
Molekulare Untersuchungen onkologisch relevanter Biomarker als Baustein für die personalisierte Medizin

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von Alena Leunov (geb. Gribko)

geboren am 02.01.1989 in St. Petersburg

24. FEBRUAR 2025

Mainz

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	6
2.1 Krebs und Tumorgenese	6
2.2 Proteasen und Krebs	8
2.3 Threonin Aspartase 1 (Taspase1)	10
2.4 Taspase1 Zielproteine	14
2.4.1 MLL	14
2.4.2 TFIIA	15
2.5 Taspase1-Shuttle Protein Nucleophosmin	16
2.5.1 Die Struktur und Funktion von NPM1	18
2.5.2 Zelluläre Lokalisation von NPM1	21
2.5.3 Inhibition von NPM1	22
2.6 NPM1 und Krebs	23
2.7 Kopf-Hals-Tumore	25
2.8 Gewebeinvasion und Metastasierung	27
2.9 Neuartige Biomarker als Therapieansatz	28
2.10 Zirkulierende Tumorzellen	29
2.11 Zielsetzung der Arbeit	33
3. Material und Methoden	35
3.1 Material	35
3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	35
3.1.2 Chemikalien	35
3.1.3 Geräte	38
3.1.4 Verwendete Antikörper	40

3.1.5 Beads	43
3.1.6 Oligonukleotide	43
3.1.7 Vektoren	45
3.1.8 Bakterienstämme und Kulturbedingungen	51
3.1.9 Zelllinien	51
3.1.10 Zellkulturmedien	52
3.1.11 Software	53
3.2 Molekularbiologische Methoden	54
3.2.1 Polymerasekettenreaktion	54
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Restriktion	55
3.2.3 Gel-Elution	56
3.2.4 DNA-Ligation	56
3.2.5 Transformation kompetenter Zellen	57
3.2.6 Plasmidvermehrung	57
3.2.7 Plasmidpräparation	58
3.2.8 Bakterien-Stock wegfrieren	58
3.2.9 DNA-Quantifizierung	58
3.2.10 Sequenzierung	59
3.2.11 RNA-Extraktion	59
3.2.12 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA	59
3.3 Proteinbiochemische Methoden	59
3.3.1 Protein Maxi-Präparation	59
3.3.2 Herstellung von Gesamt-Zelllysaten	61
3.3.3 Immunpräzipitation (IP)	62
3.3.4 Bradford zur Proteinquantifizierung	63
3.3.5 SDS-PAGE	63
3.3.6 Native-PAGE	64
3.3.7 Elektrophorese mit Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel	65
3.3.8 Western Blot/ Immunblot	65
3.3.9 Strippen der Western Blot Membran	66
3.4 Zellbasierte Methoden	67
3.4.1 Kultivierung von Zellen	67

3.4.2 Zellen wegfrieren	67
3.4.3 Zellzählung	68
3.4.4 Transfektionen	68
3.4.5 Inhibitor-Behandlung	70
3.4.6 Bestrahlung mit γ -Strahlen	71
3.4.7 Immunfluoreszenzfärbung	71
3.4.8 Färbung mit PKH26 Red Fluorescent Linker Kit	72
3.4.9 Zellsynchronisation	73
3.4.10 Mikroinjektion	73
3.5 Methoden zur Isolation von Zellen und Mikrovesikeln	74
3.5.1 Beadkopplung (Dynabeads MyOne Streptavidin T1)	74
3.5.2 Zellfärbung mit CFSE (zum Fangen der Zellen)	75
3.5.3 Fangen von einzelnen Zellen	75
3.5.4 Standardanreicherung (mit Dynabeads MyOne Streptavidin T1)	76
3.5.5 Anreicherung EpCAM mit MACS-Miltenyi-Prinzip	76
3.5.6 Anreicherung mit wieder ablösbaren Beads (Flow Comp Dynabeads Flexi-Kit)	78
3.5.7 Färbeprotokoll für die Isolation mit DSB-X	80
3.5.8 Isolation mittels PluriSelect	81
3.5.9 Exosomen Isolation	81
3.6 Biochemische Analysen	83
3.6.1 Cell Titer Glo Assay	83
3.6.2 Alamar Blue	83
3.6.3 Life/Dead - Viability/Cytotoxicity-Kit	84
4. Ergebnisse	85
4.1 Die nukleoläre Lokalisation von NPM wird durch Veränderungen im N-Terminus beeinträchtigt	85
4.2 Die Aktivität von NPM wird durch die Oligomerisationsdomäne gesteuert	86
4.3 Mutationen im N-Terminus von NPM beeinflussen die nukleoläre Struktur	89
4.4 Die Interaktion von NPM1 mit Taspase1 wird anhand der N-terminalen Oligomerisations-/Chaperon-Domäne gesteuert	93

4.5. Eingrenzung der Bindungsdomäne von Taspase1: Die Lokalisierungs- und Aktivitätsbereiche von Taspase1 sind in ihre Untereinheiten aufgeteilt	95
4.6 Interaktion mit NPM1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Spaltfähigkeit von Taspase1	99
4.7 Die Rolle von "Taspase1" bei der Sensibilisierung von NPM-Mutanten gegenüber Chemotherapie	99
4.8 Taspase1 beeinflusst den synergistischen Effekt einer Kombinationsbehandlung	103
4.9 Die Etablierung der IsoMAG IMS Einheit zur Isolation von CTCs	106
4.9.1. Kultivierungsversuch von einzelnen Zellen	122
4.9.2 Wachstum von einzeln gefangenen Zellen im Slide	122
4.9.3 Kultivierung von Antikörper-gelabelten Zellen	123
4.9.4 Kultivierung von Zellen auf MEF-Rasen	124
4.10 Etablierung des Flow Comp Flexi Kits	124
4.11 Flow Comp Flexi Kit in Verbindung mit IsoMAG IMS Einheit	126
4.11.1 Isolation von gespickten Zellen in Blut	128
4.11.2 Isolation mit CSV-DSB-X-Antikörper	129
4.11.3 Minimierung des Zellstresses durch Verwendung eines schwachen Magneten	130
4.12 Etablierung des Färbeprotokolls und Isolation von CTCs aus Patientenblutproben	131
4.13 Tumorassoziierte Mikrovesikel als weiterer Faktor der „liquid biopsy“	134
4.14. Isolation von Mikrovesikeln im Vergleich	136
4.14.1 Ausfällung	136
4.14.2 Größenausschlusschromatographie	137
4.14.3 Ultrazentrifugation	138
4.14.4 Exosomenisolation mittels IsoMAG IMS Einheit	139
4.15 Exosomeninteraktion mit Mikrobiota	139
5. Diskussion	142
5.1 Gestörte nukleoläre Struktur der trans-dominanten NPM1-Mutanten	142
5.2 Veränderungen innerhalb des N-Terminus in NPM1 können dessen Interaktion mit Taspase1 beeinflussen	143

5.3 Therapieeffektivität bei kombinierter Behandlung mit Chemo- und Radiotherapie bei aktiver Taspase1	144
5.4 Therapiemaßnahmen durch die Inhibition eines Interaktionspartners	145
5.5 Einsatz zirkulierender Tumorzellen in zielgerichteten Therapiemaßnahmen	146
5.6 Limitierungen in der Anwendung von CTC-Techniken	148
5.7 Ausblick und Nutzung von neuartigen Techniken in der Patienten-Screening-Routine	149
6. Referenzen	153
7. Anhang	161
7.1 Anhang I	161
7.1 Anhang II	162
7.3 Anhang III: Publikation Review 1	162
7.3 Anhang IV: Publikation Review 2	186
7.4 Abkürzungsverzeichnis	216
8. Eidesstattliche Erklärung	220
9. Curriculum Vitae	221

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell zur Tumorgenese	8
Abbildung 2: Kristallstruktur von Taspase1.....	12
Abbildung 3: Taspase1-Transportmechanismus innerhalb der Zelle	17
Abbildung 4: NPM1-Domänenstruktur und Darstellung der Oligomerisierung.....	19
Abbildung 5: Expressionslevel und Acetylierungsstatus von NPM1	25
Abbildung 6: Darstellung der Ausbreitung von Tumorzellen während der Metastasierung mit Nennung der wichtigsten Marker	30
Abbildung 7: Darstellung der funktionellen Domänen von NPM1 und den erstellten NPM1-Mutanten ..	86
Abbildung 8: Auswirkungen des endogenen NPM1 und der Oligomerisationsfähigkeit auf die Lokalisation der NPM-Deletions- und Lokalisationsmutanten.....	88
Abbildung 9: Degradation der Nukleoli in bestimmten NPM-Mutanten	90
Abbildung 10: Nachbildung der Nukleoli-Degradation mittels Actinomycin-D	92
Abbildung 11: Darstellung von Taspase1-NPM-Mutanten-Interaktion	94
Abbildung 12: Taspase-Chimäre.....	98
Abbildung 13: Identifiziertes Taspase1-Ziel-Protein: USF2	99
Abbildung 14: Zellviabilitätsmessungen in Verbindung mit Chemotherapeutika-Behandlung.....	101
Abbildung 15: Einfluss der Taspase auf die Cisplatin behandelten NPM-Mutanten	103
Abbildung 16: Kombinationsbehandlung aus Chemotherapie und Bestrahlung.....	105
Abbildung 17: Immunomagnetische Detektion und Isolation von Zellen aus einer Blutprobe	107
Abbildung 18: Lebendzellaufnahmen von Zellenkultivierung unter verschiedenen Bedingungen	123
Abbildung 19: Positiv isolierte Zellen aus gespikter Probe mittles IsoMAG IMS Einheit	126
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von positiv detektierten Zellen	130
Abbildung 21: Zusammenfassende Darstellung von positiv detektierten Zellen aus Patientenblutproben	134
Abbildung 22: Schematische Darstellung der benutzten Interspanine.....	135
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Prinzips von Mikrovesikelextraktion mittels Fällung	136
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Mikrovesikelextraktion mittels Größenausschlusschromatographie.....	137
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Mikrovesikelextraktion mittels Ultrazentrifugation	138
Abbildung 26: Kinetik der Interaktion von extrahierten Exosomen und Sporen von <i>A. fumigatus</i>	140
Abbildung 27: Interaktionstestung von extrahierten Exosomen und Zellen	141

Abbildung 28: Schematische Darstellung verknüpft mit mikroskopischen Live-Zell-Bildern nach einer Mikroinjektion	152
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation.....	26
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	35
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	37
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	38
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper	40
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Beads	43
Tabelle 8: Primer für die Sequenzanalyse	43
Tabelle 9: PCR-Primer.....	43
Tabelle 11: Klonierungs-/Ausgangs-Vektoren.....	45
Tabelle 12: Humane Expressionsvektoren	45
Tabelle 14: Auflistung verwendeter Zelllinien	51
Tabelle 15: Auflistung verwendeter Zellkulturmedien	52
Tabelle 16: Auflistung verwendeter Programme	53

1. Zusammenfassung

Molekulare Untersuchungen onkologisch relevanter Biomarker sind entscheidend für die personalisierte Medizin, da sie die Diagnose von Krebserkrankungen präzisieren und die Entwicklung zielgerichteter Therapien ermöglichen können. Krebs ist laut Weltgesundheitsorganisation für jeden sechsten Todesfall verantwortlich und gilt als zweithäufigste Todesursache in Deutschland. In Europa erkranken jährlich 2,6 Millionen Menschen an Krebs, einer Erkrankung mit einem komplexen mehrstufigen Prozess einzelner Zellen, der bisher nicht vollständig erforscht ist. Durch die grundlagenwissenschaftliche Analyse von Tumor-assoziierten Strukturen können individuelle Tumoreigenschaften identifiziert und somit maßgeschneiderte Behandlungsstrategien entwickelt werden.

Die Threonin Aspartase 1 (Taspase1) wurde in diesem Zusammenhang als onkologisch relevante Protease mit Biomarker-Potential für verschiedene Tumorentitäten charakterisiert. Taspase1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von *Mixed Lineage Leukemia* (MLL)-Fusionsproteinen und demzufolge bei der Entstehung aggressiver Leukämien. Darüber hinaus wurde eine funktionelle Überexpression von Taspase1 bei einer Reihe von soliden Tumoren, wie auch den Kopf-Hals-Tumoren (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) gezeigt. HNSCC zeichnet sich durch eine schlechte Prognose aus, da in zwei Dritteln der Fälle die Diagnose erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt wird und die Metastasierung die Behandlungsmöglichkeiten erheblich erschwert. Hier kann Taspase1 nicht nur als prognostischer Biomarker, sondern auch als mögliches therapeutisches Zielprotein dienen.

Zur detaillierten Charakterisierung der onkologischen Aktivität von Taspase1 wurde im Rahmen dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf Protein-Interaktionen und subzelluläre Transportmechanismen gelegt, welche entscheidend an der Regulation ihrer proteolytischen Aktivität und somit ihrer onkogenen Wirkung beteiligt sind. Einer der wichtigsten und zugleich onkologisch relevanten Interaktionspartner von Taspase1, welcher der Protease den Zugang zum Nukleus und insbesondere zum Nukleolus ermöglicht, ist Nucleophosmin1 (NPM1). Da eine Hemmung der spezifischen Taspase1-NPM1-Interaktion einen innovativen Ansatz zur Taspase1-Hemmung darstellt, wurde zunächst die Interaktionsdomäne beider Proteine identifiziert. Die hierfür generierten Deletions- und Lokalisationsmutanten von NPM1 wiesen auf eine funktionell bedeutsame Region im N-Terminus von NPM1 hin. Veränderungen im Bereich von ± 100 Aminosäuren im N-Terminus beeinträchtigen die nukleoläre Lokalisation der NPM1-Mutanten. Die Aktivität von NPM1 wird zudem durch die Oligomerisationsdomäne gesteuert, wie Untersuchungen mit NPM1-*knockdown*-Zellen und Mutanten ohne Oligomerisationsdomäne belegen. Darüber hinaus wird die Interaktion von NPM1 mit Taspase1 hauptsächlich durch die N-terminale Oligomerisations-

/Chaperondomäne gesteuert, wobei die C-terminale Region (aa187-260) ebenfalls eine wichtige Rolle spielt.

Um die NPM1-Taspase1-Interaktion im Detail zu verstehen, wurden weitere Untersuchungen mit Hilfe von chimären Proteinen aus humaner und *Drosophila* Taspase1 (dTasp) durchgeführt. Im Gegensatz zur humanen Taspase1, zeigt die homologe Protease aus *Drosophila* keine Interaktion mit NPM1. Die proteolytisch aktive Taspase1 besteht aus zwei Untereinheiten, der α - und β -Untereinheit, welche in den hergestellten chimären Varianten aus unterschiedlichen Spezies stammen (α -hTasp/ β -dTasp und α -dTasp/ β -hTasp). Beide Taspase1-Chimären zeigten keine Interaktion mit endogenem NPM1. Lokalisationsstudien und Messungen der proteolytischen Aktivität der chimären Proteasen verdeutlichten, dass die subzelluläre Taspase1-Lokalisation von der α -Untereinheit abhängt, während die proteolytische Aktivität von der β -Untereinheit gesteuert wird.

Interessanterweise zeigen Zellen, welche NPM1-Mutanten in Kombination mit Taspase1 exprimieren, eine erhöhte Viabilität, was auf eine unterstützende Wirkung von Taspase1 auf NPM1 hinweist. Des Weiteren führte eine Taspase1-Überexpression zur gesteigerten Empfindlichkeit von HNSCC-Zellen gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung mit Cisplatin. Eine kombinierte Chemo- und Strahlentherapie erwies sich als besonders effektiv, wobei höhere Cisplatin-Dosen einen synergistischen Effekt mit der Bestrahlung aufweisen. Neben der molekularen Untersuchung der Taspase1-NPM1-Interaktion, wurden zudem neuartige Möglichkeiten zur Etablierung von zirkulierenden Biomarkern für die Tumor-Diagnostik erforscht.

Bedauerlicherweise werden lediglich bei einem Drittel aller Patienten die Karzinome in einem sehr frühen Stadium entdeckt und die verbleibende Mehrheit von zwei Dritteln bekommt die Diagnose Krebs in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt. Im Falle eines fortgeschrittenen HNSCC besteht die Behandlungsoption entweder aus einer Kombination aus chirurgischer Entfernung mit adjuvanter Radiotherapie und möglicher adjuvanter Chemotherapie oder einer primären Strahlentherapie. Um einerseits die Behandlungsoption der Patienten zu optimieren und auf das Niveau der „*personalized therapy*“ zu bringen, und andererseits eine frühere Diagnose der Erkrankung stellen zu können, werden die im Rahmen von „*liquid biopsy*“ zirkulierenden Tumorzellen im Blut von HNSCC-Patienten untersucht.

Verschiedene Detektionssysteme und Kulturmethode zur Isolierung und Identifikation dieser Zellen wurden optimiert. Kleine extrazelluläre Vesikel, sogenannte Exosomen, erwiesen sich als potenzielle Biomarker für die Frühdiagnostik. Experimente zur Isolierung und Untersuchung ihrer Interaktion mit anderen Zellen und Partikeln sowie zur zellulären Aufnahme von Exosomen durch Makrophagen lieferten

neue Einblicke in die Transportmechanismen innerhalb von Zellen. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Exosomen als diagnostische Biomarker, therapeutische Zielstrukturen oder Nanosysteme zur Medikamentenverabreichung genutzt werden könnten.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, welche neben ihrer grundlagenwissenschaftlichen Relevanz zudem das Potential haben, zukünftige Strategien der Krebsdiagnostik und -therapie zu beeinflussen.

Summary

Molecular studies of oncologically relevant biomarkers are crucial for personalized medicine as they can refine the diagnosis of cancer and enable the development of targeted therapies. According to the World Health Organization, cancer is responsible for one in six deaths and is the second leading cause of death in Germany. In Europe, 2.6 million people develop cancer annually. Cancer is a disease with a complex multi-stage process of individual cells, which has not yet been fully researched. Through basic scientific analysis of tumor-associated structures, individual tumor properties can be identified and customized treatment strategies can be developed.

In this context, Threonine Aspartase 1 (Taspase1) has been characterized as an oncologically relevant protease with biomarker potential for various tumor entities. Taspase1 plays a crucial role in the activation of Mixed Lineage Leukemia (MLL) fusion proteins and, thus, in the development of aggressive leukemias. Furthermore, functional overexpression of Taspase1 has been shown in a number of solid tumors, including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). HNSCC is characterized by a poor prognosis, since in two-thirds of the cases, the diagnosis is not made until an advanced stage, and metastasis significantly complicates treatment options. In this context, Taspase1 can serve not only as a prognostic biomarker, but also as a possible therapeutic target protein.

