wurde single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (scAEBS) genannt. Das Protokoll wird nachfolgend Schritt für Schritt beschrieben.

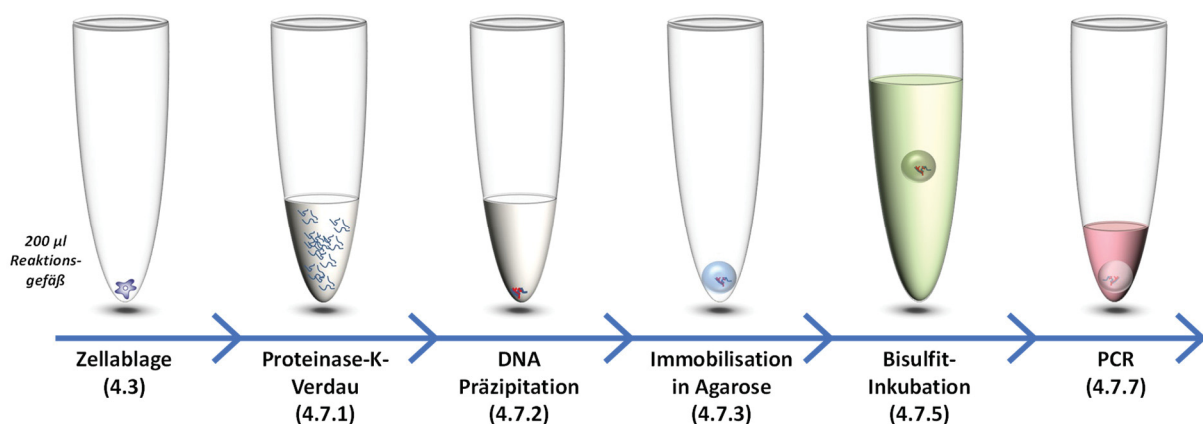


Abbildung 4.4 Illustration von scAEBS. Alle Schritte von der Zellablage bis einschließlich zur PCR wurden in einem 200 µl Eppendorf-Gefäß durchgeführt. Nicht dargestellt sind die Aufreinigung des Agarose-Beads vor und nach der Bisulfit-Inkubation.

4.7.1 Proteinase-K-Verdau

Nach der Einzelzellablage gemäß 4.3 wurde der Einzelzelle 2 µl Proteinase K-Lösung hinzugefügt:

Proteinase-K-Lösung für eine Zelle

0,2 µl	OPA Puffer (genaue Zusammensetzung s. 3.7)
0,13 µl	Igepal 10%
0,13 µl	Tween 10%
0,26 µl	Proteinase-K (10 mg/ml)
1,28 µl	Aqua dest.

Die Probe wurde in einem Thermocycler (S1000/C1000 Thermal Cycler) für 10 h bei 42°C und anschließend für 10 min bei 80°C inkubiert.

4.7.2 Einzelzell DNA Präzipitation

Nach dem Proteinase-K-Verdau wurden der Probe folgende Reagenzien der Reihe nach hinzugefügt:

1	µl	Carrier RNA (1µg/µl)
0,15	µl	NaCl (5 M)
9	µl	Ethanol (75%)

Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20 min bei 4°C mit 20.000 x g zentrifugiert. Nach der 20-minütigen Zentrifugation wurde die Zentrifuge ohne den Gebrauch der Bremsen auslaufen gelassen, um das Präzipitat während des Bremsvorgangs nicht aufzuwirbeln. Nach der Zentrifugation wurden 10,15 µl von der Probe vorsichtig abpipettiert (ohne hierbei das Präzipitat am Boden zu berühren) und verworfen.

4.7.3 Immobilisierung der Einzelzell-DNA in Agarose

Den Proben wurde nun 6 µl von 2% SeaPlaque GTG Agarose hinzugefügt, die zuvor auf 75°C erhitzt worden war. Die Proben wurden kurz gevortext und anzentrifugiert, bevor 80 µl schweres Mineralöl über die Agarose pipettiert wurde. Die Proben wurden anschließend bei 75°C in einem Thermoblock für 10 min erhitzt. Die Proben wurden dann für 10 min auf Eis gekühlt und das Öl wieder vorsichtig abpipettiert.

4.7.4 Aufreinigung des Agarose-Beads

Nachdem das Öl entfernt wurde, wurde der Bead in verschiedenen Puffern gewaschen, um alle rückständigen Reagenzien des Proteinase-K-Mix und der Präzipitation vollständig zu entfernen und die DNA vor der Bisulfit-Konvertierung durch NaOH zu denaturieren. Dies geschah in folgenden Schritten:

1. 160 µl TE (1x) wurden über den Bead pipettiert und der Bead hierin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das TE wurde wieder vorsichtig abpipettiert.
2. Wiederholung von Schritt 1.
3. 160 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und sofort wieder abpipettiert.

4. 160 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde das NaOH wieder vorsichtig abpipettiert.
5. Wiederholung von Schritt 4.
6. Nacheinander Wiederholung von Schritt 1 und 2.

4.7.5 Bisulfit-Konvertierung der Einzelzell-DNA

Für die Bisulfit-Konvertierung wurde die Bisulfit-Lösung wie in 3.7 vorbereitet. 160 µl der Bisulfit-Lösung wurde den Proben hinzugefügt und mit 80 µl von schwerem Mineralöl überdeckt. Die Proben wurden dann für 3,5 h in einem Heizblock (neoBlock II) bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis gekühlt und die Bisulfit-Lösung sowie das Öl vorsichtig mit der Pipette entfernt.

4.7.6 Aufreinigung des Agarose-Beads von der Bisulfit-Lösung

Nachdem die Bisulfit-Lösung entfernt wurde, wurde der Bead in verschiedenen Puffern gewaschen, um alle rückständigen Reagenzien vollständig zu entfernen. Durch die Inkubation in NaOH wird ebenfalls durch Desulfonierung die chemische Reaktion der Bisulfit-Konvertierung beendet. Dies geschah in folgenden Schritten:

1. 160 µl TE (1x) wurden über den Bead pipettiert und sofort wieder abpipettiert.
2. 160 µl TE (1x) wurden über den Bead pipettiert und der Bead hierin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das TE wurde wieder vorsichtig abpipettiert.
3. Wiederholung von Schritt 2.
4. 160 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und sofort wieder mittels Pipette entfernt.
5. 160 µl NaOH (0,3 M) wurden über den Bead pipettiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde das TE wieder abpipettiert.
6. Wiederholung von Schritt 5.
7. Nacheinander Wiederholung von Schritt 2 und 3.

4.7.7 Amplifikation des miR200c/141 Genpromoter nach scAEBS

ScAEBS wurde an zehn Proben mit je Einzelzellen und zehn Proben mit je fünf Zellen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 sowie an 30 Proben mit je Einzelzellen und 30 Proben mit je fünf Zellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 nach PCR des miR200c/141-Genpromoters und Gelelektrophorese validiert. Parallel wurden 16

Negativkontrollen (initial leere 200 µl Reaktionsgefäße) prozessiert. Die Zellen wurden, wie in 4.3.1 beschrieben, isoliert. Die PCR und Gelelektrophorese wurden nach Kapitel 4.6.1 durchgeführt. Entgegen dem finalen Protokoll von scAEBS (4.7) wurden die Proben bei einer Temperatur von 50°C während der Bisulfit-Inkubation inkubiert. Nach Gelelektrophorese (4.4.3) wurden die positiven Banden gemäß 4.4.4 sequenziert.

4.8 Amplifikation der miR200/141, miR200a/b und CDH1 Genpromotoren nach scAEBS (multiplexed-scAEBS)

Um weitere Genpromotoren pro Einzelzelle analysieren zu können, wurde die abschließende PCR um die Genpromotoren miR200b/141 und CDH1 erweitert (multiplexed-scAEBS). Hierfür wurde nach der Aufreinigung von dem Bisulfit-Salz (4.7.6) der Agarose-Bead auf 75°C erhitzt und anschließend der PCR Reaktionsmix über den Bead pipettiert (Abbildung 4.5). Das verwendete PCR Programm ist in Tabelle 6 dargestellt.

PCR Reaktionsmix für eine Probe:

12,5	µl	PyroMark PCR Master Mix
2,5	µl	Coral Load Puffer
0,05	µl	Primer ^{forward} miR200c/141 (100 pmol/µl)
0,05	µl	Primer ^{reverse} miR200c/141 (100 pmol/µl)
0,05	µl	Primer ^{forward} miR200b/a/429 (100 pmol/µl)
0,05	µl	Primer ^{reverse} miR200b/a/429 (100 pmol/µl)
0,05	µl	Primer ^{forward} CDH1 (100 pmol/µl)
0,05	µl	Primer ^{reverse} CDH1 (100 pmol/µl)
1,7	µl	Aqua dest.
8	µl	Agarose-DNA Template

Tabelle 6 PCR-Programm für die Multiplex-PCR

1x	25x			1x	-
95°C für 15 min	94°C für 30 sec	58,7°C für 30 sec	72°C für 30 sec	72 °C für je 5 min	4°C für unbegrenzte Zeit

Nach der Multiplex-PCR wurde jeder der drei Genloci separat in einer spezifischen PCR amplifiziert (Abbildung 4.5). Hierfür wurde die Probe der Multiplex-PCR auf 75°C erhitzt und 1 µl der Multiplex-PCR-Probe als DNA-Template genutzt. Das PCR-Programm wurde gemäß Tabelle 7 durchgeführt.

PCR Reaktionsmix für eine Probe:

12,5	µl	PyroMark PCR Master Mix
2,5	µl	Coral Load Puffer
0,05	µl	Primer ^{forward} (für je miR200c/141, miR200b/a/429 oder CDH1)
0,05	µl	Primer ^{reverse} (für je miR200c/141, miR200b/a/429 oder CDH1)
8,9	µl	Aqua dest.
1	µl	Multiplex-PCR-DNA-Template

Tabelle 7 PCR-Programm für die spezifische PCR

1x	50x			1x	-
95°C für 15 min	94°C für 30 sec	58,7°C für 30 sec	72°C für 30 sec	72 °C für je 5 min	4°C für unbegrenzte Zeit

Nach der PCR wurde eine Gelelektrophorese wie in Kapitel 4.4.3 durchgeführt. Proben, die nach der Gelelektrophorese die erwartete Bande aufwiesen, wurden gemäß 4.4.4 nach Sanger sequenziert. Der gesamte Workflow aus Bisulfit-Behandlung, Multiplex-PCR, spezifischer-PCR und Sequenzierung wurde multiplexed-scAEBS genannt.

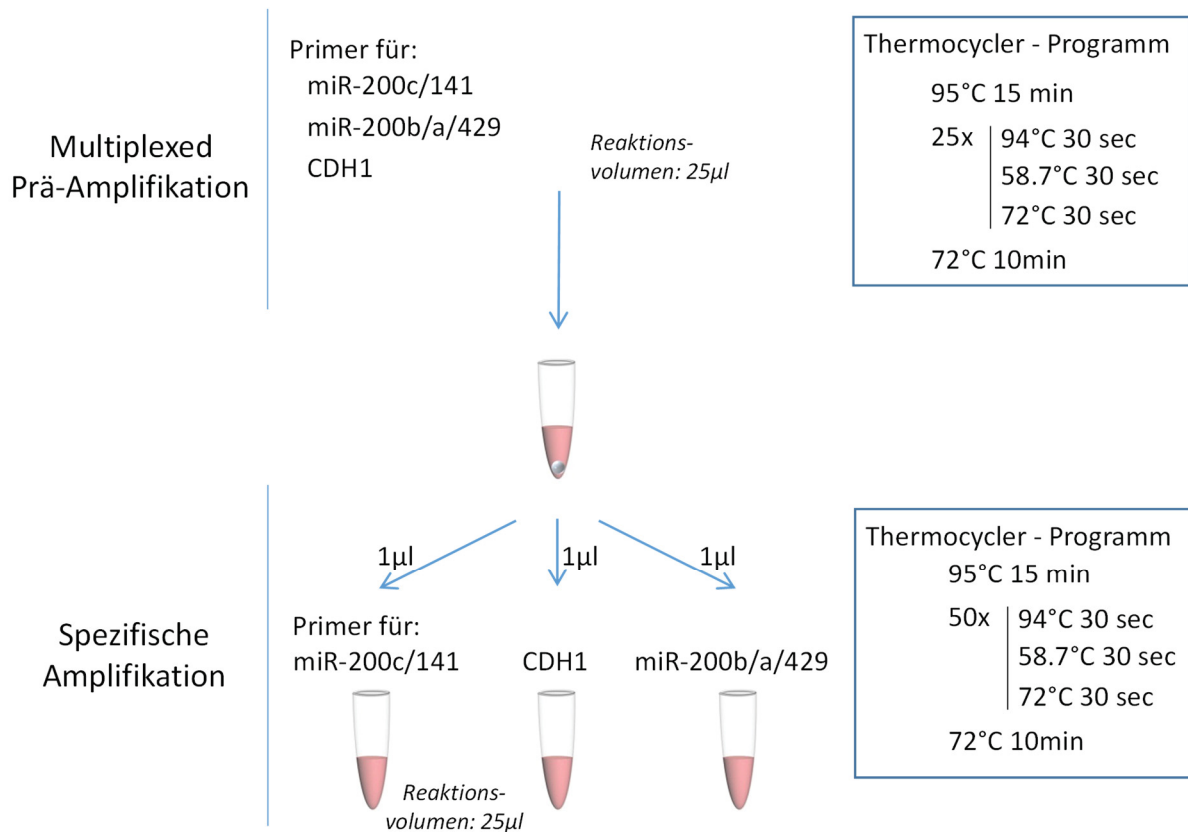


Abbildung 4.5 PCR-Strategie nach Bisulfit-Behandlung mit scAEBS. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

4.9 Analyse von Zelllinien-Zellen und CellSave-fixierten MCF-7 Zellen mittels multiplexed-scAEBS

Der Workflow von multiplexed-scAEBS wurde zunächst an acht Einzelzellen von GM14667 angewendet. Hierbei wurde allerdings eine Bisulfit-Inkubationstemperatur von 50°C verwendet. Parallel wurden zwei Negativkontrollen (initial leere 200 µl Reaktionsgefäße) prozessiert. In einem weiteren Schritt wurde multiplexed-scAEBS an je 20 Einzelzellen von GM14667 und MDA-MB-231 mit der oben angegebenen Bisulfit-Inkubationstemperatur von 56°C behandelt. Die Zellen wurden zuvor gemäß 4.3.1 isoliert. Parallel wurden acht Negativkontrollen (initial leere 200 µl Reaktionsgefäße) prozessiert.