To characterize the oncological activity of Taspase1 in detail, this work focused particularly on protein interactions and subcellular transport mechanisms, which are crucially involved in the regulation of its proteolytic activity and thus its oncogenic effect. One of the most important and oncologically relevant interaction partners of Taspase1, which enables the protease to access the nucleus and, in particular, the nucleolus, is nucleophosmin1 (NPM1). Since an innovative approach to inhibiting Taspase1 involves inhibiting the specific Taspase1-NPM1 interaction, the first step was to identify the interaction domains of both proteins. The deletion and localization mutants of NPM1 generated for this purpose indicated a functionally significant region at the N-terminus of NPM1. Mutations within a range of ± 100 amino acids in the N-terminus affect the nucleolar localization of NPM1 mutants. The activity of NPM1 is also controlled by the oligomerization domain, as demonstrated by studies with NPM1-knockdown cells and mutants without an oligomerization domain. Furthermore, the interaction of NPM1 with Taspase1 is mainly controlled by the N-terminal oligomerization/chaperone domain, although the C-terminal region (aa187-260) also plays an important role.

To understand the NPM1-Taspase1 interaction in detail, further investigations were performed using chimeric proteins from human and *Drosophila* Taspase1 (dTasp). In contrast to human Taspase1, the homologous *Drosophila* protease does not interact with NPM1. The proteolytically active Taspase1 consists of two subunits, the α - and β -subunits, which in the chimeric variants originate from different species (α -hTasp/ β -dTasp and α -dTasp/ β -hTasp). Neither Taspase1 chimera interacted with endogenous NPM1. Localization studies and measurement of the proteolytic activity of chimeric proteases revealed that subcellular Taspase1 localization depends on the α -subunit, while proteolytic activity is controlled by the β -subunit.

Interestingly, cells expressing NPM1 mutants in combination with Taspase1 showed increased viability, indicating a supportive effect of Taspase1 on NPM1. Furthermore, Taspase1 overexpression increased the sensitivity of HNSCC cells to cisplatin chemotherapy. Combined chemotherapy and radiotherapy proved to be particularly effective, with higher cisplatin doses showing a synergistic effect with radiation. In addition to the molecular investigation of the Taspase1-NPM1 interaction, novel possibilities for establishing circulating biomarkers for tumor diagnostics were also investigated.

Unfortunately, carcinomas are only detected at a very early stage in one-third of all patients, whereas the remaining two-thirds are diagnosed with advanced-stage cancer. In the case of advanced HNSCC, treatment options consist of either a combination of surgical removal with adjuvant radiotherapy and possible adjuvant chemotherapy, or primary radiotherapy. In order to optimize the treatment option for patients and to bring it to the level of “personalized therapy”, on the one hand, and to enable earlier diagnosis of the disease, on the other, circulating tumor cells in the blood of HNSCC patients are examined using “liquid biopsy”.

Various detection systems and culture methods have been optimized for isolating and identifying these cells. Small extracellular vesicles, also known as exosomes, are potential biomarkers for early diagnosis. Experiments to isolate and study their interaction with other cells and particles, as well as the cellular uptake of exosomes by macrophages, have provided new insights into the transport mechanisms within cells. These findings suggest that exosomes could be used as diagnostic biomarkers, therapeutic targets, or nanosystems for drug delivery.

In summary, important insights were gained in the course of this work, which, in addition to their fundamental scientific relevance, have the potential to influence future strategies in cancer diagnosis and therapy.

2. Einleitung

2.1 Krebs und Tumorgenese

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verstarben im Jahr 2020 weltweit geschätzt 9,96 Millionen Menschen an Krebs (WHO 2020). Somit ist Krebs für jeden 6. Todesfall verantwortlich und zählt nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen als zweithäufigste Todesursache. Legt man den Fokus auf Europa, so ist Krebs verantwortlich für rund 25 Prozent aller Todesfälle mit jährlich 2,6 Millionen Neuerkrankungen. Zu den häufigsten Krebsarten gehören Brustkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs und Karzinome der kolorektalen Region [1].

Die Entstehung von Krebs umfasst einen komplexen mehrstufigen Prozess einzelner Zellen, der bisher nicht vollständig erforscht ist. Begünstigt wird die Entartung von Zellen durch diverse kanzerogene Faktoren. Neben der familiären Disposition sind auch einige exogene Risikofaktoren bekannt, wie beispielsweise das Rauchen, UV- oder ionisierende Strahlung und spezifische Viren. Ein bekanntes Beispiel für onkogene Viren stellen die Gebärmutterhalskrebs auslösenden humanen Papillomaviren dar [2, 3]. Für die Auslösung der Tumorgenese ist die Anhäufung von genetischen und epigenetischen Aberrationen in einer Zelle notwendig, die vor allem Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene betreffen [4]. Als Protoonkogene werden Gene bezeichnet, die in jeder Zelle vorkommen und für Proteine kodieren, welche Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren. Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sind Beispiele für solche von Protoonkogenen codierenden Proteine. Protoonkogene können durch eine dominante Mutation, eine sogenannte „*gain of function*“-Mutation, in Onkogene umgewandelt werden, die wiederum das Tumorwachstum fördern können. Im Gegensatz zu Protoonkogenen führt eine „*loss of function*“-Mutation im Zusammenhang mit Tumorsuppressorgenen, die als Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose fungieren, zu einem Funktionsverlust, der wiederum ebenfalls zur Entartung von Zellen führen kann. Tumorsuppressorgene codieren beispielsweise für Tumorsuppressorproteine wie p16, p27 oder p53. Somit wird in solchen Fällen die Bereitschaft in den Zellen zur Proliferation erhöht und der programmierte Zelltod unterdrückt.

Bis zur Entartung einer Zelle müssen demnach einige Grundbedingungen erfüllt werden, die Hanahan und Weinberg im Jahre 2000 erstmals in einem Modell zur Tumorgenese beschrieben. Die veröffentlichte Auflistung von biologischen Eigenschaften zur Charakterisierung von Tumoren wurde 2011 in „*Hallmarks of cancer: the next generation*“ um vier weitere Eigenschaften ergänzt [4, 5]. Demzufolge weisen Tumorzellen eine Reihe von physiologischen Veränderungen auf (Abbildung 1), wie beispielsweise die

Umgehung der Apoptose und die Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren. Des Weiteren können die Zellen eines soliden Tumors bis zu einer bestimmten Größe durch Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Die Resistenz gegenüber Wachstumssuppressoren und die zum Teil dadurch einhergehende Fähigkeit zur unbegrenzten Zellteilung sorgen für ein weiteres Wachstum des Tumors. Durch die Fähigkeit zur Bildung neuer Blutgefäße (Induktion von Angiogenese) wird eine optimale Versorgung des Tumors gewährleistet. Bedingt durch die lokale Invasion der Tumorzellen in tumorumgebendes Gewebe kann dieser ebenfalls Zugang zum hämatopoetischen bzw. lymphatischen System des erkrankten Organismus erlangen. Die Verbreitung von malignen Tumorzellen eines Ursprungstumors (Primärtumors) über die Blut- oder Lymphbahn in primär nicht erkrankte Organe und Gewebe nennt man Metastasierung [4]. Zu den ergänzten Eigenschaften des Modells nach Hanahan und Weinberg gehören die Genominstabilität und akkumulierende Mutationen, Immunkontrollen, tumorfördernde Entzündungsreaktionen und die Deregulation des zellulären Energiestoffwechsels [5]. Eine kürzlich bekannt gegebene Erweiterung der Krebseigenschaften beschreibt zusätzlich die phänotypische Plastizität, die genetische Umprogrammierung zur Sicherstellung von nützlichen Eigenschaften durch Genregulationsmechanismen, die zelluläre Seneszenz und die Bedeutung des humanen Mikrobioms („*polymorphic microbioms*“) für die Entstehung sowie Unterhaltung von Krebs, aber auch im Hinblick einer Schutzfunktion [6].

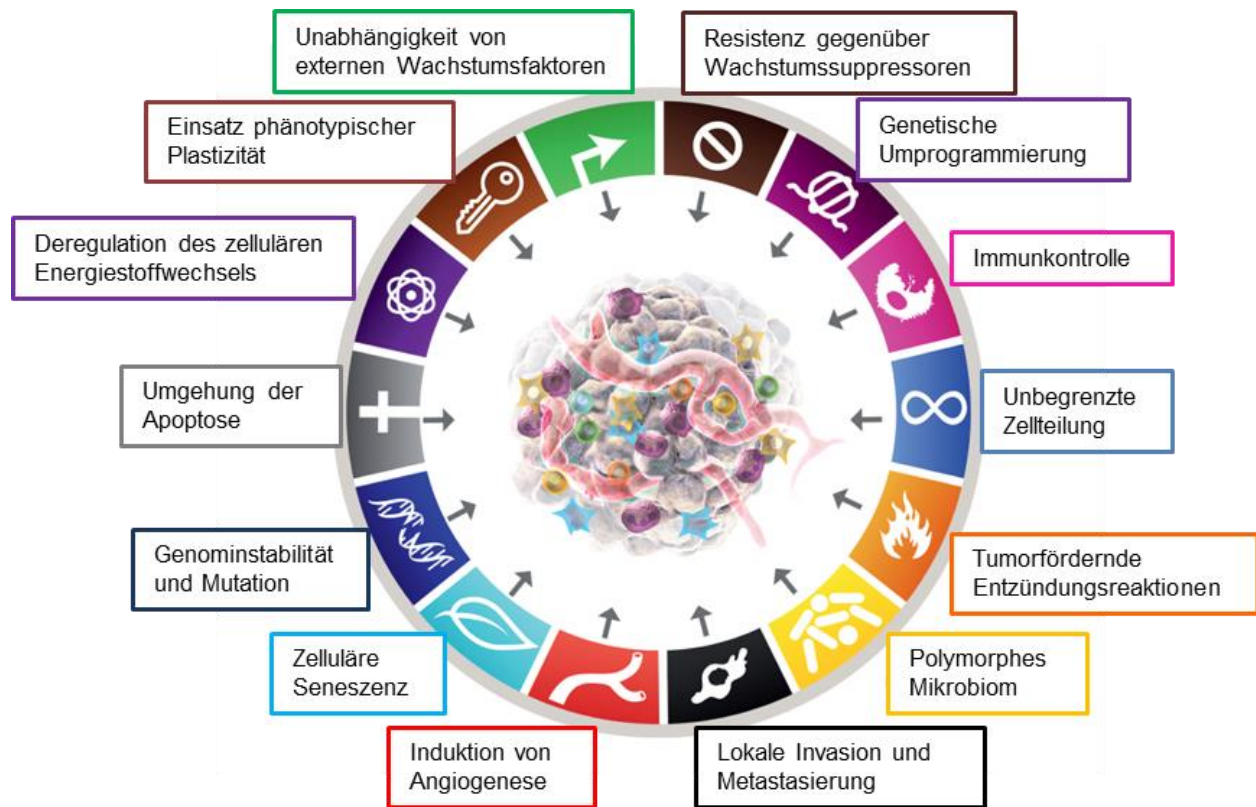


Abbildung 1: Modell zur Tumorgenese

Für die Entstehung von Krebs müssen einige der folgenden Grundbedingungen erfüllt werden: Resistenz gegenüber Wachstumssuppressoren, eine genetische Umprogrammierung, Immunkontrollen, unbegrenzte Zellteilung, tumorfördernde Entzündungsreaktionen, polymorphes Mikrobiom, lokale Invasion und Metastasierung, Induktion von Angiogenese, zelluläre Seneszenz, Genominstabilität und Mutation, Umgehung der Apoptose, Deregulation des zellulären Energiestoffwechsels, Einsatz phänotypischer Plastizität und die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren. Verändert nach [6].

2.2 Proteasen und Krebs

Auf zellulärer Ebene gehören Proteine zu den wichtigsten funktionalen Bestandteilen. Das Fachgebiet der Proteomik, welches sich mit der Erforschung des Proteoms beschäftigt, umfasst neben dem intensiv erforschten Gebiet der Proteinbiosynthese auch den Abbau von Proteinen (Proteolyse). Die für diesen Prozess zuständigen Enzyme werden Proteasen genannt. Die essentielle Rolle von Proteasen, durch Hydrolyse von Peptidbindungen Proteine zu degradieren, gewann innerhalb der letzten Jahrzehnte zunehmend an Bedeutung. Anhand dieser Degradationsprozesse, die in nahezu allen Lebewesen

stattfinden, übernehmen Proteasen eine wichtige Aufgabe in der Regulation von spezifischen biologischen Prozessen [7]. Neben der degradierenden Funktion und somit irreversiblen und spezifischen Spaltung von Proteinen übernehmen Proteasen ebenso eine protektive Funktion, die für den Abbau falsch gefalteter oder falsch lokalisierter Proteine verantwortlich ist. Die Regulation von Proteinen erfolgt dabei über die Aktivierung bzw. Inaktivierung weiterer Enzyme, Hormone, Cytokine oder Wachstumsfaktoren [7, 8]. Folglich sind Proteasen in ihrer Funktion verantwortlich für eine Reihe von zellulären Prozessen, wie beispielsweise Zellzyklus, Proliferation, DNA-Replikation, Zell-Differenzierung und -Migration, Immunantwort, Angiogenese und Apoptose [7].

Die vielseitigen Aufgaben und Funktionen von Proteasen verdeutlichen ihre Wichtigkeit in ihrer Anzahl, sodass das humane Degradom über 600 Proteasen und deren Homologe umfasst (vgl. MEROPS Protein Datenbank). Die MEROPS Protein Datenbank existiert bereits seit 1996 und dient der Auflistung von proteolytischen Enzymen, deren Inhibitoren und Substraten. Für die Klassifizierung der unterschiedlichen Proteasen und Inhibitoren besteht in der Datenbank folgendes System: die Einordnung in Familien unter Betrachtung der DNA-Sequenzen und die Gruppierung in Clans unter Berücksichtigung der tertiären Struktur [9, 10]. Proteasen unterscheidet man abhängig von dem Angriffsort, an dem sie bevorzugt das Substrat schneiden, in Endo- und Exoproteasen. Die Endoproteasen schneiden bevorzugt innerhalb der Polypeptidkette und Exoproteasen hingegen nur die endständigen Peptidbindungen [11]. Zudem lassen sich die unterschiedlichen Proteasen nach ihrem katalytisch aktiven Zentrum in sechs verschiedene Protease-Familien einteilen: Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen [12]. Die Proteolyse eines Substrats wird durch einen nukleophilen Angriff am Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe ausgelöst. Bei Aspartat-, Glutamat- und Metalloproteasen erfolgt dieser Mechanismus durch ein komplexiertes Wasserstoffmolekül im aktiven Zentrum. Im Falle der Cystein-, Serin- und Threoninproteasen reagiert der namensgebende Aminosäurerest (Cystein, Serin und Threonin) als Nukleophil [13]. Die Spaltung des Substrats erfolgt nach der Nomenklatur von Schlechter und Berger zwischen P1 und P1', wobei die Aminosäurereste des Substrats in N-terminaler Richtung als P1, P2, P3 ... Px und in C-terminaler Richtung als P1', P2', P3' ... Px' bezeichnet werden. Die entsprechenden Bindungsstellen am Enzym werden als Sx ... S3, S2, S1, S1', S2', S3' ... Sx' beschrieben [14].

Proteasen zeigen ihre essentielle Bedeutung in vielen komplexen Vorgängen des menschlichen Körpers, sodass die präzise Regulation dieser Enzyme äußerst wichtig ist. Eine Fehlregulation könnte zur Entstehung von verschiedenen Krankheiten führen, zu denen unter anderem auch Krebs zählt [15]. Anhand dieser Funktion stellen Proteasen eine der wichtigsten Zielstrukturen in der Entwicklung neuer Medikamente dar [7, 15]. Zu den wohl bekanntesten Entwicklungen gehören die Inhibitoren der Metalloproteasen, die durch

eine Blockierung des *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) den Blutdruck senken [16]. Ein Beispiel für erfolgreiche Therapieansätze des neu diagnostizierten sowie wiederkehrenden multiplen Myeloms ist Bortezomib, das als Inhibitor des Ubiquitin-Proteasomen-Systems die zelluläre Homöostase stört, wodurch in malignen Zellen die Apoptose induziert wird [17]. Die Hemmung von Proteasomen zeigt zusätzlich den Effekt der Anti-Angiogenese [18].

2.3 Threonin Aspartase 1 (Taspase1)

Als Beispiel für eine Protease mit biomedizinischer Relevanz ist die Threonin Aspartase 1 (auch Taspase1 genannt) zu nennen. Die humane Taspase1 gehört zu den Threoninproteasen. Genauer beschrieben erfolgt aufgrund ihrer Aspariginase-2-Homologiedomäne eine Eingliederung in die Familie der Typ-2-Asparaginasen [19]. In der MEROPS Protein Datenbank ist sie unter der Codierung T02.004 katalogisiert [9]. Das *Taspase1*-Gen ist auf dem Chromosom 20 Bande p12.1 lokalisiert und codiert für ein 420 Aminosäuren langes und 50 kDa großes Taspase1-Proenzym.

Für die Taspase1 namensgebend entstehen durch die autokatalytische Spaltung (*cis*-Aktivität) zwischen Aspartat233 und Threonin234 zwei ungleich große Untereinheiten: die α -Untereinheit (28 kDa) und β -Untereinheit (22 kDa), die sich anschließend zur aktiven Enzymform zusammenlagern [20, 21]. Das Threonin234 der β -Untereinheit fungiert nach der Spaltung als N-terminales Nukleophil im aktiven Zentrum und ist von essentieller Bedeutung für die Protease-Aktivität (Abbildung 2). Eine Mutation von Aspartat233 oder Threonin234 führt zu einer Aktivierungsblockade [19]. Eine Mutation von Threonin234 in Valin (TV-Mutante) führt neben der Inhibition der autokatalytischen Spaltung ebenfalls zur vollständigen Inhibition der Substratspaltung [20, 22, 23]. Die Taspase1 nimmt aufgrund ihrer Funktion als Protease, andere Substrate zu spalten (*trans*-Aktivität), innerhalb der Aspariginase-2-Familie, eine Sonderstellung ein [24]. Taspase1-Zielproteine werden an der konservierten Aminosäuresequenz $Q^3[FILV]^2D^1\downarrow G^1x^2'D^3'D^4'$ gespalten [21, 25, 26]. Ursprünglich wurde eine Aktivität des Enzyms in der Form α_2/β_2 -Heterotetramer postuliert [23]. Aktuelle Forschungsergebnisse konnten allerdings eine Aktivität von Taspase1 bereits in der Form $\alpha\beta$ -Monomer nachweisen [22, 23].

Die kristallographische Analyse von Taspase1 entschlüsselte im Jahr 2005 die Struktur des Proenzym und der aktiven Taspase1 [23]. Somit erschließt sich die Struktur der aktiven Taspase1 mit 14 β -Faltblättern und 7 α -Helices mit einer Lokalisation des aktiven Zentrums um Thr234 am N-Terminus des β 5-Faltblattes (Abbildung 2A). Im Bereich des aktiven Zentrums (zwischen den Aminosäuren Pro183 und Asp233) konnte

eine signifikante Konformationsänderung von Proenzym und der aktiven Taspase1 gezeigt werden, wodurch die Autoaktivierung verdeutlicht wird. Zudem konnte im Bereich des Aktiven Zentrums zwischen den Aminosäuren Thr234, Gly49 und Asn100 die Bindung eines Chlorid-Ions gezeigt werden (Abbildung 2B). Diese Chlorid-Bindung überschneidet sich mit der Position des P1-Restes (Ala233) und beeinflusst die Substratbindung. Diese Beeinflussung konnte anhand einer *in vitro* Aktivitätsmessung nachgewiesen werden, bei der die Taspase1-Aktivität durch Chlorid-Ionen mit einem IC_{50} von etwa 26 mM gehemmt wurde. Die Kristallstruktur von Taspase1 konnte jedoch im Bereich der Aminosäuren 1-40 und 203-229 nicht entschlüsselt werden [23].

Weitere Untersuchungen der bis dahin nicht entschlüsselten Struktur im Bereich des aktiven Zentrums ergaben eine Bestimmung dieser Region als zwei benachbarte α -Helices zwischen den Aminosäuren Ile186 bis Leu203 und Asp210 bis Ser222 (Abbildung 2C), sowie ein definiertes sekundäres Strukturelement der N-terminalen Ser222 [27]. Es wird angenommen, dass sich diese lange Schleife zunächst innerhalb der Volllänge-Taspase1 in einer geschlossenen Konformation über dem katalytischen Rest des Proenzym befindet und anschließend über eine große Konformationsänderung zu einer flexiblen, geöffneten Form innerhalb der aktiven Taspase1 verändert [27]. Dieser Bereich spielt somit eine wichtige Rolle in der Taspase1-Aktivierung und deutet auf eine potentielle Zielregion für einen Taspase1-Inhibitor hin. Ein Inhibitor-Design könnte die Bindung an diese Schleifen-Region sein, sodass die geschlossene Konformation bestehen bleibt und die Aktivierung des Taspase1-Proenzym unterbunden wird [28].

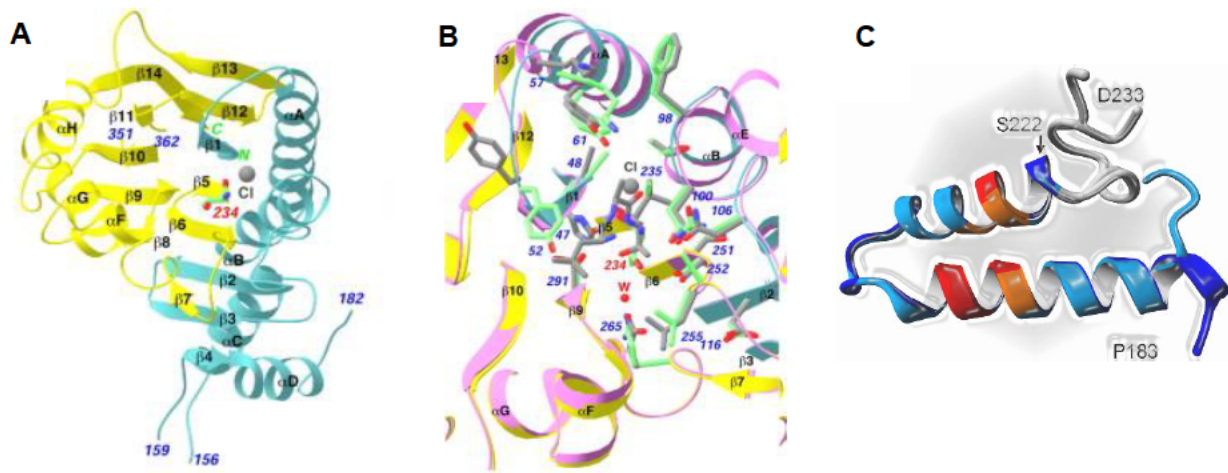


Abbildung 2: Kristallstruktur von Taspase1

A Kristallografische Darstellung der Struktur des Taspase1-Proenzym. Taspase1 α -Untereinheit in Blau, Taspase1 β -Untereinheit in Gelb, Thr234 des katalytischen Zentrums in Grün, Chlorid-Ion in Grau. **B** Darstellung des katalytischen Zentrums mit Überlagerung des aktiven Enzyms (Gelb und Blau) und des Proenzym (Grau und Magenta). Wassermolekül (W) in Rot. [23] **C** Modellierter Darstellung der Taspase1 Schleife im Bereich des aktiven Zentrums. NLS-Aminosäuren in Orange, NLS-Reste in Rot. Verändert nach [27].

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte die dreidimensionale Struktur der aktiven Taspase1 mit einer Auflösung von 3.04 Å dargestellt werden. Das Protein wurde erstmal mit einem strukturell wichtigen Merkmal beschrieben: eine lange C-terminale Region, die als nahezu kontinuierliche Helix von dem Dimer nach außen hin herausragt und eine essentielle Rolle in der enzymatischen Aktivität darstellt [28]. Es wird zudem beschrieben, dass die Präsenz des langen Fragmentes zu Konformationsänderungen führt, besonders in den Bereichen Try52 und der Schleife Gly153-Arg159, die in dem katalytischen Mechanismus involviert sein könnten. Die Modifikationen in der Konformation bilden einen schmalen und tieferen katalytischen Bereich aus und könnten eine stabilisierende und unterstützende Funktion innerhalb der Substratbindung aufweisen. Besonders das von dem katalytischen Zentrum entfernte Tyr52 könnte eine rekrutierende und helfende Funktion innerhalb der Substratbindung besitzen [28]. Weitere Untersuchungen sind demnach notwendig, um weitere Hinweise auf potentielle Zielbereiche für Taspase1-Inhibitoren identifizieren zu können.

Um ihre Aktivität ausführen zu können, muss die Protease Zugang zu ihren physiologischen Substraten erhalten, sodass die enorme Bedeutung einer Regulation der dynamischen Lokalisation für die Protease

verdeutlicht wird [24]. Die Lokalisation von Taspase1 wird als überwiegend nukleär und an den Nukleoli sowie in geringer Menge auch im Zytoplasma beschrieben [29]. Bedingt wird diese Lokalisation durch das evolutionär konservierte nukleäre Lokalisationssignal (NLS), welches in der α -Untereinheit zu finden ist. Durch die Bindung mit Importin- α kann die Taspase1 aktiv in den Zellkern transportiert werden, um nach einer Interaktion mit dem nukleolären Protein Nukleophosmin1 (NPM1) Zugang zu den Nukleoli zu erhalten [29, 30]. Über diese Art der dynamischen Lokalisation kann der Zugang der Protease zu bestimmten zellulären Kompartimenten und ihren (patho)physiologischen Substraten reguliert werden [24]. Die Wichtigkeit von Taspase1 für die Tumorgenese wurde bereits anhand der Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben. Allerdings wird Taspase1 nicht als klassisches Onkogen, sondern als eine sogenannte „*non-oncogene addiction*“ Protease deklariert [31]. Die Protease ist demzufolge in der Lage, in den Zellen eine Reihe von Genen und Signalwegen zu aktivieren, die nicht grundsätzlich tumorfördernd sind, sondern nur indirekt an der Tumorgenese beteiligt sind. Diese sogenannten Protoonkogene steuern das normale Zellwachstum, die Zellteilung und die Entwicklung verschiedener Gewebe. Durch Mutationen des Protoonkogens, können diese in die tumorfördernde Variante des Onkogens übergehen. Eine direkte Beteiligung an der Onkogenese wird im Gegenzug „*oncogene addiction*“ genannt und beschreibt genetische, epigenetische und chromosomale Veränderungen in der Zelle, die entweder über eine Hyperaktivierung von Onkogenen oder eine Inaktivierung von Onkosuppressor-Genen zu einer malignen Transformation und dem Überleben dieser Zellen führen [31, 32]. Taspase1 konnte in ihrer Rolle als „*non-oncogene addiction*“ Protease die Eigenschaft zur Tumorerhaltung in einigen Untersuchungen aufweisen. Ein *knockdown* von Taspase1 in verschiedenen Tumorzelllinien, in denen eine Taspase1-Überexpression nachgewiesen wurde, führte zu einer verminderten Zellproliferation [31]. Dieses Phänomen war bei Zellen mit einem höheren Taspase1-Gehalt deutlicher zu erkennen. Zudem führt die Taspase1-Defizienz zur erhöhten Degradation des antiapoptotischen Proteins MCL-1, sodass die Zelle anfälliger gegenüber Todesstimuli wird [31]. Bei *in vivo* Untersuchungen führte ein *knockout* der Taspase1 bei Mäuseembryonen über die Deregulation homöotischer Gene zu einer phänotypisch transformierten Wirbelsäule und einer Minderung des Größenwachstums [33]. Die weitreichenden Auswirkungen des Taspase1-*knockouts* auf die Embryonalentwicklung und den Zellzyklus trieben die Suche nach weiteren Taspase1-Substraten voran.

2.4 Taspase1 Zielproteine

Im Jahr 2011 wurden anhand der identifizierten konservierten Aminosäuresequenz von Taspase1 (Q3[FILV]2D1↓G1'x2'D3'D4') mittels bioinformatischer Analysen 27 potentielle Taspase1-Zielproteine identifiziert [25, 26]. Diese Zielproteine weisen unterschiedliche zelluläre Lokalisationen und molekulare Funktionen auf. Unter anderem wurden Proteine identifiziert, die an der Bildung großer Protein-Komplexe beteiligt sind, sodass die proteolytische Spaltung durch Taspase1 eine feinregulative Funktion übernimmt, wie es beispielsweise bei den genereller Transkriptionsfaktor 2A (TFIIA) der Fall ist [25, 34]. Unter anderem befinden sich unter den Zielproteinen auch der onkologisch relevante Transkriptionsfaktor USF2 (*upstream stimulatory factor 2*), die Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase 4 (PRS4) und das krankheitsauslösende Myosin IF (MYO1F) [25]. Unter den identifizierten Substraten befinden sich ebenfalls die bereits verifizierten Taspase1-Zielproteine *Mixed Lineage Leukemia* (MLL) und Transkriptionsfaktor 2A (TFIIA), die folglich genauer erläutert werden.

2.4.1 MLL

Taspase1 ist seit 2003 als verantwortliche Protease für die Spaltung des MLL-Proteins identifiziert worden. Taspase1 ist somit an der Entstehung und Prozessierung von MLL-vermittelten Leukämien beteiligt [19].

Taspase1 ist zudem ebenfalls in soliden Tumoren nachweisbar [31]. Eine erhöhte Expression von Taspase1 konnte in Tumorproben verschiedener Entitäten im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen werden. So wird eine Überexpression von Taspase1 nicht nur bei Leukämien, sondern auch bei Kopf-Hals-Tumoren, Brustkrebs, Lungenkrebs oder auch Gehirntumoren beschrieben [22, 29, 31, 33, 35, 36]. Aus diesem Grund ist die Taspase1 als ein wichtiges therapeutisches Ziel in der Krebstherapie nicht wegzudenken [33].

Die Taspase1-bedingte Aktivierung von MLL stellt einen Schlüsselschritt in einigen Krebsarten dar, zu denen unter anderem die Kleinkind-Leukämien zählen [37]. Das humane *MLL*-Gen ist auf Bande 23 des langen Arms von Chromosomen 11 lokalisiert und codiert für ein nukleäres Protein mit 3969 Aminosäuren und einer Größe von 500 kDa, welches entscheidend an der geordneten Regulation der *HOX*-Gen-Expression beteiligt ist und damit eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung übernimmt, homolog des für *Drosophila* charakteristischen Trithorax (Trx)-Proteins [19]. Zudem ist die Taspase1 an der Regulation der Zellzyklus-Gene involviert. Zusammenfassend kann man sagen, dass MLL durch die

maßgebliche Kontrolle einer Vielzahl an Zielgenen eine allgemeine Rolle für die Regulation der Transkription übernimmt [38].

Taspase1 spaltet MLL an zwei Taspase1-Schnittstellen (cs - *cleavage site*) mit definierten Sequenzen: Schnittstelle 1 (CS1) ist durch die Aminosäuresequenz QVD↓GADD codiert und befindet sich an Position 2664, Schnittstelle 2 (CS2) an Position 2716 trägt die Sequenz QLD↓GVDD [19]. Die Taspase1-bedingte Spaltung des MLL-Proteins führt zu der Bildung von einer N-terminalen Untereinheit mit einer Größe von 320 kDa und einer C-terminalen Untereinheit mit einer Größe von 180 kDa. Beide Untereinheiten interagieren über die zwei intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN und FYRC, sodass es zu einer Ausbildung und Stabilisierung des Komplexes kommt [38]. Diese Stabilisierung verhindert den Abbau der Untereinheiten direkt nach der proteolytischen Spaltung [39].

MLL-assoziierte Leukämien machen über 50 % der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) im Kleinkindalter sowie bis zu 10% der akuten myeloischen Leukämie (AML) und ALL bei Kindern und Erwachsenen aus [37]. Die Prognose für Patienten mit einer MLL-assoziierten ALL ist besonders schlecht verglichen mit Patienten, die unter anderen ALL-Formen leiden [38, 40]. Taspase1 scheint durch die Prozessierung von MLL-Translokationsprodukten, im Speziellen des Produkts der t(4;11)(q21;q23) Translokation, maßgeblich zur Entstehung aggressiver Kleinkind-Leukämien beizutragen [41, 42]. Bereits 1979 wurde diese reziproke Translokation der Bande q23 auf Chromosom 11 und der Bande q21 auf Chromosom 4 bei der Leukämie eines Kindes beschrieben [43]. Bis heute konnte keine Verbesserung hinsichtlich einer Steigerung der Überlebensrate mittels bekannter Therapieformen erzielt werden [37]. Zu einem neuen therapeutischen Durchbruch könnte die Inhibition von Taspase1 führen.

2.4.2 TFIIA

Ein weiteres Taspase1-Zielprotein stellt der Transkriptionsfaktor TFII2 dar, der in der RNA-Polymerase-II-abhängigen Transkription involviert ist und einen Teil des Präinitiationskomplexes darstellt. Die Transkription wird durch den Zusammenbau des Präinitiationskomplexes, der aus dem Kernpromotor des Gens, den basalen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II besteht, initiiert. TFIIA spielt dabei eine essentielle Rolle in der Stabilisierung des Komplexes an der DNA durch die Interaktion mit Promotor-Binde-Proteinen [44, 45]. In höheren Eukaryoten besteht TFIIA aus drei Untereinheiten, α , β und γ (~35, 19 und 12 kDa), die durch zwei Gene, *TFIIA $\alpha\beta$* und *TFIIA γ* , codiert werden. Die γ -Untereinheit ist innerhalb verschiedener Spezies evolutionär konserviert, wohingegen sich Spezies-übergreifende Ähnlichkeiten bei

TFIIA $\alpha\beta$ lediglich auf kleinere Sequenzabschnitte in der N-terminalen Region der α -Untereinheit und der C-terminalen Region der β -Untereinheit beschränken [46]. *TFIIA $\alpha\beta$* wird post-translational an der hochkonservierten Schnittsequenz QVDG (zwischen den Aminosäuren 272 und 275) von Taspase1 gespalten. Zudem wurde gezeigt, dass sich *in vivo* beide Formen, die ungespaltene $\alpha\beta$ -Untereinheit, sowie die gespaltenen α - und β -Untereinheiten, in Verbindung mit *TFIIA γ* finden lassen [47, 48]. Beide dieser Komplexe interagieren mit dem TATA-Bindeprotein (TBP) an der DNA und unterstützen damit den Transkriptionsablauf [49, 50]. Außerdem wird angenommen, dass die durch Taspase1 gespaltenen *TFIIA*-Untereinheiten mittels Verbindung mit *TFIID* zu der Transkription einer spezifischen Untergruppe an Genen führen, wie beispielsweise Zellzyklus-spezifischen Genen, sodass die gespaltene und ungespaltene Form von *TFIIA* verschiedene genregulierende Funktionen in der Differenzierung aufweist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Spaltung als Voraussetzung für die proteasomale Degradation von *TFIIA* gilt [49] und somit zur Stabilität von *TFIIA* und der damit zusammenhängenden transkriptionellen Aktivität beiträgt. Durch die Transkription des *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) Genlocus kann die bedeutende Rolle der Taspase1-vermittelten Spaltung von *TFIIA* in Form von Zellzyklus-Kontrolle und der Morphogenese im Mausmodell verdeutlicht werden. Das *CDKN2A*-Gen kodiert die Kontrollproteine des Zellzyklus p16^{INK4a}, p19^{ARF} und p21, die wiederum zur Blockade der Zellzyklusprogression in G1- und der S-Phase führen [51].

2.5 Taspase1-Shuttle Protein Nucleophosmin

Identifizierte und potentielle Taspase1-Zielproteine befinden sich in verschiedenen Zellkompartimenten, sodass ein Shuttlemechanismus für die proteolytische Aktivität der Taspase1 von großer Bedeutung ist. Taspase1 besitzt im C-Terminus der α -Untereinheit ein zweiteiliges nukleäres Lokalisationssignal (NLS) (aa¹⁹⁷KRNKRKLEAERVDTDFMQLKKRR²²⁰, essentielle Aminosäuren sind unterstrichen) [29]. Importine erkennen diese NLS-Sequenzen als hydrophile, basische und Lysin-reiche Protein-Abschnitte an, sodass in diesem Fall das NLS der Taspase1 an das Adapter-Protein Importin- α (Kpn α) gebunden wird [52]. Durch die zusätzliche Komplex-Bildung mit Importin- β (auch Karyopherin β , Kpn β) wird der nukleäre Signalweg vermittelt und der Kernimport findet statt. Im Nukleoplasma führt die Bindung von Ran-GTP an Importin- β zur Ablösung des Komplexes und schließlich zur Entlassung des Cargo-Proteins [53]. Dort kann das Taspase1-Proenzym nach der autoproteolytischen *cis*-Prozessierung in Form der aktiven Protease an das nukleäre Protein NPM1 binden und Zugang zu den Nukleoli erhalten. Untersuchungen der inaktiven Taspase1-Mutante (Taspase_{T234V}) zeigten eine Lokalisation im Zellkern und somit auch die Interaktion mit

Importin- α , sodass die NLS-Funktionalität innerhalb des Taspase1-Proenzym bestätigt werden kann. Zudem konnte anhand einer Import-defizienten Taspase1-NLS-Mutante die Notwendigkeit des nukleären Imports für die beiden katalytischen Aktivitäten (*cis*- und *trans*-Aktivität) nachgewiesen werden [29]. Der nukleoläre Zugang der Taspase1 mittels direkter Interaktion mit NPM1 durch das Vorhandensein von nukleolären Lokalisationssignalen (NuLS) konnte ebenfalls in einer Versuchsreihe bestätigt werden [29]. Sowohl die Lokalisation der zytoplasmatischen Taspase1-Mutante (Tasp_{cyt}) an den Nukleoli durch NPM1-Expression als auch die umgekehrte Lokalisation der wildtypischen Taspase1 im Zytoplasma durch die Expression zytoplasmatischer NPM1-Mutante (NPM_{MutA}) zeigen die starke Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Diese Interaktionspartnerschaft sorgt ebenfalls für den nukleären Export der Taspase1 ins Zytoplasma durch das vorhandene nukleäre Exportsignal (NES) innerhalb der NPM1-Sequenz [25]. Der Kernexport findet entgegengesetzt mit Hilfe des Export-Rezeptors CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) statt (Abbildung 3), der hydrophobe, Leucin-reiche NES-Sequenzen erkennt [54, 55]. Die genaue Interaktionsdomäne zwischen Taspase1 und NPM1 ist bisher noch nicht identifiziert worden und gilt unter anderem als Forschungsziel dieser Dissertationsarbeit.