Um zu verstehen, ob das multiplexed-scAEBS Protokoll auch mit CellSearch™ prozessierten Proben kombinierbar ist, wurden 2000 MCF-7 Zellen (in 1 ml PBS) in ein CellSave Röhrchen mit 7,5 ml Blut eines gesunden Donors pipettiert. Die Probe wurde entsprechend den klinischen Proben wie in Kapitel 4.3.2 mit CellSearch™ prozessiert, 20 Einzelzellen mittels FACS isoliert und mit multiplexed-scAEBS (4.8) analysiert.

Parallel wurden bei der Analyse mittels multiplexed-scAEBS vier Negativkontrollen (initial leere 200 µl Reaktionsgefäße) verarbeitet.

4.10 Auswertung der DNA-Sequenzen nach Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzen nach Sanger-Sequenzierung wurden mit der Software BiQ-Analyzer oder manuell mit ChromasLite ausgewertet, indem die erhaltene Sequenz nach Sanger-Sequenzierung mit der originalen Sequenz verglichen wurde. Im Vergleich zur Originalsequenz neu aufgetretene Thymine (anstatt erwarteter Cytosine) wurden bei CpG-Cytosinen als unmethylierte Cytosine gewertet, bei non-CpG-Cytosinen (CpHs) als konvertierte Cytosine. Andersherum wurden stabile CpG-Cytosine (sowohl Cytosin-Nachweis in der Originalsequenz als auch in der Sequenz nach Sanger-Sequenzierung) als methyliert und CpH-Cytosine als nicht konvertiert gewertet. Letzteres deutet auf eine technisch mangelhafte Bisulfit-Konvertierung hin. Für die Auswertung wurden sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsstrang benutzt (Abbildung 4.6).

Für die einheitliche Auswertung der Sequenzen wurden folgende Definitionen festgelegt: Die Methylierungsrate der CpGs wurde definiert als Ratio der Anzahl methylierter CpGs zu allen CpGs des analysierten Abschnitts. Hierbei wurden hemimethylierte CpGs, die nach Sequenzierung im Elektropherogram sowohl ein Thymin- als auch ein Cytosin-Signal zeigten, mit dem Faktor 0,5 und vollständig methylierte CpGs mit dem Faktor 1 gewertet. Die Konversionsrate wurde definiert als Ratio der Anzahl der konvertierten CpHs zu allen CpHs des analysierten Abschnitts. Hierbei wurden hemikonvertierte CpHs, die nach Sequenzierung im Elektropherogram sowohl ein Thymin als auch ein Cytosin-Signal zeigten, mit dem Faktor 0,5 und konvertierte CpHs mit dem Faktor 1 gewertet.

Um die Effizienz von multiplexed-scAEBS während der einzelnen Experimente messbar zu machen, wurden folgende Definitionen und Termini festgelegt: Die Erfolgsrate nach Sequenzierung (EnS) der einzelnen Genloci beschreibt die Ratio aus den erfolgreich sequenzierten Proben a des Genpromoters und der Anzahl n aller analysierten Proben $[EnS_{miR200c/141}=a_{miR200c/141}/n, \quad EnS_{miR200b/a/429}=a_{miR200b/a/429}/n \quad \text{und} \quad EnS_{CDH1}=a_{CDH1}/n]$. EnS_{gesamt} gibt den Durchschnittswert der EnS von allen drei Genpromotoren an $[EnS_{gesamt}=(EnS_{miR200c/141}+EnS_{miR200b/a/429}+EnS_{CDH1})/3]$. Die Anzahl der erfolgreich sequenzierten Loci pro Probe beschreibt die Ratio aus der Anzahl der

Proben mit drei, zwei, einem oder keinem sequenzierten Locus im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Proben.

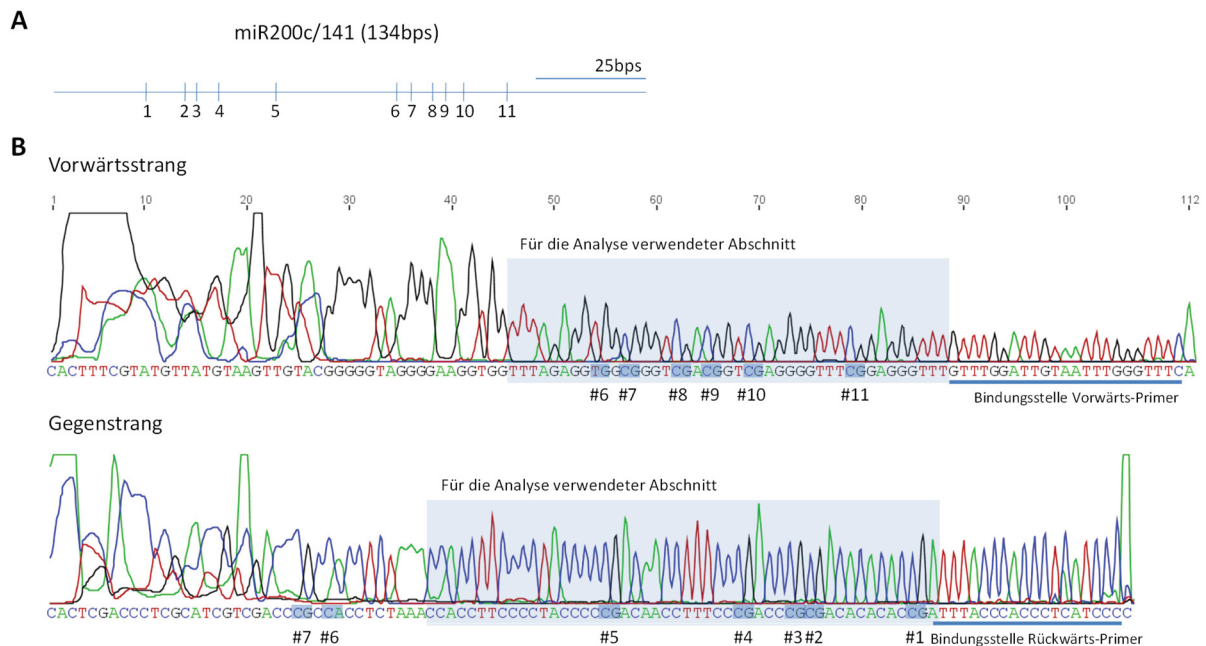


Abbildung 4.6 Sequenzierungsanalyse am Beispiel des miR200c/141-Genpromoters nach scABES. (A) Diagramm des miR200c/141-Genlocus mit der Lokalisation der 11 analysierten CpGs. **(B)** Elektropherogram des Vorwärts- und Gegenstranges des Amplikons von miR200c/141. Der ausgewertete Bereich ist blau markiert. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

4.11 Chi-Quadrat-Testung

Mittels des Chi-Quadrat-Tests wird bei zwei (dichotomisierten) Variablen ein Wahrscheinlichkeitswert für das Ablehnen der Nullhypothese angegeben werden. Dabei besagt die Nullhypothese, dass die Variablen in keinem Zusammenhang stehen. Bei einem p-Wert $< 0,05$ besteht zwischen den beiden getesteten Variablen mit signifikanter Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang, die Nullhypothese wird abgelehnt (116).

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung und Optimierung von PCR-Bedingungen der Primer von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1

Die Primer von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 wurden anhand der Software Bisulfite Primer Seeker in silico designt und an drei Verdünnungsstufen von bsc-DNA von MDA-MB-231 mit einem Temperaturgradienten der Annealingtemperatur T_a zwischen 51,2-60,9°C getestet (Abbildung 5.1). Die optimale T_a lag bei 58,7°C bei allen drei Primerpaaren.

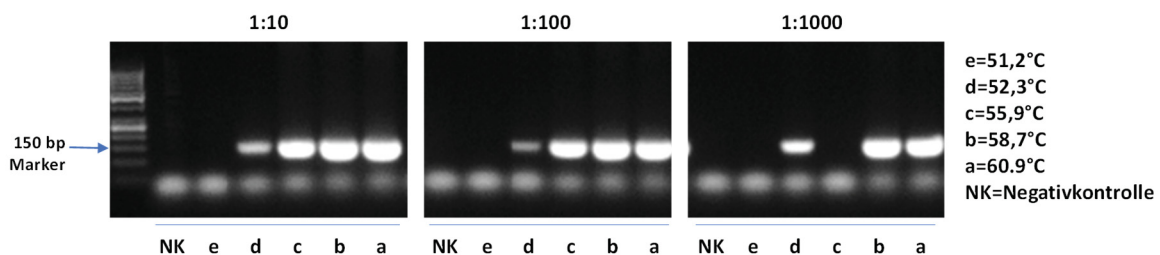


Abbildung 5.1 Repräsentatives Ergebnis der Gelelektrophorese der Primertesting von miR200c/141 an verdünnter bscDNA von MDA-MB-231 mit Temperaturgradient.

5.2 Testung von AEBS_{Tierling} mittels Amplifikation von miR200c/141

Der miR200c/141-Genpromoter wurde bei je vier Proben mit je 50, 40, 30, 20, und zehn Zellen und einem Duplikat mit 100 Zellen der MDA-MB-231 Zelllinie nach der Bisulfit-Konvertierung nach AEBS_{Tierling} amplifiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese (Abbildung 5.2). Während des Experimentes wurden vier Negativkontrollen (leere 200 µl Reaktionsgefäße) parallel zu allen Schritten bearbeitet, um Kontaminationen auszuschließen. Während die Proben mit je 100, 50 und 40 Zellen alle die erwartete Bande von miR200c/141 nach der Gelelektrophorese zeigten, waren bei den Proben mit 30, 20 und zehn Zellen nur je eine Probe positiv. Die Negativkontrollen ergaben keinen Anhalt für Kontaminationen (Abbildung 5.2).

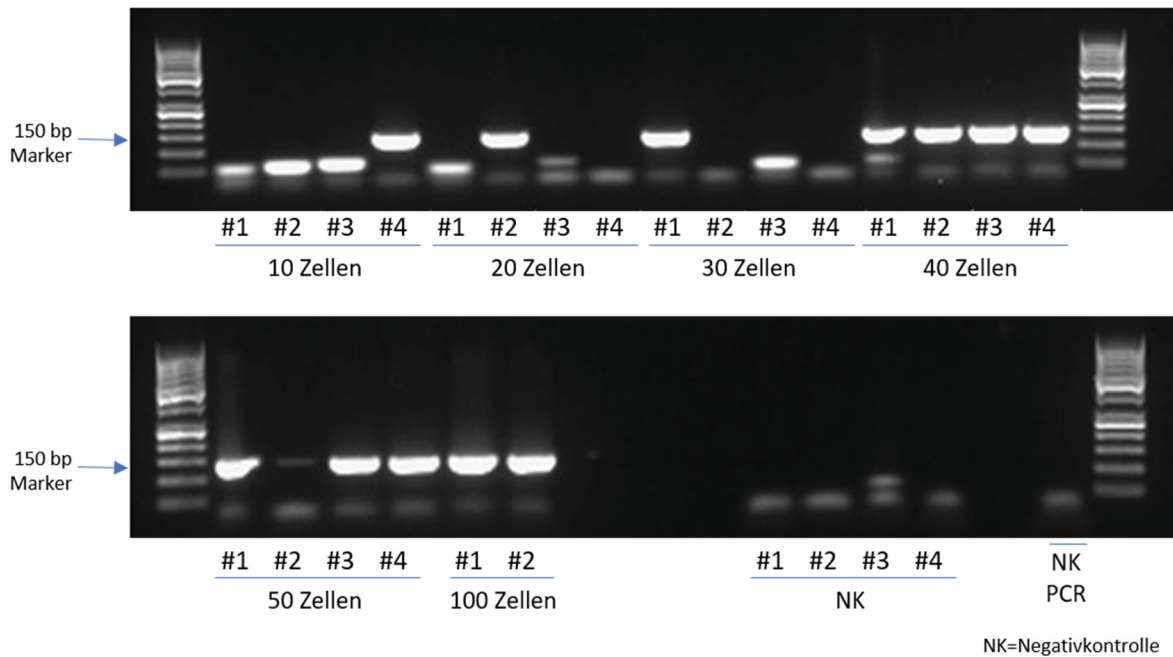


Abbildung 5.2. Gelelektrophorese nach Amplifikation von miR200c/141 nach Bisulfit-Konvertierung mittels AEBS_{Tierling}.

5.3 scAEBS_{pre} – Parameteroptimierung von AEBS_{Tierling}

Zur Optimierung von AEBS_{Tierling} wurden verschiedene Parameter des originalen Protokolls modifiziert: 1. Das Volumen aller Reagenzien wurde um den Faktor 0,4 reduziert, um alle Reaktionen von der Zellisolierung bis zur abschließenden PCR in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. 2. Die Inkubationszeiten der einzelnen Waschschrte in NaOH und TE wurde von 15 min auf 5 min reduziert, um die Gefahr des DNA-Verlustes durch Diffusion während der Inkubationen zu minimieren. Die Modifikationen wurden in dem Protokoll scAEBS_{pre} zusammengefasst (Abbildung 6.1).

Um scAEBS_{pre} zu testen, wurde der miR200c/141-Genpromoter bei Triplikaten mit je Einzelzellen, zehn, 20 und 50 Zellen und je einer Probe mit 100 Zellen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und MCF-7 mittels scAEBS_{pre} analysiert. Parallel wurden je drei Negativkontrollen (leere 200 µl Reaktionsgefäße) prozessiert. Nach der Gelelektrophorese zeigte sich bei allen Triplikaten die erwartete Bande des miR200c/141-Genpromoters. Nur bei den Triplikaten mit Einzelzellen sowie bei den Negativkontrollen konnte keine Amplifikation nachgewiesen werden (Abbildung 5.3 A und B). Damit erwies sich die Modifikation der Volumenreduktion und die damit einhergehende "Ein-Gefäß-Strategie" als effizienter im Vergleich zu AEBS_{Tierling}.