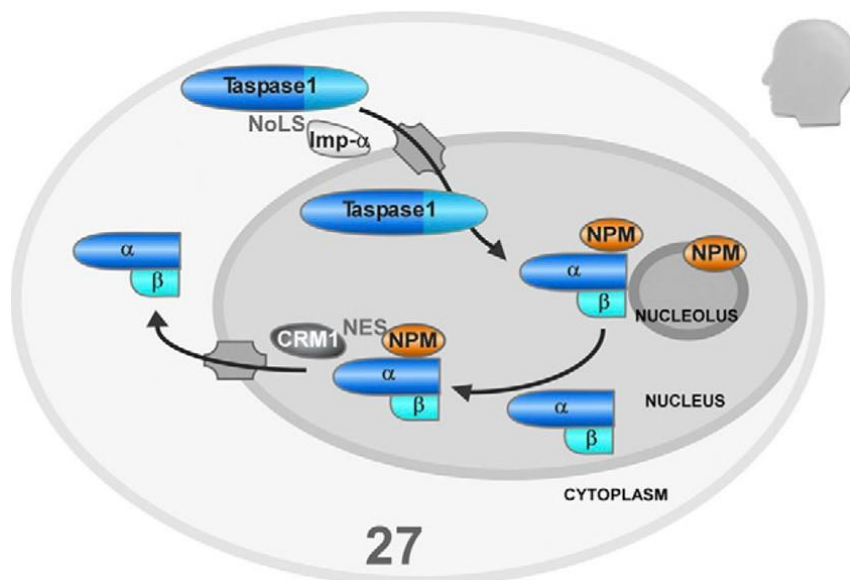


Abbildung 3: Taspase1-Transportmechanismus innerhalb der Zelle

Darstellung des nukleären Taspase1-Imports mittels Interaktion mit den komplexbildenden Adapter-Proteinen Importin- α - β und der anschließenden katalytischen Aktivität der Protease (*cis*- und *trans*-Aktivität). Durch Interaktion mit dem Shuttle-Protein NPM1 wird einerseits Lokalisation an den Nukleoli erreicht und andererseits über die NES-Sequenz des NPM1-Proteins der CRM1-vermittelte Export in das Zytoplasma vermittelt [21].

2.5.1 Die Struktur und Funktion von NPM1

NPM1 ist auch unter den Namen Nucleophosmin, NO38, Numatrin und B23 bekannt und zählt zu dem am besten erforschten Mitglied der NPM-Familie. Die Bedeutung von NPM1 ist nach heutigem Forschungsstand mit der humanen Krebsentwicklung verknüpft [56]. Die Sequenz von NPM1 ist spezieübergreifend zwischen Menschen, Nagetieren, Hühnern und Fischen hoch konserviert. Das humane *NPM1* liegt auf dem Chromosom 5q35 und umfasst 12 Exons. Das wildtypische (wt) Volllängeprotein NPM1.1 besteht aus 294 Aminosäuren und ist 37 kDa schwer. Neben dem Vollängenprotein NPM1.1 existieren noch zwei weitere Isoformen: NPM1.2 und NPM1.3. Die kürzere NPM1.2-Variante umfasst unter der Verwendung eines abgewandelten 3'-terminalen Exons 259 Aminosäuren [57]. Der Isoform NPM1.3 hingegen fehlt ein internes Segment in der C-terminalen Region mit unbekannter funktioneller Bedeutung. Über das Expressions- und Funktionsmuster dieser Isoform ist insgesamt bisher wenig bekannt. Die Protein-Domänen-Struktur von NPM1 weist gleiche, aber auch unterschiedliche Regionen zwischen den Formen auf. Die Organisation der Domänen-Struktur zeigt zudem bemerkenswerte Eigenschaften auf (Abbildung 4A). Zu diesen gehören unter anderem die Methioninreiche Region innerhalb der ersten 15 Aminosäuren, deren Bedeutung nicht vollständig aufgeklärt ist. Es wird angenommen, dass die Methionin-Überreste-Codons anhand der guten Kozak-Sequenz zu einer starken Initiation der Translation führen [58]. Zudem beeinflusst das N-terminale hydrophobe Ende von NPM1 dessen Konformation anhand der dort vorhandenen Region für die Selbstoligomerisierung [58]. Anhand der Röntgenkristallographie konnte die dreidimensionale Struktur dieser N-terminalen NPM1-Kernregion bestimmt werden und als Organisation von acht β -Fässern, die sich zu einem gelartigen Rollenfass zusammenlagern, dargestellt werden. Die NPM1-Monomere verbinden sich zu Donutgeformten Homo-Pentameren. In dieser Konformation befinden sich auf einer Seite des Oligomers ein Cluster negativ geladener Überhänge, da die Ladungsverteilung in dieser Region äußerst asymmetrisch vorliegt. Schließlich interagieren zwei Pentamere über die Kopf-zu-Kopf-Stellung miteinander und formen ein Dekamer (Abbildung 4B). Dabei folgt die Anordnung einem speziellen Prinzip, bei dem ein Monomer des pentamerischen Rings ausschließlich in Kontakt mit einem Monomer eines anderen Pentamers tritt, um eine gewisse strukturelle Plastizität der Pentamer-Pentamer-Schnittstelle darzustellen [59]. Dieses Multimer wird durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen moduliert, insbesondere Phosphorylierungen, die für die Regulation des Monomer-Pentamer-Gleichgewichts durch die Förderung von Pentamer-Zerlegungen in instabile, ungefaltete Monomere, zuständig sind. Dieser strukturelle Polymorphismus ist an der Regulation der Lokalisation und Funktion von NPM1 beteiligt [60]. Zu den Bedingungen eines solchen pentameren Zusammenschlusses gehört die Stabilisierung durch ausgiebige

hydrophobe und hydrogene Bindungsinteraktionen, die eine hohe thermische und chemische Stabilität innerhalb dieser Domäne sicherstellen. Die Eigenschaft ist typisch für molekulare Chaperone [61]. Der entgegengesetzte Effekt wird mittels einer Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Reste durch verschiedene Kinasen erreicht. Eine sequentielle Phosphorylierung solcher Reste sorgt für die Destabilisierung der Oligomerisierung von NPM1 und fördert die Monomerisierung. Diese Monomere sind instabil und folgen dem Pentamer-Zusammenschluss in vollständig ungefalteter Form [60].

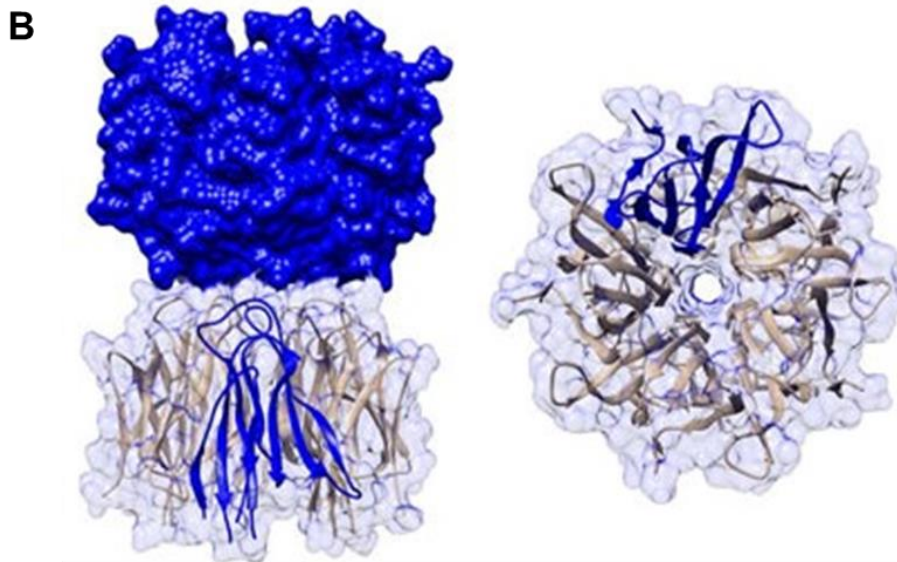
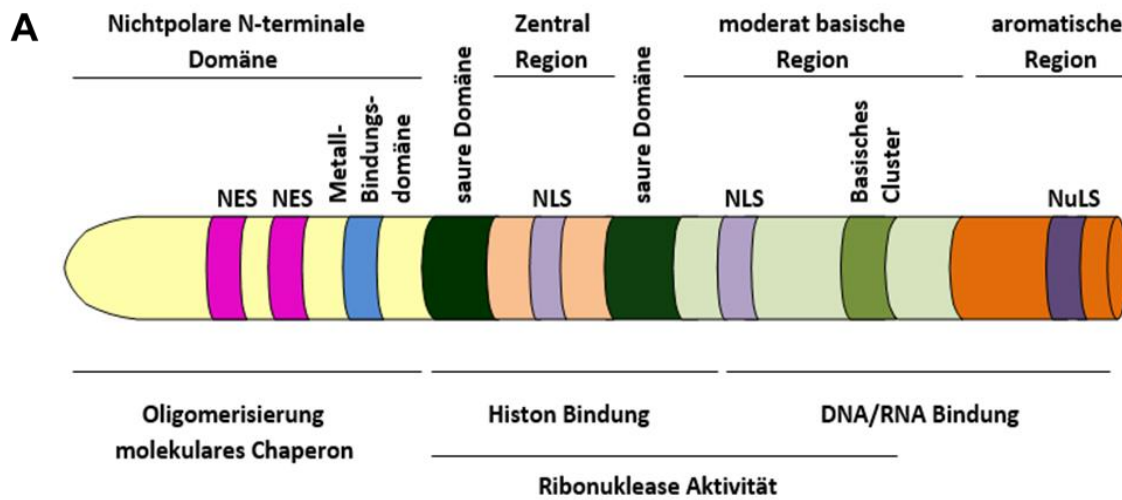


Abbildung 4: NPM1-Domänenstruktur und Darstellung der Oligomerisierung

A Schematische Darstellung der NPM1-Domänenstruktur. NPM1 beinhaltet eine nichtpolare N-terminale Domäne (in Gelb), die für die Oligomerisierung und die Funktion als molekulares Chaperon verantwortlich ist. Diese Domäne beinhaltet zwei NES (in Rosa) und eine Metallbindungsdomäne (in Blau). Die Zentral-Region (in Beige) wird von zwei sauren Domänen (in Dunkelgrün) umschlossen und besitzt ein NLS (in Flieder). Dieser Komplex ist für die Histon-Bindung zuständig. Die moderat basische Region (in Hellgrün) ist zusammen mit der Zentral-Region zuständig für die Ribonuklease-Aktivität und beinhaltet das zweite NLS (in Flieder) und das basische Cluster (in Grün). Zusammen mit der aromatischen Region erfüllt dieser Bereich die Funktion für die DNA/RNA-Bindung. Innerhalb der aromatischen Region befindet sich das NuLS (in Violett) mit den beiden Tryptophanen. **B** Kristallstruktur der N-terminalen Kerndomäne. Fünf NPM1-Monomere schließen sich zu einem Donut-geformten Homo-Pentamer zusammen. Zwei Pentamere interagieren über die Kopf-zu-Kopf-Stellung miteinander und formen ein Dekamer [62], verändert nach [59].

Es wird angenommen, dass mit der Oligomerisierung von NPM1 die nukleoläre Lokalisation, sowie die Rolle in der zellulären Proliferation im Zusammenhang steht. Innerhalb dieser Rolle ist NPM1 ebenfalls an der Zentrosomen-Duplikation und der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt [63, 64]. Das Monomer von NPM1 hingegen wird mit dessen Rolle in der DNA-Schadensantwort und der Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht [65]. Das zelluläre NPM1 existiert somit zu 95% als Oligomer [66]. Am N-terminalen Ende befindet sich außerdem ein hoch konserviertes Motiv, welches für die Bindung an das ARF (*alternate reading frame protein*) zuständig ist [67]. Innerhalb von NPM1 auftretende saure Regionen sind als A1 (aa36-39), A2 (aa120-132) und A3 (161-188) [60, 68] bekannt und könnten eine Rolle in der Ladungsneutralisierung während der DNA/RNA-Nachahmung spielen. Obwohl es nachgewiesen wurde, dass die NPM1-Kernregion inklusive des sauren A1-Bereichs alleine eine schwache Bindung mit den Histonen H1, H3 und H4 eingehen kann, werden die sauren Bereiche A2 und A3 für die Bindung mit den Histonen H2A und H2B benötigt [69]. Die sauren Domänen in Kombination mit der N-terminalen Domäne sind verantwortlich für die Chaperon-Funktion von NPM1, wodurch eine Proteinaggregation im Nukleus verhindert und die Entfaltung von Histonen und Nukleosomen begünstigt werden kann [69, 70]. Eine besondere Rolle spielt NPM1 innerhalb des p14ARF-HDM2-p53-Signalweges, da es mit allen drei Proteinen innerhalb verschiedener Zellkompartimente interagiert [71-73]. NPM1 ist der hauptsächliche zelluläre Interaktionspartner von p14ARF [74] und verantwortlich für die nukleoläre Lokalisation von diesem Protein in ungestressten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass p14ARF-Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren, mit NPM1 zu interagieren, sehr instabil waren und eine geringe anti-proliferative Aktivität aufwiesen [75]. NPM1 ist auch für c-MYC ein essentieller Interaktionspartner, der für die nukleoläre Lokalisation dieses Proteins und die c-MYC-vermittelte rRNA-Transkription verantwortlich ist [76]. Zudem konnte nachgewiesen werden,

dass eine Überexpression von NPM1 zu einer direkten Interaktion mit c-MYC und diese wiederum zur Kontrolle der durch c-MYC induzierten Hyperproliferation und Transformationsaktivität führt [77]. Der C-Terminus von NPM1 ist innerhalb der Formen sehr unterschiedlich und beinhaltet ein Cluster aus basischen Aminosäuren, die für eine positive Ladung in diesem Abschnitt sorgen, gefolgt von einem Abschnitt aromatischer Aminosäuren. Diese Region ist unter anderem in den folgenden Prozessen involviert: Nukleinsäurebindung [78, 79], ATP-Bindung [79], Histon-Transfer [69], Ribonuklease-Aktivität [70] und nukleoläre Lokalisation [80, 81]. Außerdem übernimmt NPM1 eine wichtige Rolle in der Embryogenese [56] und innerhalb der Organisation der Granular-Komponenten der Nukleoli mittels flüssig-flüssig-Phasen-Separation (LLPS, *liquid-liquid phase separation*) [82, 83].

2.5.2 Zelluläre Lokalisation von NPM1

NPM1 ist ein Shuttle-Protein, welches sich zwischen Nukleoli, Nukleoplasma und Zytoplasma bewegen kann und nachgewiesene Bereiche für den nukleären und nukleolären Import, sowie nukleären Export (NLS, NuLS und NES) [64, 70, 84] aufzeigt, sodass der Transport von kleinen Molekülen in den Nukleus mittels NPM1 ermöglicht wird (Abbildung 4A). Neben dem zweiteiligen NLS (aa152-157 und aa191-197) [70], sind zwei Leucin-reiche NES vorhanden (aa42-49 und aa94-102), die für das exportin-1/CRM1-vermittelte zytoplasmatische *shuttling* verantwortlich sind [64, 84]. Zudem gibt es verschiedene Phosphorylierungsstellen, die für die Regulation von Zentrosom- [85] sowie subnukleären Kompartimenten-Assoziation verantwortlich sind [86]. Am C-terminalen Ende befinden sich innerhalb der aromatischen Region zwei Tryptophane an den Positionen 288 und 290, die für die nukleoläre Bindung verantwortlich sind [85, 87], sodass sich der Großteil des Proteins in der granulären Region des Nukleus befindet [88]. Dieser Bereich innerhalb des NPM1-Proteins stellt eine einzigartige Domäne im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Nucleophosmin-Familie dar [87]. Eine Deletion oder Veränderung der beiden Tryptophanreste kann die Faltung der Domäne beeinflussen und die Bindung von Nukleinsäuren und die nukleoläre Lokalisation gefährden [89-91]. Insgesamt überwiegt der Import in den Nukleus den Export von NPM1. Der Shuttlemechanismus von NPM1 ist streng reguliert, da die zelluläre Verteilung von großer Bedeutung für viele Funktionen des Proteins ist. Die Inhibition des Shuttlemechanismus von NPM1 oder dessen Verlust würden zur Blockade der Proteintranslation und zu einem Zellzyklusarrest führen [84].

2.5.3 Inhibition von NPM1

Es gibt eine Reihe von Molekülen, die auf eine Inhibition von NPM1 abzielen und ihr therapeutisches Potential in unterschiedlichem Umfang darbieten. Eine erfolgversprechende Möglichkeit der Inhibition bietet die Unterbindung der Oligomerisierung von NPM1 [60]. Es wurde gezeigt, dass NPM1 durch dessen Interaktionen oligomerisiert, welche mittels N-terminaler Domäne vermittelt werden. Der Verlust der Oligomerisierung führt zu einer Förderung der Entfaltung dieser Domäne, was eine Beeinträchtigung ihrer Funktionen zur Folge hat. Es wurde ein Molekül namens NSC348884 ((di-(((6-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)((5-methyl-3-oxo-3H-indol-2-yl)methyl)))aminoethane) identifiziert, welches spezifisch mit NPM1 interagieren kann, um seine anti-apoptotische Aktivität zu beeinträchtigen [92]. Die ersten Untersuchungen mit NSC348884 erfolgten im Zelllinienmodell mit Prostata-Adenokarzinomen (LNCaP) und kolorektalen Karzinomen (HCT116), welche eine Förderung der Monomerisierung von NPM1 zeigten. Die Zelltoxizität mit IC₅₀-Werten wurde zwischen 1,5 - 4 µmol bestimmt. Die Verbindung von NSC348884 mit einer Doxorubicin-Gabe konnte sogar eine synergistische Wirkung erzielen [92]. NSC348884 soll der anti-apoptotischen Aktivität von überexprimiertem NPM1 entgegenwirken und die Apoptose in LNCaP-Zellen dosisabhängig fördern. Ebenso wie ein NPM1-*knockdown* agiert NSC34884 in einem ansteigenden p53-Level und dessen Phosphorylierung an Ser15 sowie einem Anstieg von p21, welches ein gezielter transkriptioneller Faktor von p53 ist [92]. Außerdem wurde im Zellmodell mit Leberkarzinomen (HepG2) eine NPM1-Monomerisierung und Inhibition des Zellwachstums durch die Behandlung mit NSC348884 erzielt worden sein [93]. Erstaunlicherweise erfolgt die Unterbindung der NPM1-Oligomerisierung effektiver in NPM1c+-exprimierenden Zellen (OCI-AML3) im Vergleich zu Zellen, die nur den NPM1-Wildtyp exprimieren (HL-60 oder OCI-AML2), obwohl NSC348884 gezielt an der N-terminalen Domäne bindet und es sich hier aber um eine C-terminale Mutation handelt. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass der Einsatz von Molekülen, die auf die NPM1-Oligomerisierung abzielen, einerseits effektiv gegen NPM1 überexprimierende Krankheiten eingesetzt und andererseits auch in AML mit NPM1c+-Expression in Kombination mit Chemotherapeutika verwendet werden kann.

Andere bekannte Inhibitoren von NPM1 nutzen weitere Interaktionsstellen, wie beispielsweise die N-terminale Domäne (Inhibitor Rev37-47) die zentrale Region im Bereich von AS 114-187 (RNA-Aptamer 1A1), die Bindung an Ser125 und somit die Inhibition der CKII-Phosphorylierung (CIGB-300), die C-terminale Domäne und die Alkylierung von Cys275 (Avrainvillamide) oder die Bindung an das Volllänge-Protein NPM1 (NucAnt 6L) [94].

2.6 NPM1 und Krebs

Die Rolle von NPM1 innerhalb der Apoptose-Regulation ist, neben den vielen beschriebenen Funktionen, eine der wichtigsten für die Krebsentstehung. In einer Reihe von Zell-basierten Modellen konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass eine Runterregulation von NPM1 die Zellen für die Apoptose sensitiviert und im Umkehrschluss sich ein hohes Niveau des NPM1-Proteinlevels positiv auf den Schutz gegen Apoptose auswirkt [95-97]. Die Konsequenzen eines Ungleichgewichtes der NPM1-Expression werden anhand eines Beispiels der auftretenden Hypoxie bei Krebserkrankten deutlich. Die Unterdrückung der Hypoxie-induzierten NPM1-Expression fördert Apoptose, wohingegen eine Überexpression vor einem Hypoxie-bedingten Zelltod schützt [98]. Damit wird die Annahme unterstützt, dass ein erhöhtes NPM1-Level die maligne Transformation von Zellen durch die Aktivierung von Zell-Überlebensprozessen fördern könnte [99].

Neben Leukämie wurde über die Beteiligung von NPM1 bei mehreren soliden Krebsarten berichtet. Eine Überexpression von NPM1 wird mit hochgradigen Tumoren sowie Metastasierung und einer schlechten Prognose in Verbindung gesetzt, wie beispielweise dargelegt bei Glioblastomen [100], oralen Plattenepithelkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen [101], Dickdarmkrebs [102], nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Ovarialkarzinom und Endometriumkarzinom. Der bereits erwähnte onkogene Interaktionspartner c-MYC sorgt über eine direkte Bindung an den NPM1-Promoter für eine Stimulation der NPM1-Expression [103]. Die Überexpression von NPM1 steht in Korrelation mit einer erhöhten Regulation der Ribosomenbiogenese und der Proteinsynthese [57] sowie der Stimulation von DNA-Reparaturmechanismen, der onkogenen Aktivierung und einer Verminderung der apoptotischen und seneszenten Zellantwort [104, 105]. Alle diese Funktionen sind in verstärkter Form in Tumorzellen vorzufinden. Einige Untersuchungen zeigten ein Modell, bei dem als erstes Ereignis eine onkogene Aktivierung innerhalb einer normalen Zelle auftritt und die Überexpression von NPM1 zur verstärkten DNA-Reparaturantwort beiträgt, die wiederum den DNA-Schaden beibehält und die daraus resultierende genomische Instabilität auf einem für die Zelle aufrechterhaltenden Level hält. Dies würde wiederum den Zellen eine Auswahl an für die Transformation notwendigen kooperativen Mutationen erlauben [104].

NPM1 ist in der Lage, über verschiedene chromosomale Translokationen zu onkogenen Veränderungen und der Entstehung von malignen Zellen zu führen. Beispielsweise führt eine t(2;5)-Translokation mit der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) zu einem Chimären-Protein, bestehend aus der N-terminalen Oligomerisationsdomäne von NPM1, fusioniert mit der ALK-Tyrosin-Kinasen-Domäne. Diese Chimäre wird hauptsächlich durch NPM1 verursachte Aktivierung von ALK mit der Anaplastischen-Großzelligen-

Lymphom-Tumorgenese in Verbindung gebracht [106]. Ein weiteres Beispiel bezieht sich auf die chromosomale Translokation t(3;5)(q25;q35) bei einer kleinen Patientengruppe der akuten myeloischen Leukämie (ALM), bei der eine Chimäre aus den ersten 175 Aminosäuren von NPM1 und der vollständig codierenden Sequenz des MLK1-Proteins (Myelodysplasie/myeloischer Leukämie Faktor 1) gebildet wird [107]. Im Jahr 2005 wurde das *NPM1*-Gen als das am häufigsten mutierte Gen bei der AML identifiziert [108].

Um dem posttranslationalen Modifikationsstatus von NPM1 während einer vorherrschenden Krankheit auf den Grund zu gehen, wurde innerhalb einer Studie das Expressionslevel und der Acetylierungsstatus von NPM1 in Patientenproben mit präkanzerösen (Grad I) und hochmalignen (Grad III) Oralkarzinom im Vergleich zu Proben von Normalgewebe untersucht (Abbildung 5). Es konnte nachgewiesen werden, dass mit fortschreitender Erkrankung auch das Expressionslevel von NPM1 und der Acetylierungsstatus steigen [109]. Ein weiterer Vergleich von Patientenproben mit oralem Plattenepithelkarzinom (Grad II) mit normalem Gewebe zeigte eine höhere nukleäre Lokalisation an den Nukleoli und Nukleoplasma von NPM1 im erkrankten Gewebe. Der Anstieg des Acetylierungsstatus von NPM1 (AcNPM1) war ebenfalls im Nukleoplasma von erkranktem Gewebe nachweisbar. Weitere Untersuchungen dieser Studie zeigten eine signifikante Proportion von Genen, die durch einen NPM1 *knockdown* beeinflusst wurden, sodass man bei diesen Genen von einem direkten Zielgen von NPM1 ausgehen kann. Zudem konnte die Anreicherung von NPM1 an mehreren Gen-Promotoren nachgewiesen werden. Diese Tatsache macht deutlich, dass NPM1 direkt an der transkriptionellen Regulation spezifischer Gene involviert ist. Folglich würde ein erhöhtes Level an acetyliertem NPM1 in Krebszellen zu einer erhöhten Belegung solcher Gen-Promotoren führen [109].

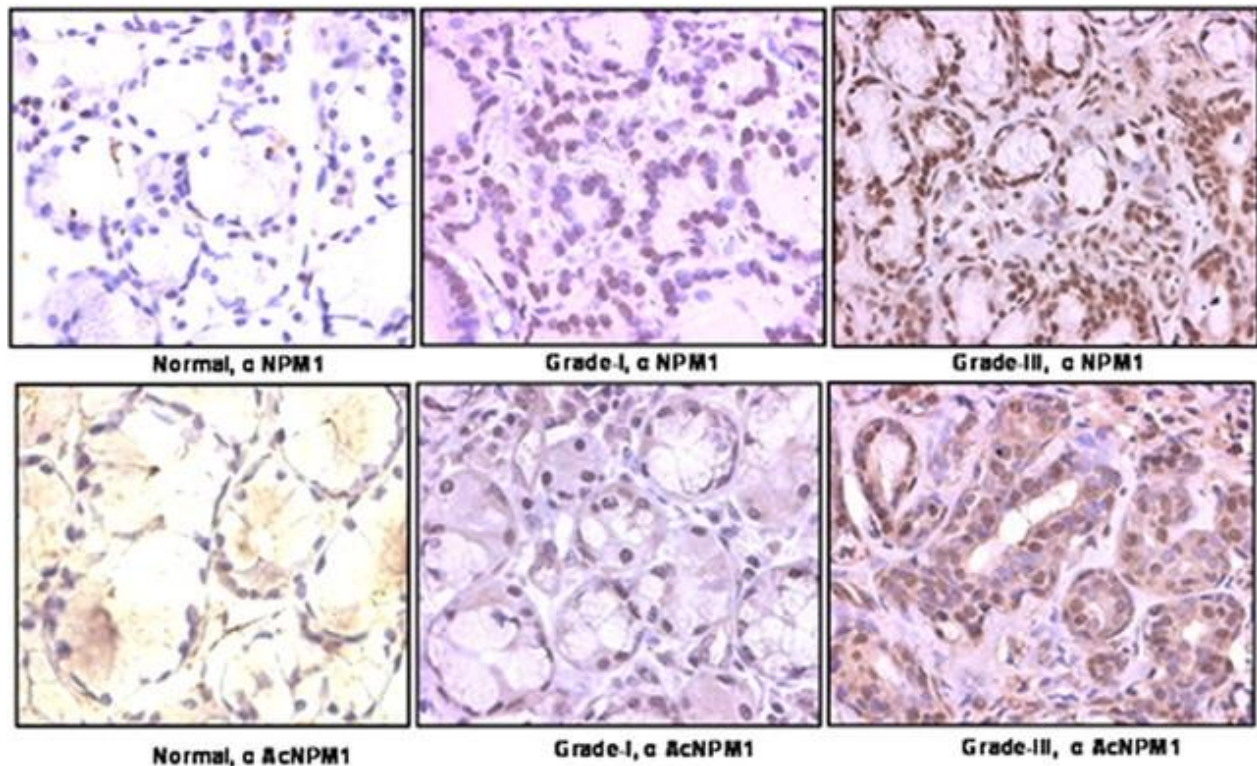


Abbildung 5: Expressionslevel und Acetylierungsstatus von NPM1

Repräsentative Bilder einer IHC-Analyse mit normalem Oralgewebe und Patientengewebeproben eines oralen Tumors (Grad I und III) von anti-NPM1-Antikörper (obere Bilder) und anti-AcNPM1-Antikörper (untere Bilder) bei einer 40-fachen Vergrößerung [109].

2.7 Kopf-Hals-Tumore

Weltweit stellen Kopf-Hals-Tumore (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) die sechsthäufigste Krebserkrankung mit rund 650.000 neuen Fällen pro Jahr dar [110]. Die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich wird von Risikofaktoren wie dem Tabak- und/oder Alkoholkonsum, aber auch durch eine Infektion mit den humanen Papillomviren (HPV) begünstigt [111, 112]. Durch den direkten Kontakt zwischen Gewebe und den Noxen Tabak und Alkohol gilt der Zusammenhang mit der Krankheitsentwicklung mittlerweile als gesichert, ist jedoch stark dosisabhängig. Der virale Erreger des humanen Papillomvirus spielt ebenfalls eine Rolle bei der Tumorgenese. Die Korrelation zwischen HPV und HNSCC ist abhängig von den einzelnen Subklassen der Kopf-Hals-Tumoren unterschiedlich. So konnte in einer Studie von *Huang et al.* HPV in der Tumor-DNA von etwa 70 % einer Patientenkohorte mit Oropharynxkarzinom detektiert

werden. Hingegen konnte eine HPV-Expression in Nasopharynxkarzinomen lediglich in 7,7 % der Fälle ermittelt werden [113, 114].

Bei Kopf-Hals-Tumoren werden je nach Lokalisation fünf Subtypen unterschieden: Speicheldrüsen-, Nasen- und Nasennebenhöhlen-, Larynx- und Hypopharynx, Nasopharynx, Oropharynx und Mundhöhlentumore [115]. Rund die Hälfte aller HNSCC sind auf Mundhöhlenkarzinome zurückzuführen [116] und mehr als 90 % der Mundhöhlen- und Oropharynx Tumoren entstammen aus histologischer Sicht dem Plattenepithel [115]. Die TNM-Klassifikation stellt eine Möglichkeit dar, anhand von Kriterien wie Tumordurchmesser, Lymphknotenbefall und Ausmaß der Fernmetastasierung Tumore klinisch zu beurteilen. Die Beurteilung erlaubt schließlich die Einteilung in fünf Tumorstadien, die in Bezug auf die Prognose des Patienten und die weiterführenden therapeutischen Maßnahmen informativ zur Seite stehen.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation

A Definition der T-Klassifikation für alle Kopf-Hals-Tumore (vereinfachte Darstellung). **B** Definition der N-Klassifikation von regionalen Lymphknoten. **C** Definition der M-Klassifikation von Fernmetastasen. **D** Darstellung der TNM-Stadiengruppierung nach UICC. Die Tabelle wurde erstellt nach [117] und mit Veränderungen nach [118] ergänzt [119].

A	Primärtumor	Definition
	TX	Keine Voraussetzungen zur Beurteilung des Primärtumors vorhanden
	Tis	Karzinom <i>in situ</i>
	T1	Tumordurchmesser ≤ 2 cm
	T2	Tumordurchmesser > 2 cm und ≤ 4 cm
	T3	Tumordurchmesser > 4 cm
	T4	Infiltration in Nachbarstrukturen

C	Fernmetastasen	Definition
	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

B	Regionäre Lymphknoten	Definition
	NX	Keine Voraussetzungen zur Beurteilung der Lymphknotenmetastasierung vorhanden
	N0	Keine Lymphknotenmetastasierung
	N1	Solitär ipsilateral, ≤ 3 cm
	N2a	Solitär ipsilateral, > 3 cm und ≤ 6 cm
	N2b	Multiple ipsilateral, keine > 6 cm
	N2c	Bilateral oder Kontralateral, keine > 6 cm
	N3a	Durchmesser > 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung
	N3b	Durchmesser > 6 cm, mit extranodaler Ausbreitung

D	Stadium (nach UICC)	T	N	M
	I	T1	N0	M0
	II	T2	N0	M0
	III	T1 T2 T3	N1 N0 N1	M0 M0
	IVa	T1 T2 T3 T4a	N2 N0 N1 N2	M0 M0
	IVb	T4b Jedes T	Jedes N N3	M0 M0
	IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Bedauerlicherweise werden lediglich bei einem Drittel aller Patienten die Karzinome in einem sehr frühen Stadium entdeckt (*Union for International Cancer Control stage I-II*, UICC) und die verbleibende Mehrheit von zwei Dritteln bekommt die Diagnose Krebs in einem fortgeschrittenen Stadium (UICC III-IV) gestellt. Im Falle eines fortgeschrittenen HNSCC besteht die Behandlungsoption entweder aus einer Kombination aus chirurgischer Entfernung mit adjuvanter Radiotherapie und möglicher adjuvanter Chemotherapie oder einer primären Strahlentherapie. Die Standard-Chemotherapie umfasst zurzeit meist die Zytostatika Cisplatin oder Carboplatin, die teilweise mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab kombiniert werden. Gerade in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren gelten 5-Fluoruracil, Methotrexat und Taxane als sehr wirksam [120]. Handelt es sich um einen inoperablen Tumor, erfolgt meist eine Kombinationsbehandlung aus Chemo- und Radiotherapie, wobei bei der sog. primären Strahlentherapie die beiden Verfahren entweder in aufeinanderfolgenden Zyklen oder gleichzeitig eingesetzt werden [121]. Allerdings entstehen trotz aggressiver Protokolle der Primärtherapie lokoregionale Invasionen und Lymphknotenmetastasen in über 50 % der HNSCC-Patienten [122]. Bis zu 25 % entwickeln Fernmetastasen, vorzüglich in der Lunge, sodass man bei Patienten mit metastasierendem HNSCC mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 20 % rechnet [123]. Derzeit gibt es keine Behandlungsmöglichkeiten, um der Tumorinvasion und Metastasierung von HNSCC vorzubeugen [124]. Zudem führt die späte Diagnose im fortgeschrittenen Tumorstadium zu einer schlechten Prognose, sodass eine Metastasenerkennung innerhalb der frühen Tumorstadien einerseits zu einer verbesserten Tumorprognose und andererseits zu der Bestimmung einer personalisierten Therapie führen würde [125]. Es wird vermutet, dass das Vorhandensein von Mikrometastasen zum Anstieg der Morbiditäts- und Mortalitätsrate führt [126, 127]. Es wird sogar beschrieben, dass für die Mehrheit der krebsbezogenen Todesursachen Metastasen verantwortlich sind, die etwa 90 % der gesamten Krebsmortalität ausmachen [128-130].

2.8 Gewebeanvasion und Metastasierung

Solide Tumore sind in der Lage, Zellen bis zu einem Durchmesser von 1 mm durch Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff selbst zu versorgen. Für das weitere Wachstum induziert der Tumor die Bildung von neuen Blutgefäßen [131]. Anhand dieser Tumorangiogenese erhält der Tumor Zugang zum hämatopoetischen und lymphatischen System und sorgt damit für den Beginn der Metastasierung. Die Metastasierung (sog. *invasion-metastasis cascade*, IMC) ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich maligne Tumorzellen eines Ursprungstumors (Primärtumor) über die Blut- und Lymphbahn in gesunden Organen und Geweben

verbreiten. Man unterscheidet je nach Größe zwischen Mikrometastasen (< 2 mm) und Makrometastasen (> 2 mm) [132]. Bei HNSCC-Patienten kommt es erst in einem späten Stadium zur Ausbildung von Makrometastasen, sodass ein frühzeitiger Nachweis von Mikrometastasen von äußerster Dringlichkeit ist. Jedoch sind Mikrometastasen mit den aktuellen Detektionsmethoden kaum erkennbar [132].

Der Prozess der Metastasierung von epithelial malignen Tumoren wurde bereits im Jahr 2004 von *Pantel et al.* [133] beschrieben. In einem frühen Stadium des Tumorwachstums lösen sich bereits erste Tumorzellen von dem Primärtumor ab und disseminieren entweder direkt in die Blutbahn oder gelangen über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten, um dort zu soliden Tumoren zu proliferieren. Diese zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) sind in der Lage, über das hämatopoetische System zu entfernten Organen zu gelangen oder sich zunächst in eine Art Ruhezustand (Dormanz) zu versetzen. Folglich gelangen die neu gebildeten Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen erneut über das hämatopoetische System zu entfernten Organen, um dort weitere solide Metastasen auszubilden. Es wird vermutet, dass die Ausbildung von Metastasen in entfernten Organen erst nach der Lymphknotenmetastasierung erfolgen kann. Disseminieren die Tumorzellen direkt in die Blutbahn, können sie auf eine direkte Weise in entfernten Organen Fernmetastasen ausbilden, ohne den Umweg über die Lymphknotenmetastasierung [133]. Dieser Transport von Tumorzellen innerhalb der Blutbahn stellt einen essentiellen Schritt im Metastasierungsprozess dar, obwohl die detaillierten molekularen Mechanismen der Tumormetastasierung bisher nicht vollständig erforscht sind [134, 135].

2.9 Neuartige Biomarker als Therapieansatz

Die Untersuchung von Patientenblutproben rückt immer weiter in den Fokus des prognostischen und diagnostischen Interesses. Im Hinblick auf die Etablierung neuartiger Biomarker werden besonders CTCs und von Krebszellen abgeleitete extrazelluläre Vesikel intensiv erforscht. Diese extrazellulären Vesikel gelten als eine wichtige Komponente der Tumor-Mikroumgebung [136] und dienen der Kommunikation zwischen Tumor und anderen Zellen in der Tumor-Mikroumgebung und Peripherie [137]. Kleine extrazelluläre Vesikel mit einem Durchmesser von 30 – 150 nm werden Exosomen genannt und haben ihren Ursprung aus endozytotischen Kompartiment der parentalen Zellen. Exosomen transportieren endozytotische Marker, denen ein besonderes Interesse im Hinblick auf ihre Eignung als potentielle Biomarker für den Krankheitsverlauf und Behandlungserfolg zugesprochen wird [137]. Untersuchungen von isolierten Exosomen aus Plasma-Proben von Kopf-Hals-Tumorpatienten enthüllten ein Protein-Cargo

mit Informationen über den Tumorgrad, das immunsuppressive Tumorprofil und den Krankheitsverlauf [138]. In weiteren Studien wurden innerhalb von HPV-positiven Tumoren virale Proteine und Gene zusätzlich zu den Tumor-assoziierten Antigenen in den isolierten Exosomen entdeckt [139, 140]. Durch solche Unterschiede im Protein-Cargo der Exosomen von HPV-positiven und -negativen Kopf-Hals-Tumorpatientenproben kann die Erforschung von potentiellen Biomarkern für neuartige Therapieansätze vorangetrieben werden [141].