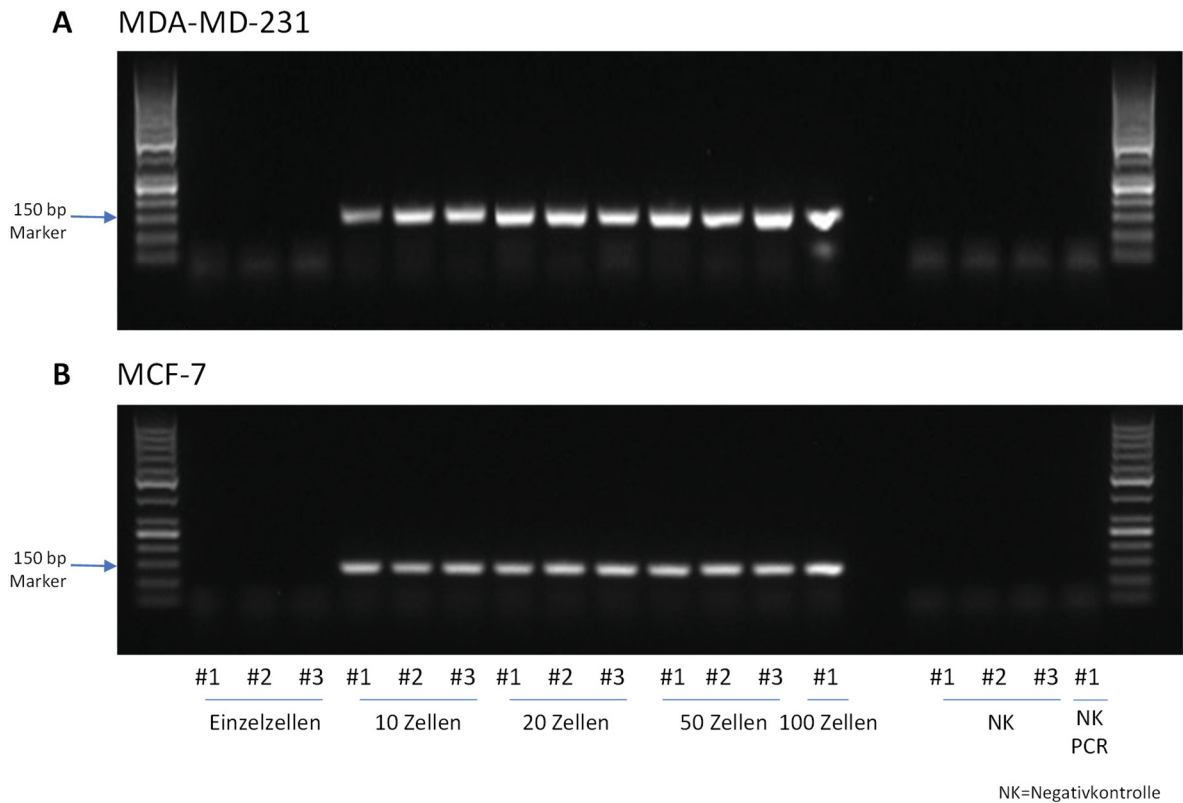


Abbildung 5.3. Gelelektrophorese nach Amplifikation von miR200c/141 nach Bisulfit-Modifikation mittels scAEBS_{pre}.

Es wurde weiter getestet, ob mit scAEBS_{pre} weniger als zehn Zellen erfolgreich analysiert werden können. Dafür wurden Triplikate mit je zwei, vier, sechs und acht Zellen sowie eine Probe mit 100 Zellen der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie mit scAEBS_{pre} bezüglich des miR200c/141-Genpromoters analysiert. Daneben wurden drei Negativkontrollen (leere 200 µl Reaktionsgefäße) im Experiment mitgeführt. Nach der PCR des miR200c/141-Genpromoters und der folgenden Gelelektrophorese waren 0/3 Proben mit zwei Zellen, 1/3 Proben mit vier Zellen, 2/3 Proben mit sechs Zellen, 1/3 Proben mit acht Zellen und die Positivkontrolle mit 100 Zellen positiv. Es lagen keine Amplifikationen bei den Negativkontrollen vor. (Abbildung 5.4).

Zusammenfassend zeigte sich, dass das in dieser vorliegenden Arbeit weiterentwickelte Protokoll scAEBS_{pre} gegenüber dem ursprünglichen AEBS_{Tierling}-Protokoll deutlich effizienter war. Analysen bis zu zehn Zellen waren mit scAEBS_{pre} im Vergleich zu dem AEBS_{Tierling}-Protokoll möglich. Bei Analysen von weniger als zehn Zellen zeigten sich jedoch noch Ausfälle.

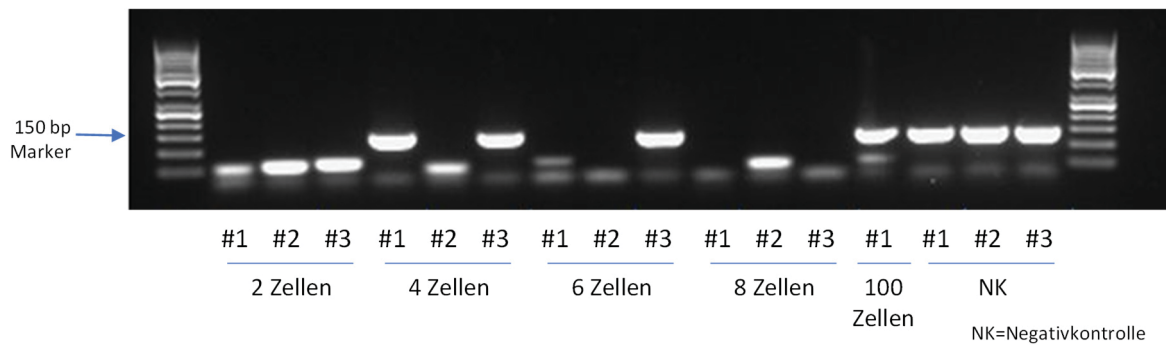


Abbildung 5.4. Gelelektrophorese nach Amplifikation des miR200c/141-Genpromoters von Proben mit weniger als zehn Zellen nach Bisulfit-Modifikation mittels scAEBS_{pre}.

5.4 Testung von scAEBS mittels Amplifikation von miR200c/141

Um ein robustes Protokoll für die Methylierungsanalyse von Einzelzellen zu etablieren, waren weitere Modifikationen des scAEBS_{pre}-Protokolls notwendig. Um den möglichen DNA-Verlust aus dem Agarose-Bead durch Migration zu vermindern, wurde die genomische DNA vor der Bisulfit-Konvertierung mit carrier-RNA präzipitiert. Da die Präzipitation technisch nicht in dem Agarose-Bead durchgeführt werden konnte, wurden die Zellen zunächst mit Proteinase-K verdaut, anschließend mit carrier-RNA präzipitiert und erst dann in Agarose immobilisiert. Alle folgenden Schritte wurden gemäß scAEBS_{pre} durchgeführt. Dieses Protokoll wurde single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (scAEBS) genannt (Abbildung 6.1).

Um scAEBS zu testen, wurde an je zehn Proben mit je Einzelzellen und mit je fünf Zellen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mittels scAEBS der miR200c/141-Genpromoter amplifiziert. Vier Negativkontrollen (initial leere 200 µl Reaktionsgefäße) wurden neben dem Experiment bearbeitet. 80% (8/10) der Proben mit Einzelzellen und 100% (10/10) der Proben mit je fünf Zellen von MDA-MB-231 waren nach der Gelelektrophorese positiv. Die Negativkontrollen zeigten keinen Anhalt für eine Kontamination (Abbildung 5.5). Um die Ergebnisse zu überprüfen, wurden je 30 Proben mit je Einzelzellen und mit je fünf Zellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 nach PCR des miR200c/141-Genpromoters und Gelelektrophorese analysiert. Parallel wurden 12 Negativkontrollen (leere 200 µl Reaktionsgefäße) prozessiert. 80% (24/30) der Proben mit Einzelzellen und 93,3% (28/30) der Proben mit fünf Zellen von GM14667 waren nach Gelelektrophorese positiv. Keine der 12 Negativkontrollen zeigte nach der Gelelektrophorese eine positive Bande.

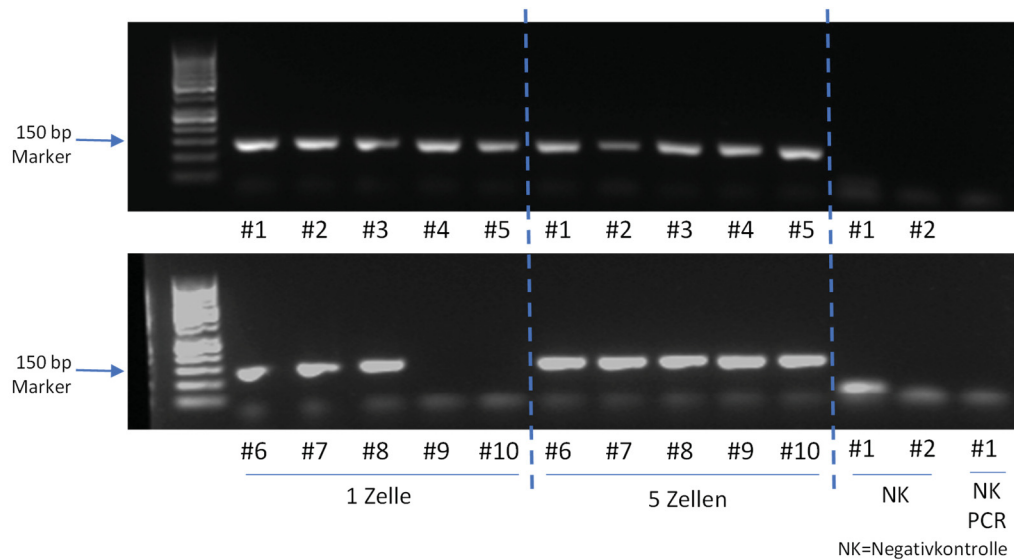


Abbildung 5.5 Gelelektrophorese nach Amplifikation des miR200c/141-Genpromoters von Proben mit Einzelzellen und fünf Zellen nach Bisulfit-Modifikation mittels scAEBS von MDA-MB-231.

Um zu überprüfen, ob die Methylierungsrate des analysierten Genpromoter-Abschnitts bestimmt werden kann, wurden die PCR Produkte von 20 Proben mit Einzelzellen der GM14667 Zelllinie abschließend Sanger sequenziert und die Methylierung von jedem CpG-Dinukleotid bestimmt (Abbildung 5.6). Die Methylierungsrate (Definition s. 4.10) von miR200c/141 lag bei 95,5%. Die Konversionsrate der CpGs (Definition s. 4.10) lag bei 93,1%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit scAEBS der Methylierungsstatus von miR200c/141 reproduzierbar bei Einzelzellen analysiert werden konnte.

einzelnen Genloci (Abbildung 5.8). Bei den CpGs konnte eine Konversionsrate von 95,2% detektiert werden (Abbildung 5.7 A). Im Vergleich hierzu konnten bei kommerzialisierten Kits für Bisulfit-Sequenzierung Werte bis zu 99,9% erzielt werden (70). Um die Effizienz der Bisulfit-Konvertierung zu erhöhen, wurde die Inkubationstemperatur während der Bisulfit-Konvertierung von 50°C auf 56°C erhöht und das Experiment mit 20 Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 wiederholt (Abbildung 5.7 B, Abbildung 5.8). Dabei zeigte sich eine Konversionsrate der CpGs von 99,8%. Die fehlerhaft unkonvertierten CpGs waren bei dem Vorexperiment mit 50°C signifikant erhöht gegenüber den unkonvertierten CpGs des Experiments, welches mit 56°C durchgeführt wurde (16/332 bei 50°C vs. 4/802 bei 56°C; p-Wert <0,001; Chi-Quadrat-Test). Dagegen zeigten sich die Methylierungsmuster (Abbildung 5.7 B) und die EnS bei allen Genloci weitgehend unverändert (Abbildung 5.8). Die EnS_{gesamt} lag bei 73,3%. Da durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur die Möglichkeit artifizieller unmethylierter CpGs vermindert wurde, die EnS jedoch nur geringfügige Veränderungen zeigte, wurde die Anpassung der Inkubationstemperatur bei der Bisulfit-Konvertierung von 50°C auf 56°C bei allen weiteren Experimenten beibehalten.

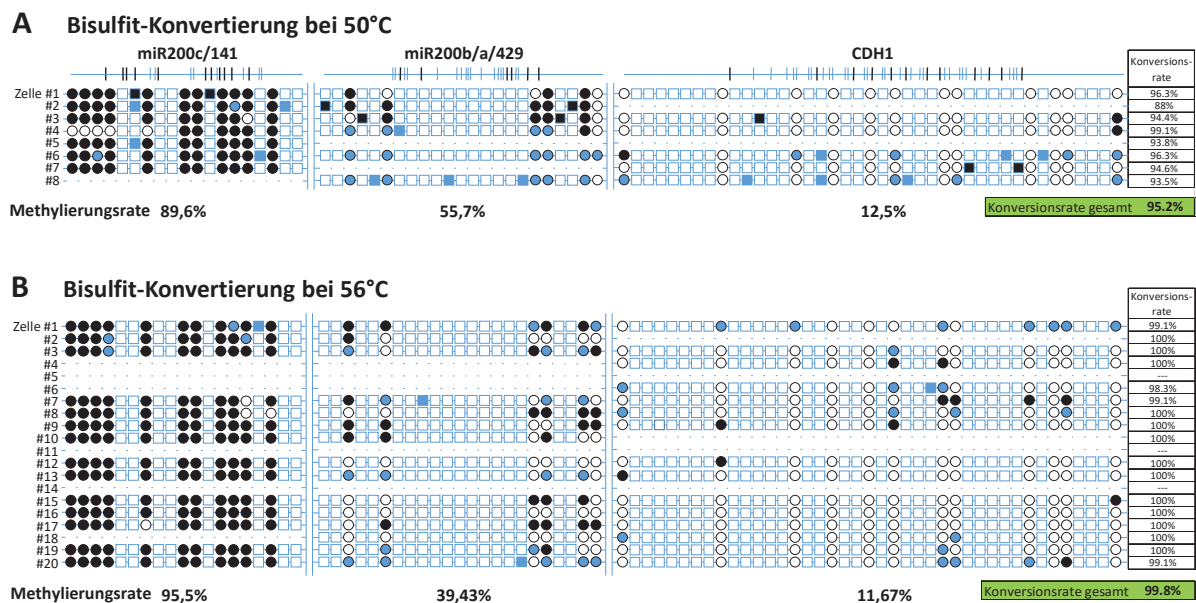


Abbildung 5.7 Methylierungsmuster und Bestimmung der Konversionsrate bei Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 (A) mit einer Inkubationstemperatur während der Bisulfit-Konvertierung von 50°C (B) mit einer Inkubationstemperatur während der Bisulfit-Konvertierung von 56°C. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

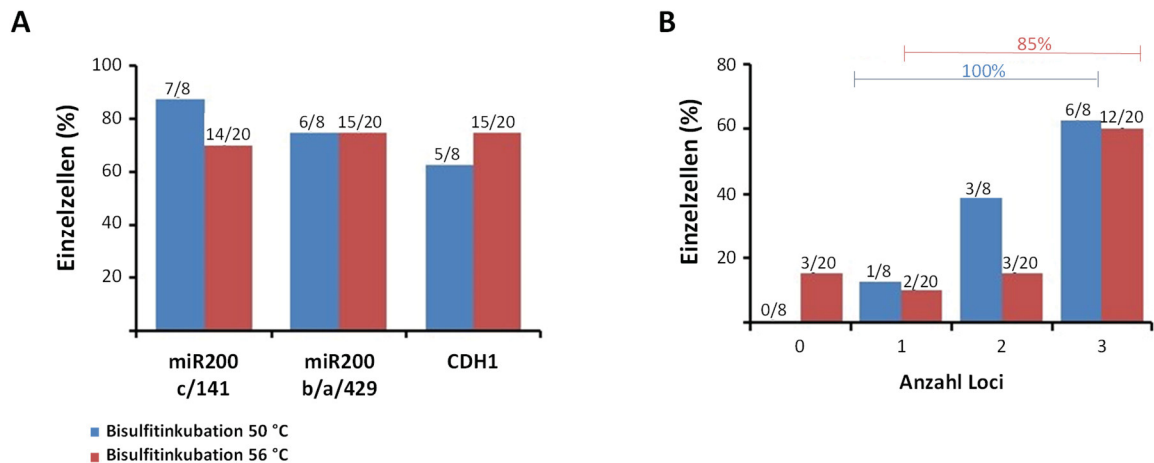


Abbildung 5.8 Effizienz von multiplexed-scAEBS bei Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667. (A) Erfolgsrate nach Sequenzierung (EnS) der einzelnen Genpromoter-Loci miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 mit multiplexed-scAEBS. **(B)** Erfolgreich sequenzierte Loci pro Zelle. Bei einer Inkubationstemperatur von 50°C konnte bei jeder Probe, bei 56°C bei 85% der Proben mindestens ein Locus pro Zelle analysiert werden. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

In insgesamt 38,6% (17/44) der analysierten Produkte der 20 Einzelzellen von GM14667, welche bei 56°C konvertiert wurden, konnte eine Hemimethylierung/Hemikonversion (Definition s. 4.10) nachgewiesen werden (Abbildung 5.7 B). Dabei wiesen 9% (38/424) der CpGs eine Hemimethylierung auf, während bei CpHs lediglich 0,5% (4/802) der CpHs hemikonvertiert waren. Damit war das Vorkommen von hemimethylierten CpGs signifikant häufiger als das Vorkommen von hemikonvertierten CpHs (p-Wert<0.0001, Chi-Quadrat-Test). Diese Beobachtung legt nahe, dass die hier beobachtete Hemimethylierungen eine Allel-spezifische Methylierung widerspiegelt und kein technisches Artefakt darstellt.

5.6 Validierung des Multiplex-PCR-Assays

Um den Multiplex-PCR-Assay weiter zu validieren, wurden die Methylierungsmuster von je 20 Einzelzellen der Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 mittels multiplexed-scAEBS analysiert. Diese beiden Zelllinien unterscheiden sich sowohl im Phänotyp (MDA-MB-231 eher mesenchymaler Phänotyp; MCF-7 eher epithelialer Phänotyp) als auch in ihrem Methylierungsmuster bezüglich der drei Genpromotoren. Beide Zelllinien wurden bezüglich aller drei Genpromotoren anhand von Mehrzellenanalysen via Bisulfit-Sequenzierung in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (14, 15, 46, 47). Die MCF-7 Zellen wurden analog zu der Prozessierung

der klinischen Proben mit CellSearch™ angereichert. Mit multiplexed-scAEBs konnten die bereits beschriebenen Methylierungsmuster bei allen drei Genpromotoren reproduziert werden (Abbildung 5.9 A, B). Allel-spezifische Methylierung konnte in 47,62% (20/42) der Amplifikate gefunden werden, wobei die Allel-spezifische Methylierung insgesamt signifikant höher bei den MDA-MB-231 Zellen war als bei den MCF-7 Zellen (51/401 CpGs bei MDA-MB-231 vs. 6/377 bei MCF-7; p-Wert<0,0001; Chi-Quadrat-Test), besonders innerhalb des miR200b/a/429 Genpromoters (27/90 bei miR200b/a/429 vs. 12/143 bei miR200c/141 vs. 12/178 bei CDH1; p-Wert <0,0001; Chi-Quadrat-Test). Die EnS der einzelnen Genpromotoren waren vergleichbar mit denen, die bei der Lymphozytenzelllinie GM14667 erzielt wurden (Abbildung 5.9 B, C). Die EnS_{gesamt} von MDA-MB-231 lag bei 70%, von MCF-7 bei 65%.

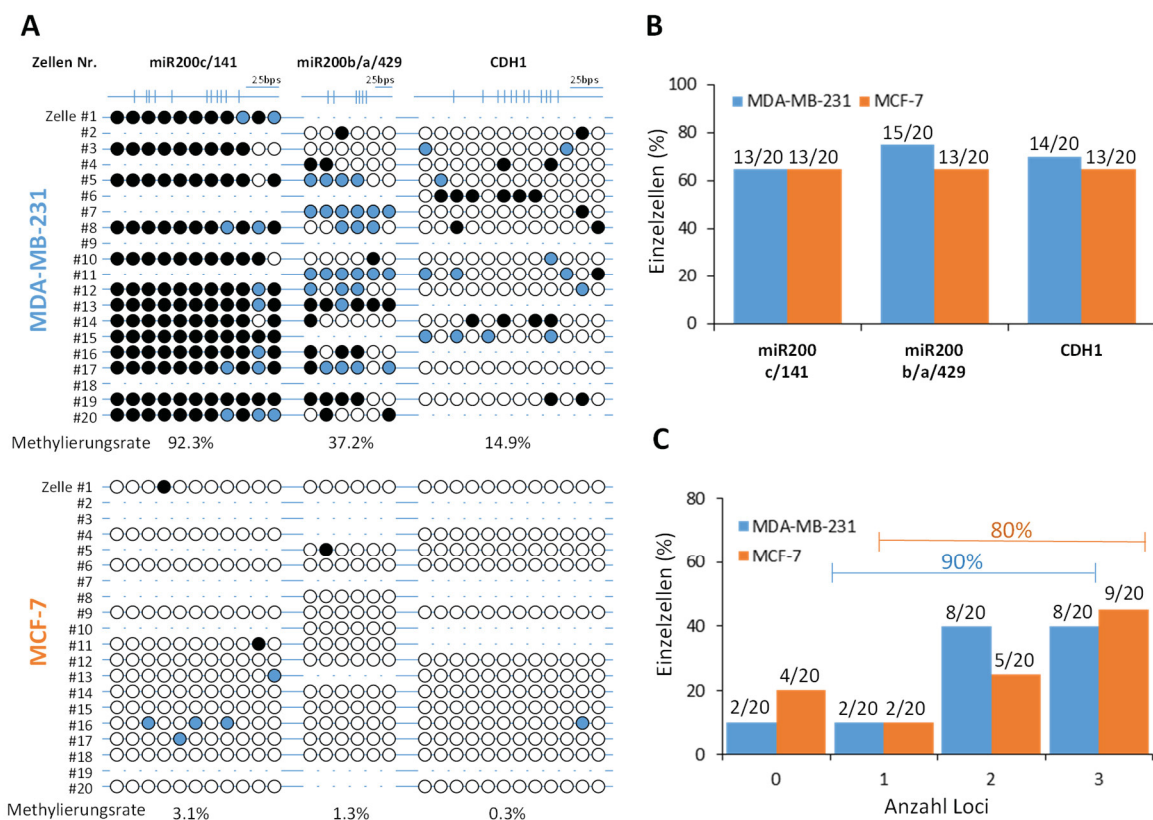


Abbildung 5.9 Methylierungsanalyse der Genpromotoren von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 bei Einzelzellen von Brustkrebszelllinien. (A) Methylierungsmuster von je 20 Einzelzellen der mesenchymalen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und der epithelialen Brustkrebszelllinie MCF-7. **(B)** EnS der einzelnen Genpromotoren. **(C)** Erfolgreich sequenzierte Loci pro Zelle. Bei den MDA-MB-231 konnte in 90% der Proben, bei MCF-7 in 80% mindestens ein Genpromoter pro Probe analysiert werden (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

5.7 Analyse von zirkulierenden Tumorzellen und CD45^{pos} Zellen

Es wurde bereits eine Reihe von Daten publiziert, die nahelegten, dass die epigenetische Regulation mittels Hypermethylierung der Genpromotoren miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 die EMT von Tumorzellen steuern kann (14, 15, 46, 47, 117). In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass sich CTCs in einem intermediären EMT-Status befinden können, bei dem gleichzeitig sowohl epitheliale als auch mesenchymale Merkmale bei diesen Zellen vorhanden sein können (111-113). Daher bestand die Hypothese, dass die untersuchten Genpromotoren bei CTCs regelmäßig hypermethyliert sind, auch wenn die Population der CTCs als EpCAM^{pos}, CK^{pos}, CD45^{neg} angereichert und isoliert wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden 94 EpCAM^{pos} CTCs von 11 Patienten mit mBC und 65 EpCAM^{pos} CTCs von sechs Patienten mit mCRPC mit multiplexed-scAEBS analysiert. Parallel wurden insgesamt 30 CD45^{pos} Zellen von drei mBC-Patienten isoliert und via multiplexed-scAEBS untersucht.

Bei den CTCs zeigte sich eine deutlich verminderte EnS_{gesamt} mit 34% gegenüber der EnS_{gesamt} der CD45^{pos} Zellen mit 73% (Abbildung 5.10 B, C). Den meisten CTCs konnte ein Methylierungsmuster zugeordnet werden, welches zuvor bei eher epithelialen Zellen beobachtet wurde (Abbildung 5.10 A; Abbildung 5.11 A und B). Interessanterweise konnten Unterschiede bei den miR200-Genpromotoren zwischen den mBC-CTCs und den mCRPC-CTCs detektiert werden. So zeigte sich bei miR200 insgesamt eine höhere Methylierungsrate (Abbildung 5.10 A und Abbildung 5.11 A, B). Dagegen zeigte sich bei einem mBC-Patient der gesamte miR200b/a/429-Genpromoter fast gänzlich methyliert (Abbildung 5.11 A).

Im Gegensatz zu den meisten CTCs präsentierten die CD45^{pos} Zellen ein Methylierungsmuster von eher mesenchymalen Zellen und waren mit den Zellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 und der eher mesenchymalen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 vergleichbar (Abbildung 5.10 A; Abbildung 5.11 C).

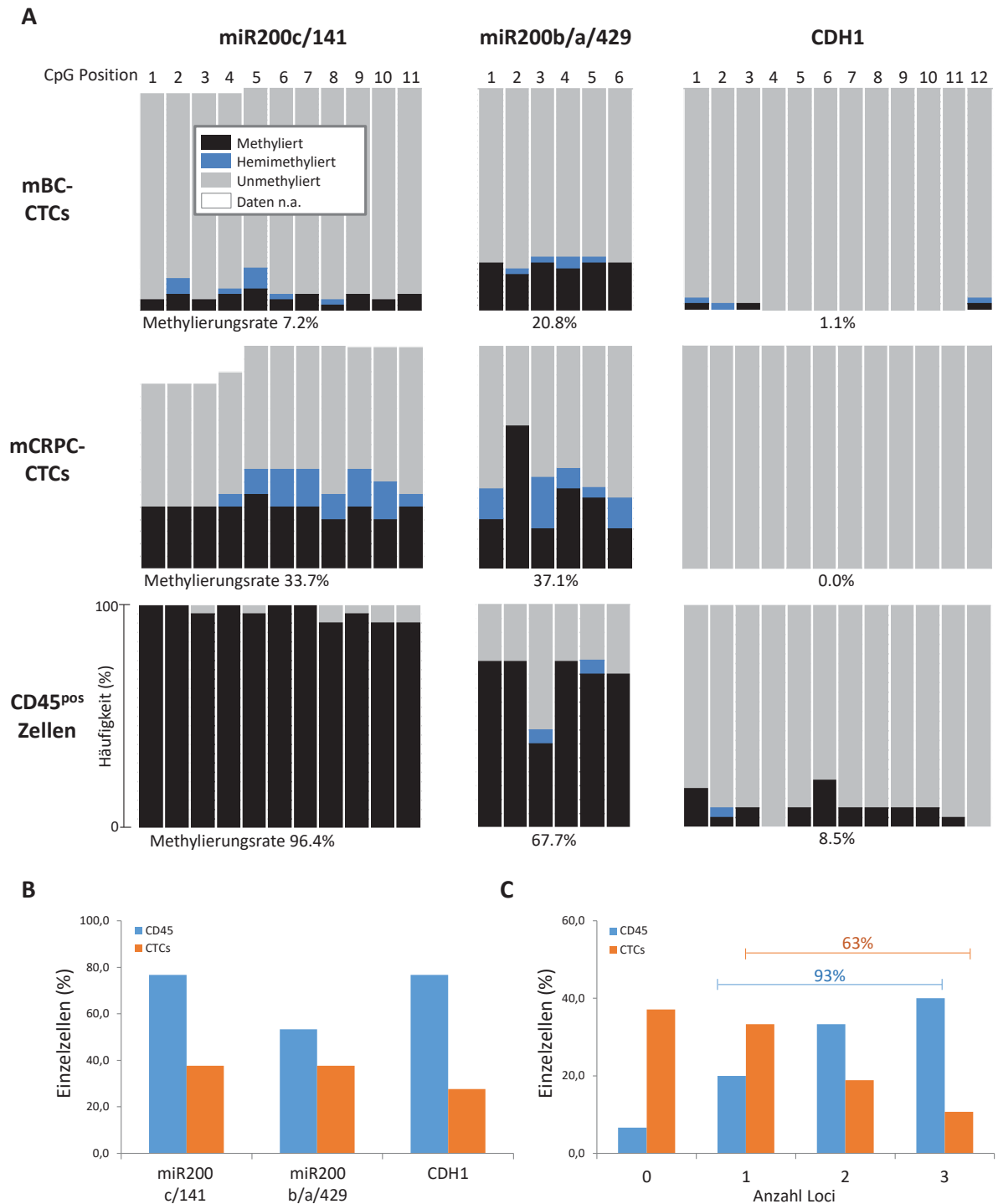


Abbildung 5.10 Methylierungsanalyse und Effizienz von EpCAM^{pos} mBC- und mCRPC-CTCs und CD45^{pos}Zellen. (A) Gestapelte Balkendiagramme repräsentieren die Methylierungsprofile von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 von 94 CTCs von 11 mBC-Patienten und 65 CTCs von sechs mCRPC-Patienten sowie 30 CD45^{pos} von drei mBC-Patienten. (B) EnS der drei amplifizierten Loci. (C) Anzahl der sequenzierten Loci/Zelle. Bei 63% der CTCs und 93% bei CD45^{pos} Zellen konnte mindestens ein Locus pro Zelle analysiert werden. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