2.10 Zirkulierende Tumorzellen

CTCs können ebenfalls als ein minimal-invasives Früherkennungssystem zur Detektion eines Kopf-Hals-Tumors angewendet werden und frühzeitige prognostische Hinweise auf eine Therapiemaßnahme bringen. Bisher konnte diese Art der Diagnostik nicht in den routinemäßigen klinischen Alltag integriert werden, da auch modernste bildgebende Verfahren CTCs nicht nachweisen können. Die Detektion von CTCs erfordert ein hochoempfindliches Nachweisverfahren mit anschließender molekularer Charakterisierung, um das Invasionsvermögen mechanistisch zu verstehen und letztendlich angreifen zu können.

Derzeit steht die Entwicklung von zuverlässigen CTC-Detektionsmethoden aus Patientenblutproben im Fokus der Forschung. Hierbei gibt es eine Reihe von limitierenden Faktoren, die mit den besonderen Eigenschaften von CTCs einhergehen. Zum einen ist die Anzahl von CTCs in einer Blutprobe von Tumorpatienten im frühen Stadium sehr gering, sodass man in einem Volumen von 1 ml Blut durchschnittlich mit einer CTC unter rund 5 Milliarden Erythrozyten und 10 Millionen Leukozyten rechnen kann [142, 143]. Zudem erschwert die Heterogenität der CTC-Population im Hinblick auf die biologischen und molekularen Veränderungen während der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) die Wahl der Antikörper für die Selektion von CTCs [144]. Der EMT-Prozess ist dafür zuständig, die Zell-Zell-Adhäsion durch die Runterregulation von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen (beispielsweise E-Cadherin) oder von epithelialen Antigenen (beispielsweise epitheliales Zelladhäsionsmolekül; EpCAM) zu schwächen. Mittels spezifischer Signalmoleküle (Wnt/ β -Catenin, FGF oder TGF β 1/BMP) initiiert der EMT-Prozess die Migration für den Transfer von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften [145]. Diese Entwicklung führt zunächst zu der Ablösung einzelner CTCs vom Primärtumor über die Infiltration der Blutzirkulation bis hin zum Erreichen entfernter Gewebe und Organe der späteren Metastasenausbildung.

Die Entwicklung von Metastasen am Ort des neuen Mikrohabitats wird durch die Interaktion von CTCs mit der lokalen Mikroumgebung reguliert, wodurch eine Vielzahl an Signalwegen aktiviert wird (unter anderem Hh, Wnt und Notch). Diese wiederum sorgen für die notwendigen Schritte zur Proliferation und

Ausbildung der Metastasen [146]. Die erneute Ansiedlung von Zellen an dem Zielorgan erfordert die Umsetzung eines weiteren besonders wichtigen Prozesses in diesem Zusammenhang, die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) [147]. Dieser umgekehrte Prozess von EMT ist erforderlich, um die Initiierung eines stammzellenähnlichen Phänotyps mit wichtigen Charakteristika, wie einer hohen Invasivität, Fähigkeit zur Selbsterneuerung und einer gewissen Apoptose- sowie Therapieresistenz, zu erzielen [148]. Einige dieser während der Metastasierung erworbenen Charakteristika werden als Biomarker in der Isolation und Detektion von CTCs genutzt.

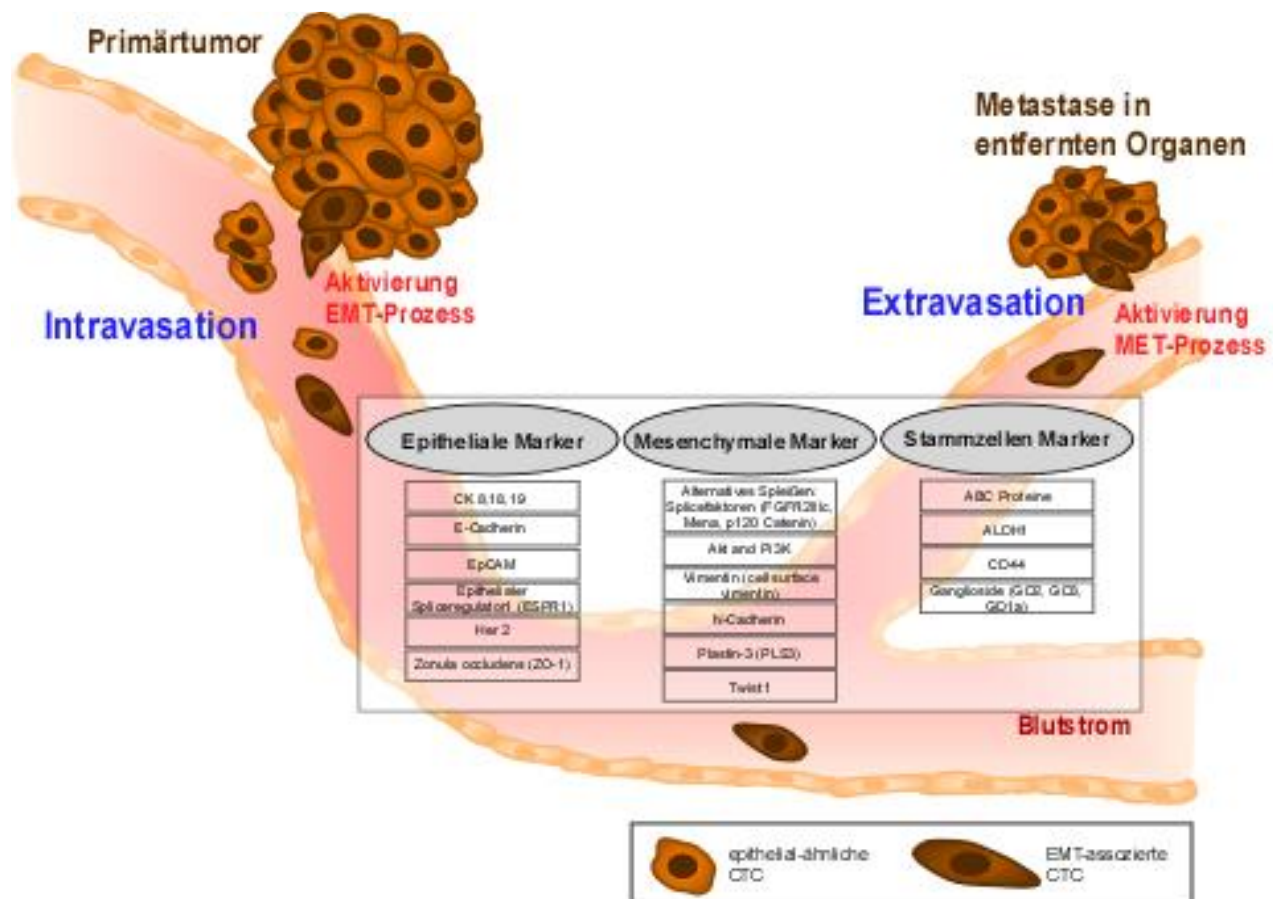


Abbildung 6: Darstellung der Ausbreitung von Tumorzellen während der Metastasierung mit Nennung der wichtigsten Marker

Zellen aus Primärtumoren durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt und die lokale Invasion in die Blutgefäße fördert (Intravasation). Die erzeugten CTCs können nach dem umgekehrten Prozess, der mesenchymal-epithelialen Transition (MET), der durch die Interaktion mit der lokalen Mikroumgebung ausgelöst wird, aus den Blutgefäßen in entfernte Organe entweichen, in denen später Metastasen gebildet werden (Extravasation). Ebenfalls aufgezeigt werden die entscheidenden epithelialen, mesenchymalen und Stammzellen-Marker für die Isolation von CTCs aus dem Bereich der Kopf-Hals-Tumore.

Für detaillierte Ausführungen sind entsprechende Veröffentlichungen an die Arbeit angehängt. Eine Übersicht der bis heute gewonnenen Erkenntnisse der Mikrofluidik und der nanotechnologischen Systeme für die CTC-Isolierung liefern zudem zwei im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Review-Artikel. [149, 150]

Publikation Review 1 ab Seite 163:

Gribko A, Künzel J, Wünsch D, Lu Q, Nagel SM, Knauer SK, Stauber RH, Ding GB. **Is small smarter? Nanomaterial-based detection and elimination of circulating tumor cells: current knowledge and perspectives.** Int J Nanomedicine. 2019 Jun 6;14:4187-4209. doi: 10.2147/IJN.S198319. PMID: 31289440; PMCID: PMC6560927.

Zusammenfassung: Die Publikation untersucht die Rolle von CTCs bei der Metastasierung von Krebs und deren Potenzial als prädiktive Biomarker. Aufgrund ihrer Seltenheit und heterogenen Biologie sind CTCs schwer zu isolieren und zu detektieren. Der Artikel beschreibt verschiedene nanotechnologische Ansätze zur Isolation und Anreicherung von CTCs sowie zur gezielten Krebstherapie. Es werden Fortschritte in der Mikrofluidik und Lab-on-a-Chip-Technologien diskutiert, die die Effizienz und Sensitivität der CTC-Erkennung verbessern. Zudem werden verschiedene Nanomaterialien wie magnetische Nanopartikel, Goldnanopartikel, Quantenpunkte und Graphen untersucht, die zur Erkennung und Behandlung von CTCs eingesetzt werden können. Der Artikel schließt mit der Vorstellung von Entwicklungen in CTC-gerichteten Nanosystemen und anderen fortschrittlichen Technologien, die sich derzeit in der (prä-)klinischen Forschung befinden.

Publikation Review 2 ab Seite 187:

Siemer S, Wünsch D, Khamis A, Lu Q, Scherberich A, Filippi M, Krafft MP, Hagemann J, Weiss C, Ding GB, Stauber RH, **Gribko A. Nano Meets Micro-Translational Nanotechnology in Medicine: Nano-Based Applications for Early Tumor Detection and Therapy.** Nanomaterials (Basel). 2020 Feb 22;10(2):383. doi: 10.3390/nano10020383. PMID: 32098406; PMCID: PMC7075286.

Zusammenfassung: Die Publikation beschreibt die Rolle von Nanomaterialien in der Krebsdiagnose und -therapie, insbesondere bei der Isolierung, Analyse und gezielten Behandlung von CTCs. Flüssigbiopsien bieten eine gut verträgliche Alternative zu herkömmlichen Biopsien, wobei die Erfassung dieser seltenen

und heterogenen Zellen eine hohe Sensitivität und Spezifität erfordert. Physikalische Methoden wie Membranfiltration und mikrochipbasierte Plattformen werden häufig mit biologischen Verfahren kombiniert. Magnetische Trennungen mit superparamagnetischen Nanopartikeln gelten dabei als Goldstandard, während nanostrukturierte Substrate und Nanomaterialien wie Graphen und Kohlenstoffnanoröhren die CTC-Erfassung weiter verbessern.

Neben der Diagnostik liegt ein Schwerpunkt auf nanoskaligen Systemen zur gezielten Abgabe von Therapeutika, um Tumormetastasen zu verhindern. Mesoporöse Silica-Nanopartikel, polymerische Mizellen und Dendrimere ermöglichen die gezielte Zerstörung von CTCs, wobei Mizellen mit Doxorubicin in Mausmodellen das Tumorwachstum erfolgreich hemmten. Ultraschallgesteuerte Mikrobläschen fördern die gezielte Chemotherapie und schädigen die Tumervaskularität. Die Kombination von MBs mit anderen Nanomaterialien eröffnet zusätzliche therapeutische Möglichkeiten. Trotz der Fortschritte fehlen bislang FDA-zugelassene Produkte, doch die Integration von Nanomaterialien mit Mikrofluidik könnte die Diagnostik und Therapie deutlich voranbringen.

2.11 Zielsetzung der Arbeit

In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Taspase1-NPM1-Interaktion an der Regulation der Taspase1-Aktivität beteiligt ist. In dieser Arbeit soll unter anderem die pathologische Bedeutung der Taspase1-NPM1-Interaktion zur molekularen Hemmung von Taspase1 aufgeklärt werden. Untersucht werden soll, ob und inwieweit die Taspase1-NPM1-Interaktion gehemmt und somit die onkogene Aktivität der Protease inhibiert werden kann. Zunächst sollen die Taspase1-NPM1-Proteinbindedomänen kartiert werden. In diesem Zusammenhang werden NPM1-Punkt- und Deletionsmutanten sowie Taspase1-Mutanten generiert. Die NPM1-Deletionsmutanten werden so generiert, dass jeweils eine der vier funktionellen Hauptdomänen fehlt. Nach den resultierenden Mutanten mit einer Deletion der entsprechenden Bindungsdomäne werden zusätzlich unterschiedliche Kombinationen der aktiven Lokalisationssignale (Kernexport- und -importsignal, sowie nukleoläres Lokalisationssignal NuLS) erzeugt. Diese sind entscheidend an der Regulation der tumorfördernden NPM1-Funktion beteiligt. Es wird angenommen, dass Taspase1 das nukleäre Exportsignal von NPM1 nutzt, um Zugang zum Zytoplasma zu erlangen und dort Substrate zu spalten. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen, soll die Interaktion mittels eines zellulären *in vivo*-Interaktionssystems analysiert werden.

Zusätzlich soll die Auswirkung der Inhibition der Taspase1-NPM1-Interaktion auf die tumorfördernde Taspase1-Aktivität untersucht werden. Eine Störung der Taspase1-NPM1-Interaktion in lebenden Krebszellen soll anhand des Einschlusses der Expression von Taspase-NPM1-Interaktionsdefizienten Proteinen auf die Aktivität *in trans* bewertet werden. Unter der Verwendung des Fluoreszenzmikroskopie-basierten Biosensorsystems, der Immunblot-Analyse und der Verwendung von Tumorzelllinien soll die erstmalige Identifikation von Mutanten möglich sein, die in der Lage sind, die proteolytische Aktivität von Taspase1 *in trans* zu inhibieren und somit die Vitalität und Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung zu beeinträchtigen.

Damit geht die Analyse der Effekte auf Proliferation, Zellzyklus und Apoptose, sowie ergänzend durch Untersuchungen einer möglichen veränderten Taspase1-Aktivität bezüglich bereits verifizierter Zielproteine wie den Transkriptionsfaktoren *TF2A* oder *USF2* einher.

Des Weiteren soll eine Möglichkeit gefunden werden, um die Tumorbilogie und spezifische Eigenschaften des Tumors eines Patienten für einen personalisierten Therapieansatz zu nutzen. Für diese Analyse eignen sich am besten vom Primärtumor abgelöste zirkulierende Tumorzellen, die sich in der Blutbahn des Patienten befinden. Für dieses Vorgehen muss eine auf Kopf-Hals-Tumore angepasste Methode zur Detektion, Isolation und Analyse bestimmt und etabliert werden. Die Kultivierung von aus einer Blutprobe

isolierten zirkulierenden Tumorzellen hat das Potential einer Pionierarbeit und soll den Ansatz der zukunftsweisenden *liquid biopsy* unterstützen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen: BD Bioscience Europe (Heidelberg), Fisher-Scientific (Schwerte), Gibco/Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen).

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Acrylamid (Rotiphorese 30)	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Agarose	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
AlamarBlue	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH	Darmstadt
Ampicillin	AppliChem GmbH	Darmstadt
Biotherm Taq-DNA-Polymerase	Genecraft GmbH	Lüdinghausen
Bovines Serumalbumin	AppliChem GmbH	Darmstadt
Bradford-Lösung	Bio-Rad	Dreieich
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
BSA 100x	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Casy Blue	OMNI Life Science	Hamburg
Casy Ton	OMNI Life Science	Hamburg
CellTrace CFSE	ThermoFisher Scientific	Tuttlingen
Cisplatin	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz	Mainz
Complete Protease Inhibitor	Roche	Penzberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	Karlsruhe
dNTP Mix, 10 mM	Roche	Penzberg

Material und Methoden

ECL, ECL-Plus	Amersham Bioscience	Buckinghamshire
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Ethylendiamintetracetat (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Fetales Kälberserum	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Glutamin	Gibco, Invitrogen	Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH	Darmstadt
Größenstandard, 100bp	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Größenstandard, 1kb	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Größenstandard, Protein	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
HCS CellMask Stain	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Hoechst 33342	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Hydroxyurea	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Isopropanol	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
JetPRIME	Polyplus Transfection	Frankreich
KCl	Carl Roth	Karlsruhe
Leptomycin B	Axxora Dtl. GmbH	Lörrach
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Leptomycin B	Enzo Life Sciences GmbH	Lörrach
Magermilchpulver	AppliChem GmbH	Darmstadt
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
NEAA	Gibco, Invitrogen	Karlsruhe
NSC348884	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Paraformaldehyd	Serva Elektrophoresis GmbH	Heidelberg
PBS, steril	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Phorbol-12-myristate-13-acetat; (PMA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
ReBlotplus strong 10x Stripping	Chemicon International	Hofheim
Rotiblock	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
Staurosporin	Cayman Chemical Company	
Takara	Cambrex Bioscience	Lonza
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Elektrophoresis GmbH	Heidelberg
TGX Stain-free fast Cast Acrylamide Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Tris	Neolab	Heidelberg
Triton-X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Trypan-Blau	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Trypsin LE Express	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Tween20	AppliChem GmbH	Darmstadt

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

PBS	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4
EDTA	0,5 M; pH 8,0

Weitere verwendete Puffer und Lösungen können den Beschreibungen in den jeweiligen Abschnitten entnommen werden.