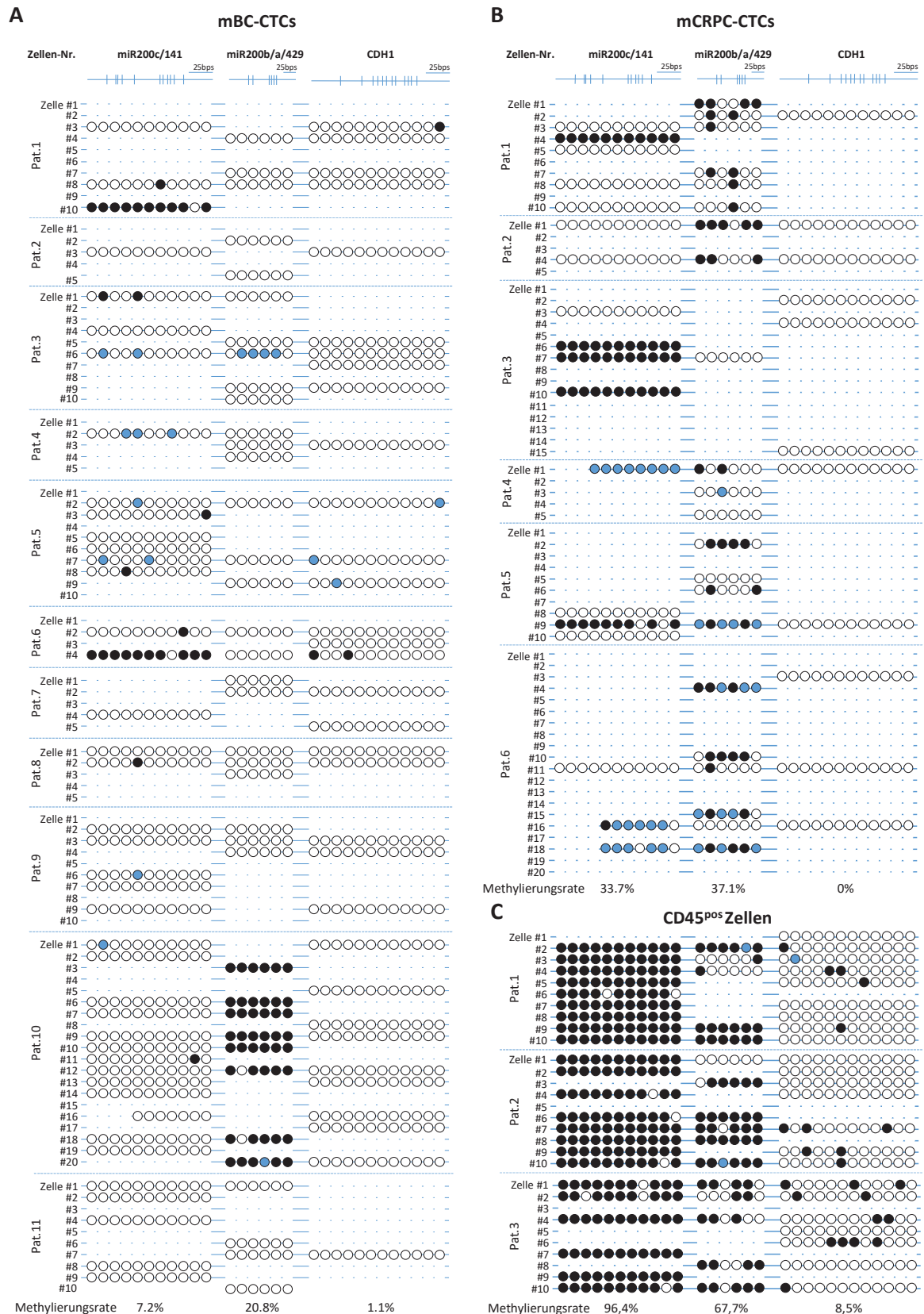


Abbildung 5.11 Methylierungsprofile nach Analyse mit multiplexed-scaEBS von (A) 94 EpAM^{pos} CTCs von 11 mBC-Patienten, (B) 65 EpCAM^{pos} Patienten von sechs mBC-Patienten und (C) 30 CD45^{pos} Zellen von drei mBC-Patienten. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

6 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Analyse der DNA-Genpromotermethylierung der EMT-assoziierten Gene miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 bei CTCs mittels Bisulfit-Sequenzierung. Anhand des Methylierungsstatus sollte indirekt der Phänotyp von CellSearchTM-angereicherten CTCs sowie der Einfluss der epigenetischen Regulation bei CTCs analysiert werden. Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Studien bezüglich der DNA-Methylierung von isolierten einzelnen CTCs vor. Dies kann hauptsächlich durch den Mangel an effizienten Methoden der Bisulfit-Sequenzierung für Einzelzellen erklärt werden. Basierend auf der Methode des Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (AEBS) (74) wurde im Rahmen dieser Arbeit multiplexed single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing (multiplexed-scAEBS) entwickelt, um die Bisulfit-Sequenzierung an einzelnen CTCs zu ermöglichen. Multiplexed-scAEBS beinhaltet die Bisulfit-Konvertierung von in Agarose immobilisierter Einzelzell-DNA und die nachfolgende Multiplex-Pre-Amplifikation der EMT-assoziierten Genpromotoren. Anschließend wurden die drei Genpromotoren separat amplifiziert und sequenziert. Der Versuchsaufbau wurde an 30 Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 sowie an je 20 Einzelzellen der Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 getestet. Anschließend wurden 94 CTCs von 11 mBC-Patienten und 65 CTCs von sechs mCRPC Patienten analysiert.

6.1 Etablierung von multiplexed-scAEBS

Multiplexed-scAEBS basiert auf einer Modifikation der AEBS-Methode, die von Tierling et al. (75) als reproduzierbare Methode zur Methylierungsanalyse von ca. 100 Zellen beschrieben wurde (AEBS_{Tierling}). AEBS_{Tierling} unterscheidet sich zu der originalen AEBS-Methode hauptsächlich in der besseren und weniger komplexen Handhabung bei der Agarose-Immobilisierung der DNA (Beadformierung) und den Waschschritten vor und nach der Bisulfit-Konvertierung. Hierdurch waren diverse Modifikationen deutlich leichter zu etablieren als bei anderen vorliegenden Protokollen (71-74). Auf Grundlage von AEBS_{Tierling} wurde in der vorliegenden Arbeit multiplexed-scAEBS in zwei wesentlichen Schritten entwickelt. In einem ersten Schritt wurde das Protokoll scAEBS_{pre} etabliert (Abbildung 6.1), bei welchem alle Volumina von AEBS_{Tierling} um den Faktor 0,4 und die Inkubationszeiten der Waschschrritte reduziert wurden. Hierdurch wird die Bearbeitung der Zelle von der Zellablage bis inklusive zur finalen PCR in einem

Reaktionsgefäß ermöglicht. Eine solche „Ein-Gefäß-Strategie“ vermindert den DNA-Verlust durch Adhäsion während der Pipettier-Schritte und wird beispielsweise auch bei dem Protokoll der Einzelzell-Whole Genome Amplification (WGA) von Klein et al. beschrieben (118). Tatsächlich waren mit scAEBS_{pre} bereits reproduzierbare Analysen von zehn Zellen möglich. Allerdings konnten mit dem originalen AEBS-Protokoll von Olek et al. ebenfalls ein DNA-Gehalt von bis zu 50 pg analysiert werden (74), weswegen eine weitere Verbesserung gerade für Einzelzellanalysen notwendig war.

In einem zweiten Schritt wurde das endgültige scAEBS-Protokoll etabliert. Im Vergleich zu scAEBS_{pre} werden hierbei die Zellen erst lysiert und anschließend die DNA mit carrier-RNA präzipitiert. Erst dann fand die Agarose-Immobilisierung statt. Durch die Präzipitation mit carrier-RNA wurden zwei entscheidende Vorteile erhofft. 1. Durch ionische Bindungen konnten die einzelnen DNA-Fragmente, die nach der Bisulfit-Behandlung entstehen, in dem Präzipitat gebunden werden und somit der DNA-Verlust durch Migration aus der Agarose vermindert werden; 2. Gravina et al. mutmaßten, dass die Verwendung von Carrier-RNA bei der Bisulfit-Sequenzierung von geringen DNA-Ausgangsmengen einen kompetitiven Effekt bezüglich der DNA-Degradierung und Fragmentierung haben könnte (119). Allerdings konnte in dieser Arbeit der tatsächliche Effekt der Präzipitation nicht näher untersucht werden und bleibt somit hypothetisch. Insgesamt konnte eine EnS_{gesamt} (Definition s. 4.10) von 75% bei GM15667 Einzelzellen mittels multiplexed-scAEBS erzielt werden. Die Konversionsrate der CpGs war jedoch mit 95,2% gegenüber Konversionsraten von kommerzialisierten Kits mit bis zu 99,9% (EZ DNA Methylation Kit, Zymoresearch™) verringert (70). Bei dem EZ DNA Methylation Kit (Zymoresearch™) wurde eine Inkubationszeit von 12-16 h bei einer Inkubationstemperatur von 50°C empfohlen. Die Analyse von Grunau et al. ergab hingegen, dass eine maximale Konversion zwischen 55°C (4 h Inkubationszeit) und 95°C (1 h Inkubationszeit) erzielt werden kann (68). Auf Grund dieser Daten wurde bei multiplexed-scAEBS die Inkubationstemperatur auf 56°C (3,5 h Inkubationszeit) erhöht, womit eine Konversionsrate von 99,8% erreicht werden konnte. Die EnS_{gesamt} war mit 73% stabil. Im Vergleich zu der Erfolgsrate von multiplexed-scAEBS stehen die Daten von Geuns et al., welche mittels einer abgewandelten Form von AEBS Analysen an menschlichen Oozyten und einzelnen Blastomeren bezüglich der Methylierung dreier Genpromotoren (71-73) durchführten. Hierbei lag abhängig vom analysierten Locus die Erfolgsrate lediglich zwischen 17,6% und 28,7% der analysierten Zellen.

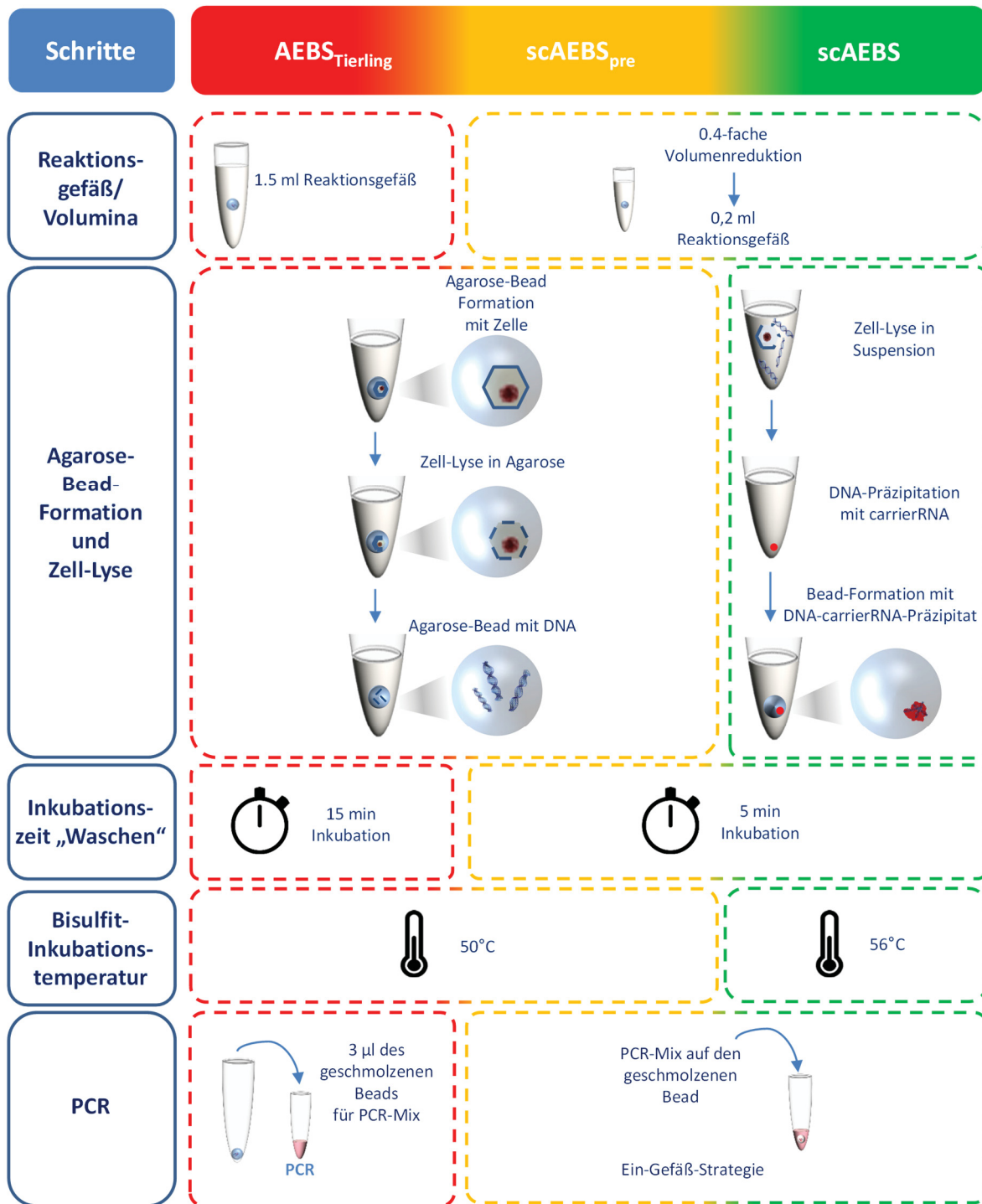


Abbildung 6.1 Optimierung von AEBS_{Tierling} zu scAEBS. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))