3.1.3 Geräte

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Agarose Gel System		peqLab, VWR	Darmstadt
Array Scan	VTI	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
Autoklav	5050 ELV	Tuttnauer	Breda
Bakterienbrutschrank	Gasboy C40	Labotec	Midrand
ChemiDoc	MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Einfrierhilfe	CoolCell	Biocision	USA
Einwegfilter zur Zellseparation	Filcons 50µm	BD Bioscience	USA
Eismaschine	AF 80	Scotsman	Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer DNA	PerfectBlue Gelsystem Mini S	peqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Elektrophoresekammer Protein	Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Eppendorf-Rotator	Rotator SB“	Stuart Scientific	Asbach
Falkonzentrifuge	Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Scientific	Tuttlingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Liebherr	Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	TSX	Thermo Scientific	Dreieich
Gelgießstand	Gel-Gießschiene	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Heizblock	Thermo Mixer F 1.5	Eppendorf GmbH	Hamburg
Luminometer	Luminiskan Ascent	Thermo Labsystems	Darmstadt
Kühlschrank		Liebherr	Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge	Biofuge firesco	Heraeus Holding GmbH	Hanau
MACS Separation Columns	25 LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Magnetständer (Eppendorf)	SureBeads Magnetic Rack	Bio-Rad Laboratories GmbH	München

Magnetständer (Falcons)	DynaMag-15	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	Dreieich
Magnetständer (Säulen)	Quadro MACS	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
Mikroskope (Fluoreszenz)	Nikon Eclipse TE2000-U AxioVert 200M	Nikon GmbH Zeiss	Düsseldorf Oberkochen
Mikroskop	Nikon TMS	Nikon GmbH	Düsseldorf
Mikroskopie-Slide	15µ-Slide 8well ibiTreat	Ibidi	München
Mikrowelle	M730	Philips	Hamburg
Multiplatten Lesegerät	Tecan Spark	Tecan	Crailsheim
PCR-Thermocycler	ThermalUno	VWR	Darmstadt
PCR-Thermocycler	T Personal	Biometra biomedizinische Analytik GmbH	Göttingen
pH-Meter	EasyFive	Mettler Toledo	Gießen
Photometer	Ultraspec 3100pro	Amersam Bioscience	Backinghamshire
Rollmixer	RollerMixer SRT6	Stuart Scientific	Asbach
Schüttelinkubator	Certomat H	B.Braun Biotech Int. GmbH	Melsungen
Schüttler	WS 10 Rocker 2d digital 3D Rocking Shaker	Edmung Bühler GmbH IKA StarLab	Hechingen Staufen Hamburg
SDS Gel System	Mini Protean Cell	Bio-Rad Laboratories	München
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Stickstoff-Tank	GT 38	Omnilab AG	Mettmenstetten
Stromgeber	PowerPac	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Tischzentrifuge	Mikro 120 Heraeus PICO 17 Centrifuge	Andreas Hettich GmbH + Co KG Thermo Electron Corporation	Tuttlingen Dreieich
Tischzentrifuge Mini	C13000-RT	Fisherbrand	Schwerte

Turbo-Blotter	Trans-Blot Turbo Transfer System	Trans-Blot Turbo Transfer System	München
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus mini20	Bandelin	Berlin
UV-Tisch	TFX-35I	Biometra biomedizinische Analytik GmbH	Göttingen
Vortexer	VWR VV3 REAX 2000	VWR Int. GmbH Heidolph	Darmstadt Schwabach
Waage	ABT 120-SDM	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Wasserbad	Polystat CC3	P. Huber Kältemaschinenbau GmbH	Offenburg
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Karl Hecht "Assistent" GmbH	Altnau TG
Zellkulturbrutschrank	Hera Cell	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Zellzähler	CASY TTC	OMNI Life Science	Hamburg
Zellzentrifuge	Cytospin Universal 16R	Hettich	Tuttlingen

3.1.4 Verwendete Antikörper

Verwendete Antikörper für den Proteinnachweis mittels Western Blotting und die Immunfluoreszenzfärbung werden in den folgenden Tabellen 5 und 6 angegeben.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Organismus	Hersteller	Eigenschaft	Verwendung Western Blot	Verwendung Immun- fluoreszenz
Actin	Kaninchen	Sigma	polyklonal	1:5000	-
AFP (C3)	Maus	Santa Cruz		1:500	-
CD326 (EpCAM) Biotin	Maus	eBioscience	monoklonal	-	-

Material und Methoden

CD326 (EpCAM) purified	Maus	eBioscience	Klon 1B7	1:1000	-
CD326 (EpCAM)- PE (1B7)	Maus	Santa Cruz	monoklonal	-	1:20
CD45 (217)	Maus	BD Bioscience	monoklonal	-	-
CD45 (HI30)-FITC		Life Technology/ eBioscience	monoklonal	-	1:100
CD63 (SPM524) Biotin	Maus	Novusbio	monoklonal	-	-
CD63 (SPM524) purified (194)	Maus	Novusbio	monoklonal	1:1000	-
CD63 (MEM-259), Alexa Fluor 488 (190)	Maus	Thermo Fisher Scientific	monoklonal	-	4 µl x 100 µl Blutprobe oder 10 ⁶ Zellen
CD63-Exosom	Maus	Invitrogen	monoklonal	-	-
Cytokeratin Pan- (C11)	Maus	Santa Cruz	monoklonal	1:500	-
Cytokeratin Pan- (H-240) (163)	Kaninchen	Santa Cruz	polyklonal	1:1000	-
Cytokeratin-Pan- (C-11) PE	Maus	Santa Cruz	monoklonal	-	1:200
Cytokeratin 8,18,19 (2A4)	Maus	Abcam	monoklonal	1:100–1:200	-
Cell Surface Vimentin (CSV)	Maus	Abnova	monoklonal	-	1:100
Fibrillarin	Maus	Abcam	monoklonal	1:1000	1:500
GAPDH	Maus	Santa Cruz	monoklonal	1:3000	-
GFP (FL)	Kaninchen	Santa Cruz	polyklonal	1:5000	1:500
HA.11	Maus	Covance	monoklonal	1:1000	-
H3K9me3	Kaninchen	Active motif	polyklonal	-	1:500

IgG1 Isotope Control Biotin	Maus	eBioscience		-	-
NPM1 (B51)	Maus	Cell Signaling	polyklonal	1:5000	1:200
NPM1 (B75) Oligomere	Maus	Sigma- Aldrich	monoklonal	1:1000	-
p21 (F-5)	Maus	Santa Cruz	monoklonal	1:500	-
p53	Maus	Santa Cruz	monoklonal	1:200- 1:1000	-
Taspase c-term	Kaninchen	Abgent	polyklonal	1:1000	1:100
Taspase n-term	Kaninchen	Abgent	polyklonal	1:1000	-
Taspase1	Maus	LSBio	monoklonal	1:1000	1:100
Vimentin Ab-2 (V9) (100)	Maus	Neo Markers	monoklonal	-	-

*Bei fehlenden Angaben zur Verdünnung werden die Herstellerangaben befolgt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Antigen	Organismus	Hersteller	Fluorochrom/ Enzymatische Aktivität	Verwendung - Western Blot	Verwendung - Immun- fluoreszenz
Anti-Kaninchen	Ziege	Dianova	Cy3		1:300
Anti-Maus	Ziege	Dianova	Cy3		1:300
Anti-Kaninchen	Ziege	Abcam	FITC		1:300
Anti-Maus	Huhn	Abcam	FITC		1:300
IgG Kaninchen	Ziege	Santa Cruz	HRP	1:5000	
IgG Maus	Ziege	Santa Cruz	HRP	1:5000	

3.1.5 Beads

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Beads

Bezeichnung	Hersteller	Ort	Beschreibung
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific	Dreieich	Hohe Bindungsaffinität (Biotin-Streptavidin Wechselwirkung)
Dynabeads® FlowComp™ Flexi	Invitrogen	Dreieich	Wiederablösbare Beads
CD326 (EpCAM) Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach	Antikörper gekoppelte Beads
Anti-HA Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach	Antikörper gekoppelte Beads, Negativkontrolle

3.1.6 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die folgenden Tabellen beinhalten alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (einschließlich Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung, Primer für Polymerasekettenreaktion [PCR] und Oligoannealing).

Tabelle 8: Primer für die Sequenzanalyse

Name	Sequenz
5'-pC3_seq	5'-GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC-3'
3'-pC3_seq	5'-CAACTAGAAGGCACAGTCGAG-3'
3'-GFP_seq	5'-GTGCTGCTGCCCCGACAACCAC-3'
3'-mCherry_seq	5'-CACCATCGTGGAACAGTACG-3'
5'-T7_seq	5'-TAATACGACTCACTATAG-3'
3'-SP6_seq	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

Tabelle 9: PCR-Primer

Name	Sequenz
5'-Bam-NPM1	TTTGGATCCACATGGAAGATTCGATGGACATGG
3'-Nhe-NPM1	TTTGCTAGCAAGAGACTTCCTCCACTGCCAGAG
NPM1aa1-186	TTTGCAGCAGTTCCTCATCATCAAAATCATCATCATC
NPM1aa1-117	TTTGCTAGCTACTAAGTGCTGTCCACTAATATGCACTG

NPM1aa187-294_ATG	TTTGGATCCATGGAAGAAAAAGCGCCAGTGAAGAAATCTATA
NPM1aa118-294_ATG	TTTGGATCCATGGCTGTGGAGGAAGATGCAGAG
NPM1aa260-294	TTTGGATCCATGTCTCTTCCCAAAGTGGAA
5'-NPM1-NLS-mut	GTTCCACAGGCAGCAGTAGCACTTGCTGCT
3'-NPM1-NLS-mut	AGCAGCAAGTGCTACTGCTGCCTGTGGAAC
5'-NPM1-NES-mut	CAGGCATCTGCAAGAACGGTCAGTGCAGGA
3'-NPM1-NES-mut	TCCTGCACTGACCGTTCTTGCAGATGCCTG
5'-hTasp-LDTVGA	TTGGACACGGTAGGCGCTGTG
3'-hTasp-LDTVGA	CACAGCGCCTACCGTGTCCAA
5'-dTasp-LDTVGA	TTGGACACAGTGGGAGCGGTA
3'-dTasp-LDTVGA	TACCGCTCCCACTGTGTCCAA
5'-BioDEN-RevNES2	AGCTTGGCCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGGAA
3'-BioDEN-RevNES2	AGCTTTCCAAGAGTAAGTCTCTCAAGCGGTGGTAGCTGAAGGCCA
5'-Bam-hTasp 1563	TTTGGATCCACATGACCATGGAGAAGGGGATG
3'-Nhe-hTasp 1564	AAAGCTAGCGTTCACTGGGCTCTCCAGGCGG
5'-Kpn-dTasp 2575	TTTGGTACCATGGCAGGCTTCGTCGCAGTG
3'-Nhe-dTasp 2576	TTTGCTAGCAATGCGCAGGTGGAAGTTGTGG
3'hTaspaa1-45	TTTCTCGAGCCAACACAAAGCCTCCTCGTTTCTCTTTAT
cDNA NPM1 for RT	TTTGAAATAACACCACCAGTG
cDNA NPM1 rev RT	ATCTTCATCAGCAGCAAGTTT

Tabelle 10: esiRNA für Protein-Knockdown

Name	Hersteller	Sequenz	gelöst in
Mission esiRNA NPM1	Sigma Aldrich #EHU115611- 20UG	GCTGGTGCAAAGGATGAGTTGCACATTGTTGAAGC AGAGGCAATGAATTACGAAGGCAGTCCAATTAAG TAACACTGGCAACTTTGAAAATGTCTGTACAGCCAA CGGTTTCCCTTGGGGGCTTTGAAATAACACCACCAG TGGTCTTAAGGTTGAAGTGTGGTTCAGGGCCAGTG CATATTAGTGGACAGCACTTAGTAGCTGTGGAGGA AGATGCAGAGTCAGAAGATGAAGAGGAGGAGGAT GTGAAACTCTTAAGTATATCTGGAAAGCGGTCTGCC	Nuklease- freiem TE- Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)

		CCTGGAGGTGGTAGCAAGGTTCCACAGAAAAAAGT AAACTTGCTGCTGATGAAGATGATGACGATGATG ATGAAGAGGATGATGATGAAGATGATGATGATGAT GATTTTGATGATGAGGAAGCTGAAGAAAAAGCGCC AGTGAAGAAA	
--	--	---	--

3.1.7 Vektoren

Die nachfolgende Auflistung enthält alle in dieser Arbeit verwendeten Klonierungs-Vektoren und die konstruierten bzw. erhaltenen Expressions-Vektoren.

Tabelle 101: Klonierungs-/Ausgangs-Vektoren

Plasmid	Relevante Merkmale	Quelle
pCDNA3 (+)	amp ^r , eukaryotischer Expressions-Vektor, neo ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pC3_BFP	amp ^r , eukaryotischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler BFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999)
pC3_GFP	amp ^r , eukaryotischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999)
pC3_mCherry	amp ^r , eukaryotischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler mCherry-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999)
pC3_GST/GFP	amp ^r , eukaryotischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung N-terminaler GST- und C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999)
pGEM Teasy	amp ^r , Klonierungs-Vektor	Promega, Mannheim

Tabelle 112: Humane Expressionsvektoren

Plasmid	Kodiert für	Referenz
pC3-NPM1-BFP	Volllänge NPM1 in Fusion mit BFP	Labor Prof. Stauber
pC3-NPM1-GFP	Volllänge NPM1 in Fusion mit GFP	Labor Prof. Stauber

pC3-NPM1-HA	Volllänge NPM1 in Fusion mit HA-tag	Labor Prof. Stauber
pC3-NPM1-mCh	Volllänge NPM1 in Fusion mit mCherry	Labor Prof. Stauber
pC3-NPM1aa1-117-GFP	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 117 und Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa1-117-HA	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 117 und Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa1-117-mCh	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 117 und Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa1-186-GFP	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 186 und Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa1-186-HA	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 186 und Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa1-186-mCh	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 186 und Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa106-294-GFP	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 106 bis 294 und Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa106-294-HA	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 106 bis 294 und Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa118-294-GFP	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 118 bis 294 und Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa118-294-HA	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 118 bis 294 und Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa118-294-mCh	NPM1-Mutantey mit verkürzter Aminosäuresequenz von 118 bis 294 und Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa187-294-GFP	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 187 bis 294 und Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa187-294-HA	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 187 bis 294 und Fusion mit HA	Diese Arbeit

pC3-NPM1aa187-294-mCh	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 187 bis 294 und Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa260-294-GFP	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 260 bis 294 und Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa260-294-HA	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 260 bis 294 und Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1aa260-294-mCh	NPM1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 260 bis 294 und Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1-NESmt-GFP	NPM1-Lokalisationsmutante (inaktiviertes NLS) in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1-NESmt-HA	NPM1-Lokalisationsmutante (inaktiviertes NLS) in Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1-NESmt-mCh	NPM1-Lokalisationsmutante (inaktiviertes NES) in Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1-NLSmt-GFP	NPM1-Lokalisationsmutante (inaktiviertes NLS) in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-NPM1-NLSmt-HA	NPM1-Lokalisationsmutante (inaktiviertes NLS) in Fusion mit HA	Diese Arbeit
pC3-NPM1-NLSmt-mCh	NPM1-Lokalisationsmutante (inaktiviertes NLS) in Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3-NPM1 _{C21F} -GFP	Volllänge NPM1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Cys21 nach Phe	Labor Prof. Stauber
pC3-NPM1 _{C21W} -GFP	Volllänge NPM1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Cys21 nach Trp	ehemaliges Labor Prof. Stauber
pC3-NPM1Cyt	Cytoplasmatisches NPM1	Labor Prof. Stauber
pC3-NPM1-MutA-BFP	NPM1-Mutante A mit BFP	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp-BFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit BFP	ehemaliges Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)

pC3-Tasp-HA	Volllänge Taspase1 in Fusion mit HA-tag	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pC3-Tasp-mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pC3-Taspaa1-45-GFP	Taspase1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 45 in Fusion mit GFP	Labor Prof. Stauber
pC3-Taspaa1-45-mycNES-GFP	Taspase1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 45 und einem mycNES in Fusion mit GFP	Labor Prof. Stauber
pC3-Taspaa1-45-HA	Taspase1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 45 in Fusion mit HA	Labor Prof. Stauber
pC3-Taspaa1-45-mCh	Taspase1-Mutante mit verkürzter Aminosäuresequenz von 1 bis 45 in Fusion mit mCherry	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp Δ 1-45-GFP	Taspase1 Deletionsmutante (Deletion der Aminosäuren 1 bis 45) in Fusion mit GFP	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp Δ 1-45-HA	Taspase1 Deletionsmutante (Deletion der Aminosäuren 1 bis 45) in Fusion mit HA	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp Δ 1-45-mCh	Taspase1 Deletionsmutante (Deletion der Aminosäuren 1 bis 45) in Fusion mit mCh	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp _{F43S} -GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Phe43 nach Ser	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp _{F43S} -HA	Volllänge Taspase1 in Fusion mit HA mit einer Mutation von Phe43 nach Ser	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp _{F43S} -mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry mit einer Mutation von Phe43 nach Ser	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp _{F43Y} -GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Phe43 nach Tyr	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp _{F43Y} -mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry mit einer Mutation von Phe43 nach Tyr	Labor Prof. Stauber

pC3-TaspTV-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Thr234 nach Val	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pC3-TaspTV-HA	Volllänge Taspase1 in Fusion mit HA-tag mit einer Mutation von Thr234 nach Val	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pC3-TaspTV-mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry mit einer Mutation von Thr234 nach Val	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CS1}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle1 des MLL-Proteins-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pC3-BioTasp _{CS2}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pC3-BioTasp _{CSmut(K1A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von K6 nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(I2A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von I5 nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(S3A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von S4 nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(Q4A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von Q3 nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(L5A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(D6A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D1 nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber

pC3-BioTasp _{CSmut(G7A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle ² des MLL-Proteins mit Mutation von G1' nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(V8A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle ² des MLL-Proteins mit Mutation von V2' nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(D9A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle ² des MLL-Proteins mit Mutation von D3' nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{CSmut(D10A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle ² des MLL-Proteins mit Mutation von D4' nach Ala-myc-RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-BioTasp _{Myo1F}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-AS 152-268 von Myo1F-myc-RevNES	Diese Arbeit
pC3-BioTasp _{PRS4}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-PRS4-myc-RevNES	Diese Arbeit
pC3-BioTasp _{TF2A}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-TFIIA-myc-RevNES	Diese Arbeit
pC3-BioTasp _{USF2}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-USF2-myc-RevNES	Diese Arbeit
pC3-Tasp _{Cyt} -BFP	Wanderndes Taspase1 Volllänge Protein in Fusion mit BFP und RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-Tasp _{Cyt} -GFP	Wanderndes Taspase1 Volllänge Protein in Fusion mit GFP und RevNES	Labor Prof. Stauber
pC3-TFIIA-GFP	Volllänge TFIIA in Fusion mit GFP	Labor Prof. Stauber
PF143	pCDNA3.1-Vektor, der für GFP codiert	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al 1999)
pC3-dTasp-GFP	Volllänge Drosophila Taspase1 in Fusion mit GFP	Dissertation Désirée Wünsch

pC3- α hTasp+ β dTasp-GFP	α -Untereinheit der humanen Taspase1 gepaart mit β -Untereinheit der Drosophila Taspase1 in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3- α hTasp+ β dTasp-mCh	α -Untereinheit der humanen Taspase1 gepaart mit β -Untereinheit der Drosophila Taspase1 in Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pC3- α hTasp+ β dTasp-mTomato	α -Untereinheit der humanen Taspase1 gepaart mit β -Untereinheit der Drosophila Taspase1 in Fusion mit mTomato	Diese Arbeit
pC3- α hTasp+ β dTasp-mOrange	α -Untereinheit der humanen Taspase1 gepaart mit β -Untereinheit der Drosophila Taspase1 in Fusion mit mOrange	Diese Arbeit
pC3- α dTasp+ β hTasp-GFP	α -Untereinheit der Drosophila Taspase1 gepaart mit β -Untereinheit der humanen Taspase1 in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3- α dTasp+ β hTasp-mCh	α -Untereinheit der Drosophila Taspase1 gepaart mit β -Untereinheit der humanen Taspase1 in Fusion mit mCherry	Diese Arbeit