Die Reproduzierbarkeit des PCR-Assays von multiplexed-scAEBS wurde an Einzelzellen der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 getestet. Zellen von MDA-MB-231 wurden frisch aus der Kultur isoliert, während Zellen der Zelllinie MCF-7 in das Blut eines gesunden Donors gemischt und anschließend über CellSearch™ analog zu klinischen Proben bearbeitet wurden, um eine mögliche Beeinflussung der Analysen durch die

CellSearch™-Prozessierung auszuschließen. Die Methylierungsmuster von Einzelzellen waren deckungsgleich mit den publizierten Daten, welche zuvor mit kommerzialisierten Kits und großen DNA-Ausgangsmengen generiert wurden (14, 15, 46, 120) (Tabelle 8). Zugleich legen die an MDA-MB-231 und MCF-7 gewonnenen Daten nahe, dass der Prozess der Anreicherung durch das CellSearch™-System mit Zellfixierung, Zellpermeabilisierung und Immunodetektion keinen signifikanten Einfluss auf multiplexed-scAEBS besitzt. Allerdings war die EnS bei den CTCs sowohl gegenüber den ebenfalls mit CellSearch™ prozessierten CD45^{pos} und MCF-7 Zellen als auch gegenüber den zuvor analysierten Zelllinien-Zellen deutlich reduziert. Die wahrscheinlichste Erklärung für die geringere Erfolgsrate ist, dass CTCs apoptotisch sein können und deren DNA degradiert sein kann (121-124), was nachfolgende Downstream-Analysen beeinträchtigt. Immerhin konnte in der vorliegenden Arbeit bei 63% der CTCs mindestens ein Genpromoter pro Zelle untersucht werden. Bei genomischen Analysen von CellSearch™ prozessierten mBC-CTCs nach Whole Genome Amplification (WGA) wurden vergleichbare Amplifikationsraten (73%) für die untersuchten Genloci berichtet (115). In einer weiteren unabhängigen Arbeit konnte ebenfalls eine geringere Erfolgsrate nach WGA bei CellSearch™ angereicherten und mit DEPArray™ isolierten CTCs im Vergleich zu gleich prozessierten CD45^{pos} Leukozyten beobachtet werden (104).

Tabelle 8 Vergleich der Methylierungsraten generiert mit multiplexed-scAEBS und Standardmethoden bei MDA-MB-231 und MCF-7

Methylierungsrate	miR200c/141	miR200b/a/429	CDH1
MDA-MB-231	90,9 % (Davalos et al. 2011) 71,5 % (Neves et al. 2010) 92,3 % (multiplexed-scAEBS)	41,7 % (Davalos et al. 2011) 37,2 % (multiplexed-scAEBS)	23 % (Farias et al. 2010) 14,9 % (multiplexed-scAEBS)
MCF-7	0 % (Davalos et al. 2011; Neves et al. 2010) 3,1 % (multiplexed-scAEBS)	5,5 % (Davalos et al. 2011) 1,3 % (multiplexed-scAEBS)	0 % (Brambert et al. 2015) 0,3 % (multiplexed-scAEBS)

Mittels multiplexed scAEBS konnten Allel-spezifische Hemimethylierungen bei Einzelzellen detektiert werden, wobei die entsprechende CpG-Seite nur bei einem der beiden Allele methyliert ist. Eine mangelhafte Bisulfit-Konvertierung kann zu einer falsch

positiven Methylierungsrate führen (125). Diese technischen Ausfälle können auch Hemimethylierungen begünstigen. Um die Qualität der Bisulfit-Konvertierung zu kontrollieren, wurde die Konversionsrate (99,6%) bestimmt. Das bedeutet, dass nur 0,4 % der CpGs nicht konvertiert wurden. Weiterhin waren bei der Zelllinie MDA-MB-231 mit den meisten Hemimethylierungen, insbesondere bei dem miR200b/a/429-Genpromoter, diese signifikant erhöht gegenüber Hemikonversionen und Hemimethylierungen der anderen Zelllinien. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um die Beobachtung von echten Allel-spezifischen Methylierungen handelt und nicht um technische Artefakte. Somit bietet scAEBS die Möglichkeit gezielt Gene, die der genomischen Prägung (Imprinting) unterliegen, auf Einzelzellebene zu untersuchen.

6.2 Vergleich von multiplexed-scAEBS mit Einzelzellmethoden für genomweite Bisulfit-Sequenzierung

Während mit multiplexed-scAEBS bisher nur eine Analyse von drei Genloci möglich ist, sind mittlerweile mehrere Protokolle für die genomweite Methylierungsanalyse auf Einzelzell-Niveau mittels Bisulfit-Sequenzierung veröffentlicht worden (119, 126-131). Diese Methoden basieren entweder auf Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) (126) oder Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) (119, 127-130). Bei RRBS werden nur CpG-reiche Regionen vor der Amplifikation angereichert, während PBAT das ganze Genom abdeckt (131). Mit dem auf RRBS beruhenden single-cell Reduced Representation Bisulfite Sequencing (scRRBS) konnten bisher durchschnittlich ca. 5%-der CpGs genomweit (126) analysiert werden. Mit den auf PBAT basierenden single-cell Whole Genome Bisulfite Sequencing (scWGBS) und single-cell Bisulfite Sequencing (scBS-seq) konnten zwischen 5%-18% der CpGs genomweit analysiert werden (127-130). Mit scBS-seq waren dabei Analysen von bis zu 48% der CpGs genomweit möglich. Diese Methoden sind aufgrund der genomweiten Ausrichtung mit der locus-spezifischen multiplexed-scAEBS-Methode nicht direkt vergleichbar. Allerdings ist technisch gesehen eine locus-spezifische Analyse bei den o.g. Methoden möglich. So etablierten Gravina et al. (119) Single-cell locus-specific bisulfite sequencing (SLBS), bestehend aus Einzelzell-Lyse, Bisulfit-Konvertierung, WGA, konversions-spezifischer nested PCR und abschließender Sequenzierung. Bei der Analyse des Nfe2l2 Promoters von einzelnen embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) konnte so eine Erfolgsrate von 40% erzielt werden. Im Vergleich hierzu stehen die EnS von multiplexed-scAEBS von 65-85% bei Einzelzellen von Zelllinien. Allerdings sind

auch hier aufgrund der unterschiedlichen Wahl der Targets die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. Insgesamt besteht jedoch der große Vorteil von multiplexed-scAEBS im Vergleich zu den o.g. Methoden in der einfachen robusten Anwendung bei spezifischen biologischen Fragestellungen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwiefern scAEBS mit PBAT oder scRRBS kombinierbar ist und ob sich hieraus Vorteile für die genomweite Methylierungsanalyse von Einzelzellen ergeben könnten.

6.3 Methylierungs-Analyse von EMT-assoziierten Genen in CellSearch™ angereicherten CTCs von mBC- und mCRPC-Patienten

Hypermethylierung der drei untersuchten EMT-assoziierten Genpromotoren wurde schon häufig bei verschiedenen Tumorzelllinien mit einem eher mesenchymalen Phänotyp und hoher Invasionsneigung assoziiert (47, 117, 132-134). Demensprechend war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe des neu etablierten multiplexed-scAEBS Protokoll Informationen darüber zu erhalten, ob sich mit CellSearch™ detektierte CTCs in Bezug auf die Methylierung in einem EMT-ähnlichem Zustand befinden. In diesem Kontext ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass EpCAM-unabhängige Systeme zur Anreicherung und Isolierung von CTCs nicht vorteilhaft gewesen wären, da bei den aktuellen Methoden die CTC-Identifikation immer anhand von Zytokeratin-Expression stattfindet (135). CellSearch™ erfasst jedoch auch CTCs mit einer niedrigen EpCAM-Expression (107, 109) und mit einer heterogenen Zytokeratin- und auch Vimentin-Expression (110). Der Hypothese nach sollten daher auch mittels epithelialer Marker nachgewiesene CTCs mesenchymale Charakteristika aufweisen. Interessanterweise konnten die gewonnenen Daten die Hypothese nicht bestätigen, sondern ergaben für die Mehrzahl der CTCs Methylierungsmuster, welche einem epithelialen Phänotyp zuzuordnen sind. Damit legen die hier gewonnenen Daten nahe, dass bei CellSearch™-CTCs die untersuchten EMT-assoziierten Gene in der Mehrzahl nicht durch DNA-Methylierung supprimiert werden. Da verschiedene funktionelle Daten bei fehlender Methylierung der beiden miR200 Genpromoter eine aktive Transkription der mikro-RNAs nachwiesen (46, 47, 136, 137), kommt es bei den CTCs offensichtlich zu einer Stabilisierung der doppelt negativen Rückkopplungsschleife zwischen den miRNAs der miR200-Familie und ZEB1 (41, 138), woraus eine anhaltende Repression von ZEB1 resultiert. ZEB1 gilt als ein direkter Repressor der E-Cadherin-Expression sowie weiterer EMT-induzierender

Gene, wie Lgl2, PATJ, HUGL2 und Crumbs3 (139-141) und damit als ein wichtiger Treiber für eine EMT-Induktion. Bei der Mehrzahl der CTCs ist aufgrund des Methylierungsstatus eine hohe miR200 Expression zu erwarten, die eine mesenchymale Differenzierung über ZEB1 verhindert. Allerdings konnten innerhalb und zwischen den Entitäten Heterogenitäten bezüglich der Methylierung der miR200-Familie festgestellt werden. So war bei einem mBC-Patienten der miR200b/a/429-Locus bei allen analysierten CTCs fast vollständig methyliert. Interessanterweise zeigten die mCRPC-CTCs im Vergleich zu den mBC-CTCs höhere Methylierungsraten bei den miR200-Genloci. Dies ist ein Hinweis auf eine heterogene Supprimierung der miR200-Familie, die bei einzelnen CTCs eine mesenchymale Differenzierung durch ZEB1 ermöglichen könnte. Die Beobachtung von heterogenen Methylierungsmustern der analysierten CTCs und die Tatsache, dass die EpCAM^{pos} CTCs sowohl epitheliale als auch in einigen Fällen mesenchymale Merkmale besitzen, könnten unterschiedliche EMT-Stadien mit unterschiedlicher phänotypischer Differenzierung der CTCs widerspiegeln. Bereits Yu et al. konnten mBC-CTCs anhand der Expression von sieben epithelialen Markern (Zytokeratine 5,7,8,18 und 19, EpCAM und CDH1) und drei mesenchymalen Markern (Fibronectin1, CDH2, SERPINE1/PAI) in verschiedene EMT-Stadien mit unterschiedlicher phänotypischer Differenzierung einteilen (113). Der dynamische Wechsel zwischen den EMT-Stadien kann den CTCs sowohl die Extravasation als auch die Absiedlung bzw. Metastasierung in andere Organe ermöglichen (142). Damit sich Krebszellen erfolgreich aus dem Zellverband lösen und aktiv in den Blutkreislauf gelangen können, wird ein mesenchymaler Phänotyp als vorteilhaft beschrieben (143), während die Absiedlung und Bildung einer neuen Metastase in fremden Organen durch die Zurückerlangung eines epithelialen Phänotyps erleichtert wird (144, 145).

Fraglich bleibt, warum bei der Mehrheit der CTCs nur einer der beiden miR200-Loci hypermethyliert war. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei MDA-MB-231 oder CD45^{pos}-Zellen beide Genpromotoren methyliert. Es bleibt hypothetisch, ob dies bei den analysierten CTCs Ausdruck einer dynamischen Feinabstimmung zwischen einem mesenchymalen und epithelialen Phänotyp ist.

Die heterogenen Methylierungsmuster und die damit verbundene phänotypische Differenzierung der CTCs könnten jedoch auch auf unterschiedliche Tumorstadien mit unterschiedlicher Prognose hinweisen. So konnte bei CTCs von Patienten mit lokalem

Hochrisiko-Prostatakarzinom noch eine Expression von 81% bei E-Cadherin nachgewiesen werden (146), während bei CTCs von Patienten mit dem deutlich aggressiveren mCRPC eine Supprimierung der E-Cadherin-Expression auf 53% beobachtet wurde (147). Es bleibt jedoch hypothetisch, ob die Methylierungsmuster der drei EMT-assoziierten Gene mit den klinischen Daten, insbesondere mit dem Tumorstadium und der Prognose der Patienten, korrelieren. Leider waren die klinischen Daten der Patienten während dieser Arbeit nicht zugänglich, sodass hierüber keine Aussagen gemacht werden können.

7 Ausblick

Während dieser Arbeit konnten das Potential und die Vorteile von multiplexed-scAEBS bei Einzelzellanalysen angedeutet werden. Die einfache Anwendbarkeit für locus-spezifische biologische Fragestellungen offenbart jedoch gleichzeitig die Stärke und Limitation dieser Applikation. Während die hohe Effizienz von multiplexed-scAEBS für locus-spezifische Analysen während dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist mit dieser Methode eine genomweite Analyse nicht möglich. Tatsächlich offenbart die niedrige Effizienz von etablierten Methoden für die genomweite Methylierungsanalyse weiteren Entwicklungsbedarf, um den Verlust von wichtigen Informationen zu minimieren. Vor diesem Hintergrund ist es fraglich, inwiefern die Kombination von scAEBS mit RRBS (64) oder mit PBAT (148) neue Möglichkeiten für eine effizientere genomweite Einzelzellanalyse mit Bisulfit-Sequenzierung eröffnen könnte.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Kombination von scAEBS mit Methoden für Einzelzell-Transkriptom-Analysen. So konnte Klein et al. (149) bereits eine Kombination von Transkriptom- und Genomanalyse bei Einzelzellen etablieren, die technisch vermutlich auch das Potential für eine Kombination aus Transkriptom- und Methylierungsanalyse mit scAEBS bietet. Die direkte Analyse von DNA-Methylierung und RNA-Transkription auf Einzelzellniveau würde die Möglichkeit bieten, den Einfluss der epigenetischen Regulierung auf die Genexpression direkt darzustellen und damit wesentliche biologische Fragestellungen der Epigenetik zu beantworten, bzw. bestehende biologische Hypothesen zu bestätigen.

Das hier verwendete Panel für die Analyse der drei EMT-assoziierten Gene miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 kann je nach biologischer Fragestellung ausgetauscht oder erweitert werden. Gerade in Bezug auf die Untersuchung der epigenetischen Regulierung der EMT wäre die Methylierungsanalyse weiterer EMT-assoziiierter Gene interessant. So konnte unter anderem für die EMT-assoziierten Gene TWIST (150), RASSF1A (150) und Vimentin (151) eine epigenetische Regulierung bei Karzinomen beobachtet werden. In diesem Sinne wäre es von großem Interesse, das EMT-assoziierte Panel des Multiplex-PCR-Assays kontinuierlich zu erweitern. Zum Beispiel konnte im Blut zirkulierende methylierte DNA der V2-Region des Septin9-Gens (SEPT9) bereits als ein verlässlicher Biomarker für das kolorektale Karzinom beschrieben werden (152). Auch der Methylierungsstatus von Vimentin wurde schon in der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms sowie bei Urothelkarzinomen verwendet (153-

155). Die Untersuchung des Methylierungsstatus dieser Gene an CTCs könnte neue Möglichkeiten für Diagnostik, Prognose und Therapiemonitoring öffnen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist das Therapiemonitoring mittels Methylierungsanalyse von CTCs, um Chemotherapie-Resistenzen frühzeitig zu erkennen. Es konnten bereits mehrfach Chemotherapie-Resistenzen gegenüber Gemcitabin, Paclitaxel, Cisplatin, Doxorubicin, Docetaxel, EGFR-Inhibitoren und Vincristin mit einer Supprimierung der miR200-Familie beschrieben werden(156-164). Die Methylierungsanalyse der miR200-Familie bei CTCs könnte die Möglichkeit eröffnen, Patienten mit Chemotherapie-Resistenzen vor und unter Chemotherapie frühzeitig zu identifizieren und die Therapie entsprechend anzupassen.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) während der Metastasierung. (Abbildung modifiziert nach Gires und Stoecklein 2014 (10)).....	2
Abbildung 1.2 Regulierung von E-Cadherin über die Doppel-Negativ-Rückkopplungsschleife der mikroRNAs von miR200 und dem Transkriptionsfaktor ZEB1.	6
Abbildung 1.3 Strukturformeln von Cytosin und 5-Methylcytosin.	8
Abbildung 1.4 Bisulfit-Konvertierung von nicht methylierten Cytosinen. Bisulfit sulfoniert nicht methylierte Cytosine. Diese werden in der nachfolgenden hydrolytischen Reaktion deaminiert und durch die abschließende Behandlung mit NaOH zu Uracil desulfoniert. Methylierte Cytosine werden durch die Methylgruppe vor dem Bisulfitsalz geschützt und bleiben erhalten. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (67))	10
Abbildung 1.5 Prinzip des Agarose Embedded Bisulfite Sequencing	13
Abbildung 4.1 FACS-Analyse einer Probe mit Lymphozyten von GM14667 mit den zuvor festgelegten Bedingungen R1, R2, R3 zum Ablegen von intakten Zellen. Eine intakte Zelle wurde nur definiert als FSC-Height^{high}/PI^{neg}/SSC-Width^{low} abgelegt. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	25
Abbildung 4.2 Abgebildet sind die Ausschnitte der drei Promoterregionen von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1. In jedem Diagramm ist die Promoterregion durch die blaue Linie, die den Transkriptionsstart (TSS) flankiert, dargestellt. Die grünen Linien zeigen mittels Bisulfit-Sequenzierung bereits analysierte Abschnitte, welche zuvor publiziert wurden (14, 15, 46, 47). Die schwarzen Linien repräsentieren die während dieser Arbeit analysierten Abschnitte mit einer zusätzlichen höheren Auflösung, um die einzelnen CpG-Lokalisationen (vertikale schwarze Striche) darzustellen. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114)).....	26
Abbildung 4.3 Illustration des originalen Protokolls AEBS^{Tierling}. Nicht dargestellt sind die Aufreinigung des Agarose-Beads vor und nach der Bisulfit-Inkubation. Während alle Schritte von der Zellablage an in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß durchgeführt werden, wird die PCR in einem separaten 200 µl Eppendorf-Gefäß durchgeführt.	29

Abbildung 4.4 Illustration von scAEBS. Alle Schritte von der Zellablage bis einschließlich zur PCR wurden in einem 200 µl Eppendorf-Gefäß durchgeführt. Nicht dargestellt sind die Aufreinigung des Agarose-Beads vor und nach der Bisulfit-Inkubation.....	33
Abbildung 4.5 PCR-Strategie nach Bisulfit-Behandlung mit scAEBS. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114)).....	38
Abbildung 4.6 Sequenzierungsanalyse am Beispiel des miR200c/141 Genpromoters nach scABES. (A) Diagramm des miR200c/141-Genlocus mit der Lokalisation der 11 analysierten CpGs. (B) Elektropherogramm des Vorwärts- und Gegenstranges des Amplikons von miR200c/141. Der ausgewertete Bereich ist blau markiert. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114)).....	40
Abbildung 5.1 Repräsentatives Ergebnis der Gelelektrophorese der Primertestung von miR200c/141 an verdünnter bscDNA von MDA-MB-231 mit Temperaturgradient.	41
Abbildung 5.2. Gelelektrophorese nach Amplifikation von miR200c/141 nach Bisulfit-Konvertierung mittels AEBS_{Tierling}.	42
Abbildung 5.3. Gelelektrophorese nach Amplifikation von miR200c/141 nach Bisulfit-Modifikation mittels scAEBS_{pre}.	43
Abbildung 5.4. Gelelektrophorese nach Amplifikation des miR200c/141-Genpromoters von Proben mit weniger als zehn Zellen nach Bisulfit-Modifikation mittels scAEBS_{pre}.	44
Abbildung 5.5 Gelelektrophorese nach Amplifikation des miR200c/141-Genpromoters von Proben mit Einzelzellen und fünf Zellen nach Bisulfit-Modifikation mittels scAEBS von MDA-MB-231.	45
Abbildung 5.6 Methylierungsmuster des miR200c/141 Genpromoters von 20 Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 nach scAEBS-Analyse: Schwarze Punkte repräsentieren methylierte CpGs, blaue Punkte hemimethylierte CpGs, weiße Punkte unmethylierte CpGs. Schwarze Kästchen repräsentieren nicht konvertierte CpGs, blaue Kästchen hemikonvertierte CpGs und weiße Kästchen konvertierte CpGs.....	46
Abbildung 5.7 Methylierungsmuster und Bestimmung der Konversionsrate bei Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667 (A) mit einer Inkubationstemperatur während der Bisulfit-Konvertierung von 50°C (B) mit einer	

Inkubationstemperatur während der Bisulfit-Konvertierung von 56°C. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	47
Abbildung 5.8 Effizienz von multiplexed-scAEBS bei Einzelzellen der Lymphozytenzelllinie GM14667. (A) Erfolgsrate nach Sequenzierung (EnS) der einzelnen Genpromoter-Loci miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 mit multiplexed-scAEBS. (B) Erfolgreich sequenzierte Loci pro Zelle. Bei einer Inkubationstemperatur von 50°C konnte bei jeder Probe, bei 56°C bei 85% der Proben mindestens ein Locus pro Zelle analysiert werden. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	48
Abbildung 5.9 Methylierungsanalyse der Genpromotoren von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 bei Einzelzellen von Brustkrebszelllinien. (A) Methylierungsmuster von je 20 Einzelzellen der mesenchymalen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und der epithelialen Brustkrebszelllinie MCF-7. (B) EnS der einzelnen Genpromotoren. (C) Erfolgreich sequenzierte Loci pro Zelle. Bei den MDA-MB-231 konnte in 90% der Proben, bei MCF-7 in 80% mindestens ein Genpromoter pro Probe analysiert werden (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	49
Abbildung 5.10 Methylierungsanalyse und Effizienz von EpCAM^{pos} mBC- und mCRPC-CTCs und CD45^{pos} Zellen. (A) Gestapelte Balkendiagramme repräsentieren die Methylierungsprofile von miR200c/141, miR200b/a/429 und CDH1 von 94 CTCs von 11 mBC-Patienten und 65 CTCs von sechs mCRPC-Patienten sowie 30 CD45 ^{pos} von drei mBC-Patienten. (B) EnS der drei amplifizierten Loci. (C) Anzahl der sequenzierten Loci/Zelle. Bei 63% der CTCs und 93% bei CD45 ^{pos} Zellen konnte mindestens ein Locus pro Zelle analysiert werden. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	51
Abbildung 5.11 Methylierungsprofile nach Analyse mit multiplexed-scAEBS von (A) 94 EpAM^{pos} CTCs von 11 mBC-Patienten, (B) 65 EpCAM^{pos} Patienten von sechs mBC-Patienten und (C) 30 CD45^{pos} Zellen von drei mBC-Patienten. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	52
Abbildung 6.1 Optimierung von AEBS_{Tierling} zu scAEBS. (Abbildung modifiziert nach Pixberg et al. (114))	55

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien und deren Ursprung	19
Tabelle 2 Primersequenzen	27
Tabelle 3 PCR Programm für die Primeretablierung mit dem Temperaturgradient a-e	27
Tabelle 4 Primersequenzen für die Sequenzierung	28
Tabelle 5 PCR-Programm für die Amplifikation von miR200c/141	31
Tabelle 6 PCR-Programm für die Multiplex-PCR	36
Tabelle 7 PCR-Programm für die spezifische PCR.....	37
Tabelle 8 Vergleich der Methylierungsraten generiert mit multiplexed-scAEBS und Standardmethoden bei MDA-MB-231 und MCF-7	56

10 Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	<i>3' untranslatierte Region</i>
aCGH	<i>Array-basierte komparative genomische Hybridisierung</i>
AEBS	<i>Agarose Embedded Bisulfite Sequencing</i>
Aqua dest.	<i>destilliertes Wasser</i>
AR-V7	<i>Androgenrezeptor-Spleißvariante 7</i>
bscDNA	<i>bisulfitkonvertierte DNA</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CK	<i>Zytokeratin</i>
CpG	<i>Cytosin-Guanin-Dinukleotid</i>
CpGs	<i>non-CpG-Cytosine</i>
CTBP	<i>C-terminal-binding-Protein</i>
CTCs	<i>zirkulierende Tumorzellen</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DMNT	<i>DNA-Methyltransferase</i>
EMT	<i>epitheliale-mesenchymale-Transition</i>
EnS	<i>Erfolgsrate nach Sequenzierung</i>
EpCAM	<i>Epithelial-Cell-Adhesion-Molecule</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPMLE	<i>Human Mammary Epithelial</i>
HPSF	<i>High Purity Salt Free</i>
LMP-Agarose	<i>Low-Melting-Point Agarose</i>
mBC	<i>metastasiertes Mammakarzinom</i>
MBDs	<i>m⁵-CpG-binding Domain Protein</i>
mCRPC	<i>metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom</i>
MDCK	<i>Madin Canine Kidney</i>
MET	<i>Mesenchymale-Epitheliale-Transition</i>
miRNAs	<i>mikro-RNAs</i>
multiplexed-scAEBS	<i>multiplexed-single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
PBAT	<i>Post-Bisulfite- Adaptor Tagging</i>
PCAF	<i>CBP-associated factor</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	<i>Propidium Iodid</i>
PR	<i>Progesteronrezeptor</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RRBS	<i>Reduced Representation Bisulfite Sequencing</i>
scAEBS	<i>single-cell Agarose Embedded Bisulfite Sequencing</i>
scBS-seq	<i>single-cell Bisulfite Sequencing</i>
scWGBS	<i>single-cell Whole Genome Bisulfite Sequencing</i>
SLBS	<i>Single-cell locus-specific bisulfite sequencing</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
SWI/SNF	<i>Swich/sucrose nonfermentable</i>
Tcf/LEF	<i>Transcription factor/Lymphoid enhancer binding protein</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TGF-beta	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
WAVE3	<i>WAS protein famliy member 3</i>

WGA *Whole Genome Amplification*
ZEB *Zinc-finger E-Box-binding*
ZO-1 *Zonula occludens-1*

11 Literaturverzeichnis

1. Trelstad RL, Hay ED, Revel JD. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev Biol.* 1967;16(1):78-106.
2. Trelstad RL, Revel JP, Hay ED. Tight junctions between cells in the early chick embryo as visualized with the electron microscopy. *J Cell Biol.* 1966;31(1):C6-10.
3. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.
4. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90.
5. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
6. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(6):F1060-7.
7. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23337-47.
8. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(8):952-61.
9. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst.* 1970;45(4):773-82.
10. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(22):4393-402.
11. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(12):693-701.
12. Volk T, Cohen O, Geiger B. Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells. *Cell.* 1987;50(6):987-94.
13. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):767-79.
14. Brambert PR, Kelsch DJ, Hameed R, Desai CV, Calafiore G, Godley LA, et al. DNMT3B7 expression promotes tumor progression to a more aggressive phenotype in breast cancer cells. *PLoS One.* 2015;10(1):e0117310.
15. Farias EF, Petrie K, Leibovitch B, Murtagh J, Chornet MB, Schenk T, et al. Interference with Sin3 function induces epigenetic reprogramming and differentiation in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(26):11811-6.
16. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7(6):415-28.
17. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72.
18. Sanchez-Tillo E, Lazaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene.* 2010;29(24):3490-500.
19. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* 2003;22(10):2453-62.
20. Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias A, Beltran M, Peiro S, et al. Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2011;286(14):12024-32.
21. Medina PP, Slack FJ. microRNAs and cancer: an overview. *Cell cycle.* 2008;7(16):2485-92.
22. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):23-36.

23. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007;17(3):118-26.
24. Friedman RC, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009 Jan;19(1):92-105.
25. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget.* 2015;6(9):6472-98.
26. Korpai M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 2008;283(22):14910-4.
27. Tellez CS, Juri DE, Do K, Bernauer AM, Thomas CL, Damiani LA, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer research.* 2011;71(8):3087-97.
28. Senol O, Schaaij-Visser TB, Erkan EP, Dorfer C, Lewandrowski G, Pham TV, et al. miR-200a-mediated suppression of non-muscle heavy chain IIb inhibits meningioma cell migration and tumor growth in vivo. *Oncogene.* 2015;34(14):1790-8.
29. Sun Y, Shen S, Liu X, Tang H, Wang Z, Yu Z, et al. MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2014;390(1-2):19-30.
30. Williams LV, Veliceasa D, Vinokour E, Volpert OV. miR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis. *PloS one.* 2013;8(12):e83991.
31. Humphries B, Wang Z, Oom AL, Fisher T, Tan D, Cui Y, et al. MicroRNA-200b targets protein kinase Calpha and suppresses triple-negative breast cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 2014;35(10):2254-63.
32. Choi YC, Yoon S, Jeong Y, Yoon J, Baek K. Regulation of vascular endothelial growth factor signaling by miR-200b. *Mol Cells.* 2011;32(1):77-82.
33. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2011;60(4):1314-23.
34. Shi L, Zhang S, Wu H, Zhang L, Dai X, Hu J, et al. MiR-200c increases the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cell line A549 by targeting VEGF-VEGFR2 pathway. *PloS one.* 2013;8(10):e78344.
35. Roybal JD, Zang Y, Ahn YH, Yang Y, Gibbons DL, Baird BN, et al. miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1. *Molecular cancer research : MCR.* 2011;9(1):25-35.
36. Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat Commun.* 2013;4:2427.
37. Sossey-Alaoui K, Bialkowska K, Plow EF. The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 2009;284(48):33019-29.
38. Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, Uhlmann S, et al. MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol.* 2012;32(3):633-51.
39. Li J, Tan Q, Yan M, Liu L, Lin H, Zhao F, et al. miRNA-200c inhibits invasion and metastasis of human non-small cell lung cancer by directly targeting ubiquitin specific peptidase 25. *Molecular cancer.* 2014;13:166.
40. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):593-601.
41. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research.* 2008;68(19):7846-54.
42. Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol.* 2008;216(4):418-27.

43. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008;22(7):894-907.
44. Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon YJ, Volinia S, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med.* 2011;208(5):875-83.
45. Lim YY, Wright JA, Attema JL, Gregory PA, Bert AG, Smith E, et al. Epigenetic modulation of the miR-200 family is associated with transition to a breast cancer stem-cell-like state. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 10):2256-66.
46. Neves R, Scheel C, Weinhold S, Honisch E, Iwaniuk KM, Trompeter HI, et al. Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Res Notes.* 2010;3:219.
47. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, et al. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene.* 2012;31(16):2062-74.
48. Lewin B. *Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik.* VCH. Weinheim 1991;2. Auflage:S. 885.
49. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007;128(4):635-8.
50. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462(7271):315-22.
51. Dodge JE, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M, Li E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene.* 2002;289(1-2):41-8.
52. Ziller MJ, Muller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, et al. Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet.* 2011;7(12):e1002389.
53. Chatterjee R, Vinson C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819(7):763-70.
54. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196(2):261-82.
55. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(5):1412-7.
56. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* 2010;6(9):e1001134.
57. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science.* 2010;328(5980):916-9.
58. Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics.* 2015;7(6):1051-73.
59. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10(5):576-81.
60. Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010;11(3):191-203.
61. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(5):1827-31.
62. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(15):2990-7.
63. Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis.* 2002;23(24):4072-9.

64. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic acids research*. 2005;33(18):5868-77.
65. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 2008;454(7205):766-70.
66. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*. 2010;20(3):320-31.
67. Pixberg CF, Schulz WA, Stoecklein NH, Neves RP. Characterization of DNA Methylation in Circulating Tumor Cells. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1053-75.
68. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(13):E65-5.
69. Ehrich M, Zoll S, Sur S, van den Boom D. A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(5):e29.
70. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, et al. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. *PLoS One*. 2014;9(4):e93933.
71. Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet*. 2003;12(22):2873-9.
72. Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(3):352-61.
73. Geuns E, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet*. 2007;44(2):144-7.
74. Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(24):5064-6.
75. EpiGeneSys.eu. Tierling S, Reither S, Walter J. Bisulfite sequencing of small DNA/cell samples (PROT35) [updated 2007 November 12]. Available from: http://www.epigenesys.eu/images/stories/protocols/pdf/20111026124522_p35.pdf.
76. Zhang W, Xia W, Lv Z, Ni C, Xin Y, Yang L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(2):755-68.
77. Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Jiang JK, Lin CH. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications. *Cancers (Basel)*. 2014;6(4):2369-86.
78. Yap TA, Lorente D, Omlin A, Olmos D, de Bono JS. Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2553-68.
79. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897-904.
80. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.
81. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(14 Pt 1):4218-24.
82. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406-14.
83. Nole F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol*. 2008;19(5):891-7.

84. Gruber I, Landenberger N, Staebler A, Hahn M, Wallwiener D, Fehm T. Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res.* 2013;33(5):2233-8.
85. Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology.* 2005;65(4):713-8.
86. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3213-21.
87. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(19):6302-9.
88. Serrano MJ, Rovira PS, Martinez-Zubiaurre I, Rodriguez MD, Fernandez M, Lorente JA. Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy. *Exp Ther Med.* 2012;4(1):43-8.
89. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(21):7004-10.
90. Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(5).
91. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnett HD, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol.* 2000;18(7):1432-9.
92. Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5153-9.
93. Scher HI, Heller G, Molina A, Attard G, Danila DC, Jia X, et al. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1348-55.
94. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *ProcNatlAcadSciUSA.* 2004;101(25):9393-8.
95. Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer ResTreat.* 2009;118(3):523-30.
96. Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(2):403-12.
97. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoSOne.* 2012;7(5):e33788.
98. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMCCancer.* 2011;11:422.
99. Schramm A, Friedl TW, Schochter F, Scholz C, de Gregorio N, Huober J, et al. Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program. *Archives of gynecology and obstetrics.* 2016;293(2):271-81.
100. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubner B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1028-38.
101. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med.* 2014;20(8):897-903.

102. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013;31(6):539-44.
103. Neves RPL, Raba K, Schmidt O, Honisch E, Meier-Stiegen F, Behrens B, et al. Genomic high resolution profiling of single CKpos/CD45neg flow-sorting purified circulating tumour cells from patients with metastatic breast cancer. *ClinChem.* 2014:Accepted for publication.
104. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med.* 2014;6(11):1371-86.
105. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of oncology.* 2010;2010:617421.
106. Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, et al. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(41):16580-5.
107. Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA, Jr., et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol.* 2005;27(1):49-57.
108. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Rose L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012;12:178.
109. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(1):61-6.
110. Polioudaki H, Agelaki S, Chiotaki R, Politaki E, Mavroudis D, Matikas A, et al. Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer.* 2015;15:399.
111. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):449-55.
112. Wu S, Liu S, Liu Z, Huang J, Pu X, Li J, et al. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PloS one.* 2015;10(4):e0123976.
113. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 2013;339(6119):580-4.
114. Pixberg CF, Raba K, Muller F, Behrens B, Honisch E, Niederacher D, et al. Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells. *Oncogene.* 2017;36(23):3223-31.
115. Neves RP, Raba K, Schmidt O, Honisch E, Meier-Stiegen F, Behrens B, et al. Genomic high-resolution profiling of single CKpos/CD45neg flow-sorting purified circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem.* 2014;60(10):1290-7.
116. Kirkwood BRaJACS. *Essential medical statistics.* 2003;2nd ed,Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
117. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *BrJCancer.* 2006;94(5):661-71.
118. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(8):4494-9.
119. Gravina S, Ganapathi S, Vijg J. Single-cell, locus-specific bisulfite sequencing (SLBS) for direct detection of epimutations in DNA methylation patterns. *Nucleic acids research.* 2015.
120. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, et al. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene.* 2011;31(16):2062-74.

121. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(5):525-32.
122. Spiliotaki M, Mavroudis D, Kapranou K, Markomanolaki H, Kallergi G, Koinis F, et al. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Res.* 2014;16(6):485.
123. Rossi E, Basso U, Celadin R, Zilio F, Pucciarelli S, Aieta M, et al. M30 neoepitope expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5233-43.
124. Larson CJ, Moreno JG, Pienta KJ, Gross S, Repollet M, O'Hara S M, et al. Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Cytometry A.* 2004;62(1):46-53.
125. Genereux DP, Johnson WC, Burden AF, Stoger R, Laird CD. Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic acids research.* 2008;36(22):e150.
126. Guo H, Zhu P, Wu X, Li X, Wen L, Tang F. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res.* 2013;23(12):2126-35.
127. Clark SJ, Smallwood SA, Lee HJ, Krueger F, Reik W, Kelsey G. Genome-wide base-resolution mapping of DNA methylation in single cells using single-cell bisulfite sequencing (scBS-seq). *Nat Protoc.* 2017;12(3):534-47.
128. Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, Krueger F, Saadeh H, Peat J, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2014;11(8):817-20.
129. Farlik M, Sheffield NC, Nuzzo A, Datlinger P, Schonegger A, Klughammer J, et al. Single-cell DNA methylome sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics. *Cell Rep.* 2015;10(8):1386-97.
130. Gravina S, Dong X, Yu B, Vijg J. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing uncovers extensive heterogeneity in the mouse liver methylome. *Genome Biol.* 2016;17(1):150.
131. Clark SJ, Lee HJ, Smallwood SA, Kelsey G, Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome biology.* 2016;17:72.
132. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 1995;55(22):5195-9.
133. Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem.* 1997;272(35):22322-9.
134. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *ProcNatl AcadSciUSA.* 1995;92(16):7416-9.
135. Stoecklein NH, Fischer JC, Niederacher D, Terstappen LW. Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution. Expert review of molecular diagnostics. 2016;16(2):147-64.
136. Vrba L, Jensen TJ, Garbe JC, Heimark RL, Cress AE, Dickinson S, et al. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoSOne.* 2010;5(1):e8697.
137. Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjot L, Ramanathan R, Hansen TB, et al. Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *IntJCancer.* 2011;128(6):1327; 1-34.
138. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9(6):582-9.

139. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(14):2375-85.
140. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *JBiolChem*. 2002;277(42):39209-16.
141. Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell cycle*. 2015;14(4):481-7.
142. Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res*. 2009;69(18):7135-9.
143. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*. 2012;22(6):725-36.
144. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res*. 2006;66(23):11271-8.
145. Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res*. 2008;68(24):10377-86.
146. Pal SK, He M, Wilson T, Liu X, Zhang K, Carmichael C, et al. Detection and phenotyping of circulating tumor cells in high-risk localized prostate cancer. *Clinical genitourinary cancer*. 2015;13(2):130-6.
147. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9(8):997-1007.
148. Miura F, Enomoto Y, Dairiki R, Ito T. Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(17):e136.
149. Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol*. 2002;20(4):387-92.
150. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *IntJCancer*. 2003;107(6):970-5.
151. Ulirsch J, Fan C, Knafl G, Wu MJ, Coleman B, Perou CM, et al. Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137(2):383-96.
152. deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*. 2009;55(7):1337-46.
153. Costa VL, Henrique R, Danielsen SA, Duarte-Pereira S, Eknaes M, Skotheim RI, et al. Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(23):5842-51.
154. Reinert T, Borre M, Christiansen A, Hermann GG, Orntoft TF, Dyrskjot L. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation. *PloS one*. 2012;7(10):e46297.
155. Itzkowitz S, Brand R, Jandorf L, Durkee K, Millholland J, Rabeneck L, et al. A simplified, noninvasive stool DNA test for colorectal cancer detection. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(11):2862-70.
156. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2113-29.

157. Ali S, Ahmad A, Banerjee S, Padhye S, Dominiak K, Schaffert JM, et al. Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer research*. 2010;70(9):3606-17.
158. Cochrane DR, Howe EN, Spoelstra NS, Richer JK. Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers. *Journal of oncology*. 2010;2010:821717.
159. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *International journal of cancer*. 2010;127(8):1785-94.
160. Chen J, Tian W, Cai H, He H, Deng Y. Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. *Medical oncology*. 2012;29(4):2527-34.
161. Rui W, Bing F, Hai-Zhu S, Wei D, Long-Bang C. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(1-2):206-14.
162. Feng B, Wang R, Song HZ, Chen LB. MicroRNA-200b reverses chemoresistance of docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells by targeting E2F3. *Cancer*. 2012;118(13):3365-76.
163. Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(16):5060-72.
164. Zhu W, Xu H, Zhu D, Zhi H, Wang T, Wang J, et al. miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2012;69(3):723-31.

Danksagung

Es ist mir ein großes Anliegen der Vielzahl aller Beteiligten, mit denen ich während dieser Doktorarbeit zusammenarbeiten durfte, für ihre Hilfe und Expertise zu danken. Leider ist es mir an dieser Stelle nicht möglich, allen diesen Personen persönlich zu danken.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein, der mir in all den Jahren im wahrsten Sinne des Wortes zu einem Doktorvater wurde. Durch die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit, seine Expertise sowie die exzellente Organisation und Infrastruktur seines Labors, wurde das ambitionierte Unterfangen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. rer. nat. Rui Pedro Neves, der für diese Doktorarbeit die Grundlage durch seine Vorarbeiten gelegt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Er hatte wesentlichen Anteil an den während dieser Arbeit erschienen Veröffentlichungen. An dieser Stelle möchte ich mich hierfür besonders bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Bianca Behrens hat mich während der gesamten Zeit dieser Doktorarbeit, besonders in den vielen sehr schwierigen Phasen, stets ermutigt und mir immer wieder die Augen für neue Wege und Lösungsansätze geöffnet. An dieser Stelle möchte ich ebenfalls dem gesamten Team der chirurgischen Forschung danken, die mich immer unterstützt haben. Namentlich sei hier besonders Frau Svetlana Seidschner erwähnt.

Ich danke meiner Mutter und meinem Vater, Heike und Ulrich Pixberg, die durch ihre Hingabe und ihre Aufopferung den gesamten Weg bis zu diesem Punkt erst ermöglicht haben. Ohne sie wäre mein gesamter medizinischer Werdegang nicht möglich gewesen. Ebenfalls danke ich meinen Großeltern Horst und Edith Lahrenberg, meinem Bruder Christian Pixberg sowie meinem Schul- und Studienfreund Arwed Elias Michael.

Bei allem Dank, der Menschen gebührt, so sei ein jeder Leser daran erinnert, dass alles menschliche Streben stets in der Hand des Einen liegt. Das ist der, durch den und für den alles geschaffen ist, das ist der Herr Jesus Christus.