3.1.8 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller/Referenz
<i>E. coli</i> Top 10		Invitrogen (Darmstadt)
<i>E. coli</i> XL2-BlueTM		Stratagene (Heidelberg)

3.1.9 Zelllinien

Tabelle 124: Auflistung verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika/Gewebe/Organismus	Medium	ATCC/Referenz
293T	Embryonales Nierengewebe, Homo sapiens	DMEM	CRL-11268

A431	Epidermis, Epidermales-Karzinom, Homo sapiens	DMEM	ATCC-CRL1555
Deuser	HNSCC, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom, Homo sapiens	DMEM-F12	HNSCCUM-03T
FaDu	Pharynx, Plattenepithelkarzinom, Homo sapiens	DMEM-FaDu	ATCC-HTB43 CVCL_1218
HeLa	Cervix, Adeno-Karzinom, Homo sapiens	DMEM	CCL-2 CVCL_0030
Hunkel	HNSCC, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (Metastase), Homo sapiens	DMEM-F12	HNSCCUM-02T
MCF-7	Brustdrüsen-Karzinom, Homo sapiens	DMEM	ATCC HTB-22
MEF (NIH3T3)	Embryonale Fibroblasten, Mus musculus	DMEM	ATCC-CRL1658
THP-1	Monozyten, Akute Monozytenleukämie, Homo sapiens	RPMI 1640	ATCC TIB-202
Vero	Niere, Fibroblasten-ähnlich, Cercopithecus aethiops	DMEM	ATCC-CCL81

3.1.10 Zellkulturmedien

Tabelle 135: Auflistung verwendeter Zellkulturmedien

Medium	Beschreibung	Zusatz	Hersteller	Verwendung
DMEM	Glukose 4500mg/l, Na-Pyruvate, ohne L-Glutamine	10 % FCS 1 % Glutamin 1 % Pen/Strep	Gibco (Karlsruhe) #21969	Zellkultivierung
DMEM - FaDu	Glukose 4500mg/l, Na-Pyruvate, ohne L-Glutamine	10 % FCS 1 % Glutamin 1 % Pen/Strep 1 % NEAA 1 % HEPES 2 % Natriumbicarbonat (7,5 %)	Gibco (Karlsruhe)	Zellkultivierung für FaDu-Zellen

DMEM-800	Selektionsmedium für stabile Zellen	10 % FCS 1 % Glutamin 1 % Pen/Strep G418 (Geneticin)	Gibco (Karlsruhe)	Zellkultivierung
DMEM-F12		10 % FCS 1 % Glutamin 1 % PenStrep		Zellkultivierung
OptiMEM	Serum-reduziert, L-Glutamin, 2400 mg/l Na-Bicarbonate, HEPES, Sodium Pyruvate	-	Gibco (Karlsruhe) #31985	Transfektion
RPMI 1640	Glukose 2000 mg/l, ohne L-Glutamine	20 % FCS (Sigma) 1 % Glutamin 1 % Pen/Strep	Gibco (Karlsruhe) #21870-084	Zellkultivierung

3.1.11 Software

Tabelle 146: Auflistung verwendeter Programme

Programm	Anbieter/Referenz
AxioVision	Zeiss, Oberkochen
Benchling	Benchling, Biology Software (2020). Verfügbar über https://benchling.com
BioEdit	Department of Microbiology, North Carolina State University
BLAST, GeneBank	National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Verfügbar über https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Canvas	Canvas GFX, Inc., Boston, USA
Fiji/ImageJ	Schindelin et al. 2012
Gene Construction Kit	Textco, West Lebanon, USA
NEBioCalculator	New England Biolabs, Inc., Ipswich, USA. Verfügbar über: https://nebiocalculator.neb.com
R	R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien. Verfügbar über: https://www.R-project.org

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Für die Polymerasekettenreaktion benötigt man die folgenden Komponenten: spezifisches Template (siehe Tabelle 12), spezifische Primer (siehe Tabelle 8), dNTPs 2,5 µM, 10x Biotherm-PCR-Reaktionspuffer (enthält 15mM MgCl₂), Biotherm Taq-DNA-Polymerase von GeneCraft (Lüdinghausen) und Aqua bidest., steril. Die Komponenten werden anschließend für einen 50 µl PCR-Ansatz nach folgendem Pipettierschema auf Eis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

- 5 µl – 10x PCR-Reaktionspuffer
- 4 µl – 2,5 µM dNTPs
- 1 µl – 10 µM „forward“ Primer
- 1 µl – 10 µM „reverse“ Primer
- 0,2 - 0,5 µg – Template (µl variabel)
- 1 µl – Taq-Polymerase
- Ad 50 µl – Aqua bidest., steril

Die PCR wird unter der Verwendung des Standardprogramms im Thermocycler von Biometra (Göttingen) oder von VWR (Darmstadt) gestartet. Die jeweilige Primer-Annealing-Temperatur (*) richtet sich nach den gewählten, spezifischen Primern. Der Ablauf des PCR-Programms sieht wie folgt aus:

- 95°C – 2min
 - 95°C – 30s
 - 61°C* – 30s
- } 35 Zyklen
- 72°C – 30s
 - 72°C – 7min
 - 4°C – ∞

Klenow-Fragmente zum Auffüllen

Wird benutzt, um sogenannte ‚sticky ends‘ zu blenden.

Eluat + 5 µl Puffer 2 + 1 µl Klenow + 0,66 µl 2,5 µM dNTPs mit anschließender Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA erfolgt eine Hitzeinaktivierung für 20 Minuten bei 75°C, um einen Reaktionsstopp auszulösen.

Zum Schluss erfolgt ein spezifischer Restriktionsenzymverdau.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Restriktion

PCR-Produkte werden nach Zugabe des 5x DNA-Probenpuffers mittels 1-2%igen Agarose-Gelen elektrophoretisch bei einer Spannung von 75 Volt und einer Dauer von 60min aufgetrennt und auf ihre Größe hin kontrolliert.

Benötigte Materialien:

- Agarose
- Ethidiumbromid (Stocklösung: 2 mg/ml H₂O)
- TAE-Puffer, 50x (242 g Tris; 18,6 g EDTA; 114,57 g NaAc*3 H₂O; ad pH 8 Salzsäure, ad 1 l H₂O)

- Größenstandard (NEB), 2-log-ladder
- Ladebuffer: Bromphenolblau; Xylolcyanol

Die Agarose-Gelelektrophorese wird außerdem für die Auftrennung von Produkten nach der DNA-Restriktion angewendet. Die DNA-Restriktion erfolgt dabei unter Verwendung von 10x CutSmart Restriktionspuffer von NEB und den Restriktionsenzymen von NEB im folgenden Mischverhältnis:

- 5 µl – 10x CutSmart Restriktionspuffer von NEB
- je 2,5 µl – Restriktionsenzyme von NEB (10 U/µl)
- 1-5 µg – DNA (µl variabel)
- Ad 50 µl – Aqua bidest., steril (bei PCR-Produkt-Verarbeitung der Inserts keine weitere Zugabe notwendig)

3.2.3 Gel-Elution

Die Auftrennung mittels Gelelektrophorese ermöglicht es, die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator (Syngene) auszuschneiden und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits von Qiagen unter Verwendung aller Herstellerangaben zu extrahieren.

QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Düsseldorf) enthält: QIAquick Spin-Säulen, QG-Solubilisation Buffer, PE-Washing Buffer, EB-Elution Buffer

3.2.4 DNA-Ligation

Das Verbinden von DNA-Fragmenten (Inserts), die entweder als Produkt durch die PCR entstanden sind oder mittels Restriktionsenzymen aus einem Plasmid geschnitten wurden, und die dazu entsprechend verdauten Plasmid-Vektoren nennt man DNA-Ligation. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, werden die 5'-Enden des restringierten Vektors mittels Zugabe einer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert, sodass die für eine Ligation notwendige Phosphatgruppe nur vom Insert bereitgestellt wird. Für die Ligation wurden TaKaRa (über Mobitec, Göttingen bezogen) oder die T4-DNA-Ligase von NEB (Frankfurt) unter Beachtung der Herstellerangaben benutzt.

Benötigte Materialien:

- CIP, 2 U/ μ l von NEB
- NEB-Puffer 3, 10x von NEB (Ipswitch)
- T4-DNA-Ligase von NEB
- TaKaRa-DNA-Ligase, Solution 1, Version 2.1 von Cambrex (Lonza)

3.2.5 Transformation kompetenter Zellen

Kompetente Bakterien (siehe Tabelle 13) werden bei -80°C gelagert und bei Verwendung zunächst auf Eis aufgetaut. Zu jedem Ligationsansatz werden 50 μ l dieser kompetenten Zellen hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt bei 42°C für 45 Sekunden. Die Zellen werden daraufhin direkt wieder auf Eis gestellt, auf vorgewärmten Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Brutschrank inkubiert.

Benötigte Materialien:

- kompetente Zellen (siehe Tabelle 14)
- LB-Amp-Agarplatten
(10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Yeast Extract, 20 g Bacto Agar, pH 7,0 mit NaOH, ad 1 l H_2O)

nach dem Autoklavieren und Abkühlen 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) hinzugeben.

3.2.6 Plasmidvermehrung

Über Nacht gewachsene *E.coli*-Kolonien auf den Agar-Amp-Platten werden einzeln gepickt und unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 170 rpm in LB-Amp-Medium inkubiert.

Benötigte Materialien:

- LB-Amp-Medium
(10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Yeast Extract, 20 g Bacto Agar, pH 7,0 mit NaOH, ad 1 l H_2O)

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) hinzugeben.

3.2.7 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation stehen je nach benötigter DNA-Menge zwei Kits von Qiagen zur Auswahl: DNA Miniprep-Kit oder DNA Maxiprep-Kit. Die Übernachtskultur wird zunächst mittels Zentrifugation pelletiert (Miniprep: 1 Minute bei 13 000 rpm/Maxiprep: 30 Minuten bei 4 600 rpm). Das Protokoll wird gemäß den Angaben des Herstellers verfolgt.

Benötigte Materialien:

- DNA Miniprep-Kit von Qiagen (Düsseldorf)

(bestehend aus QIAprep 8er Säulen, PE-(mit EtOH), P1-(mit RNase A und Lysis-Control), P2-, N3- und EB-Puffer)
- bzw. DNA Maxiprep-Kit von Qiagen (Düsseldorf)

(bestehend aus Qiagen-tip 500, P1- (mit RNase A und Lysis-Control), P2-, P3-, QBT-, QC- und QF-Puffer)
- Isopropanol
- Ethanol, 70 % (w/v)

3.2.8 Bakterien-Stock wegfrieren

Eine langfristige Lagerung der Übernachtskultur kann durch das Wegfrieren eines Glycerin-Bakterienstocks ermöglicht werden. Für die Herstellung dieses Stocks wird ein Teil der Übernachtskultur mittels Zentrifugation pelletiert (5 Minuten bei 4 600 rpm) und mit 15 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.2.9 DNA-Quantifizierung

Mittels des NanoDrop-Spektrometers 2000c der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham) oder in einer Quarzküvette mit Hilfe eines programmierten UV/Visible-Spektrometers (Amersham) erfolgt die Konzentrationsbestimmung der DNA-Probe. Die Extinktionsmessung findet bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm statt.

3.2.10 Sequenzierung

Sequenzierungen der DNA wurden von der Firma Genterprise Sequenzierservice GmbH (Mainz) durchgeführt und anschließend mittels der Software Bioedit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) und Gene Construction Kit (Texto Inc.) ausgewertet.

3.2.11 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA aus Zellen wird gemäß den Angaben des RNeasy Mini Kits von Qiagen (Düsseldorf) isoliert.

Benötigte Materialien:

- Trizol von Invitrogen (Karlsruhe)
- Chloroform
- 70 % Ethanol
- RNeasy Mini Kit von Qiagen (Düsseldorf)

3.2.12 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA

Aus 1 µg Gesamt-RNA wird gemäß den Angaben des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche (Mannheim) cDNA gewonnen. Die gewonnene cDNA kann im Anschluss bei -20°C gelagert werden.

Benötigte Materialien:

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche (Mannheim)

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Protein Maxi-Präparation

Um eine Protein Maxi-Präparation durchzuführen, wird am Vortag eine 50 ml-Bakterienkultur angeimpft und je nach Protein entweder bei 37°C oder Raumtemperatur bis zur Trübung bei 150 rpm inkubiert. Zur Kontrolle wird auch ein Teil der Bakterienkultur auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C

inkubiert, die am Abend bzw. nächsten Tag auf die Bildung von Kolonien hin gesichtet wird. Bei der Verwendung von Rosetta-Bakterien wird auf die LB-Agarplatten und zu dem LB-Medium zusätzlich Chloramphenicol hinzugefügt. Bei eingetretener Trübung der 50 ml Bakterienkultur werden 200 ml LB-Medium sowie eine Induktion von 0,2 mM IPTG hinzugefügt und bei 37°C und 150 rpm weiter inkubiert, bis eine ausreichende Zelldichte der Bakterienkultur erreicht ist. Dies wird anhand einer Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm kontrolliert (OD₆₀₀-Wert von 0,5 muss erreicht werden). Sobald die gewünschte Zelldichte erreicht ist, wird die Bakterienkultur für 30 Minuten bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet kann in diesem Zustand eingefroren werden. Sofern die Präparation unmittelbar fortgesetzt wird, erfolgt die Resuspension des Pellets mit 10 ml eiskaltem PBS-Puffer. Außerdem werden 26 µl MnCl₂, 260 µl MgCl₂ und eine Spatelspitze Lysozym hinzugefügt, gut vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen drei Mal 10 Sekunden lang bei einer maximalen Amplitude von 96% sonifiziert. Danach erfolgt die Zugabe von 1 ml NaCl und 500 µl 20% Triton-X-100 und eine weitere Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis mit anschließender Zentrifugation für mindestens 30 Minuten bei 10 000 rpm und 4°C. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 300 µl Glutathione Sepharose Beads für 1 – 2 Stunden bei 4°C auf dem Rollinkubator inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 3 500 rpm und 4°C. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 50 ml 1% Triton-X-100 in PBS gewaschen bis erneut für 5 Minuten bei 3 500 rpm und 4°C zentrifugiert wird. Der Überstand wird erneut vorsichtig abgesaugt und das Pellet zwei Mal mit 50 ml PBS gewaschen. Die Beads werden in 5 ml Restflüssigkeit resuspendiert und in die Polyprepsäule gegeben. Die Polyprepsäule soll trocken laufen, bis sie mit der Verschlusskappe verschlossen wird. Je nach Pelletgröße werden 300, 500 oder 1000 µl des frisch angesetzten Elutionspuffers hinzugefügt, die Säule von oben verschlossen und für 10 – 20 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Säule über ein Auffanggefäß gestellt und eluiert. Das eluierte Protein wird im Dialyseschlauch für etwa 5 Stunden in 2 – 5 l PBS bei 4°C dialysiert. Das Protein wird anschließend aliquotiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Benötigte Materialien:

- Bakterienkultur
- LB-Medium, LB-Agarplatte
- 1M IPTG

- Küvetten
- PBS
- PBS-Puffer (PBS; 100 µg/ml DNase I aus dem RNEasyKit; Inhibitor Complete Tablette; bei der Verwendung von Rosetta Bakterien werden zusätzlich 2 µl Benzonase hinzugegeben)
- 1M MnCl₂; 1M MgCl₂, Lysozym; 5 M NaCl; 20 % Triton-X-100
- Glutathione Separose Beads
- 1% Triton-X-100 in PBS
- Polyprepsäulen
- Elutionspuffer (150 µl 5 M NaCl; 250 µl 1 M Tris pH 8; 4,6 ml H₂O; 0,023 g Glutathion)
- Dialyseschlauch Snakeskin

3.3.2 Herstellung von Gesamt-Zelllysaten

Zur Herstellung von Gesamt-Zelllysaten erfolgen alle arbeiten auf Eis. Zunächst werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von den Kulturschalen geerntet und für 5 Minuten bei 1 500 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 2 000 rpm) und mit dem jeweiligen Lysepuffer resuspendiert. Bei der Herstellung von RIPA-Lysaten, richtet sich das verwendete Volumen des Puffers nach der Größe des Zellpellets und kann zwischen 40 und 100 µl variieren. Bei der Herstellung von Gesamt-Zelllysaten aus Hepatozyten sieht die Verwendung von einem speziellen Hep-Lysepuffer vor. Bei der Herstellung von Lysaten mit anschließender Immunpräzipitation (IP) wird 1 ml IP-Lysepuffer hinzugefügt. Bei der Herstellung von Lysaten für die Native-PAGE wird 1ml spezifischen Lysepuffer hinzugegeben. Während des Lysevorgangs werden die Proben innerhalb von 20 Minuten Inkubationszeit auf Eis sonifiziert (3x 30 Pulse, 50 %). Die Lysate werden anschließend für 20 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und entweder bei -80°C gelagert, für die Immunpräzipitation oder für ein natives Gel weiterverwendet.

Benötigte Materialien:

- modifizierter RIPA-Puffer

(50 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 1 mM EDTA; 1 % Na-deoxycholat; 1 % NP-40; 0,5 mM PMSF; Protease-Inhibitor-Cocktail von Roche)

- IP-Lysepuffer

(50 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; Protease-Inhibitor-Cocktail von Roche), Lagerung bei -20°C

- Lysepuffer für Native-PAGE

(50 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,5 % NP-40; 0,5 % Triton-X-100; Protease-Inhibitor-Cocktail von Roche)

- Hep-Lysepuffer

(50 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,5 % Triton-X-100; 0,5 % Nonidet P-40; 10 % HCl)

3.3.3 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation ermöglicht es ein spezifisches Protein mittels eines Antikörpers aus einem Gesamt-Zelllysate zu isolieren. Für diese Arbeit wurden die Isolation Kits von Miltenyi (Bergisch Gladbach) mit Beads, die entweder an einen GFP- oder HA-Antikörper gekoppelt sind, benutzt.

Für die Durchführung der Immunpräzipitation werden 293T Zellen (5×10^7 Zellen pro 10 cm Schale) transfiziert und anschließend nach 48 Stunden geerntet. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, erfolgt die Zelllyse mit je 1 ml IP-Lysepuffer. Von dem Überstand werden 30 µl (3% Input) abgenommen und bei Lagerungsbedarf bei -80°C weggefroren. Der restliche Überstand wird nach Angaben des Herstellers für die Immunpräzipitation verwendet. Die Elution wird mit 95°C heißem Elutionspuffer (Gesamtvolumen von 70 µl/Probe) durchgeführt. Das native Eluat wird vor der Benutzung nach der Zugabe von Dissoziationspuffer gekocht.

Benötigte Materialien:

- µMACS GFP Isolation Kit von Miltenyi (Bergisch Gladbach)
- µMACS HA Isolation Kit von Miltenyi (Bergisch Gladbach)

- 6x Dissoziationspuffer (350 mM Tris/HCl pH 6,8; 3 ml β -mercapto-Ethanol; 1 g SDS-Pellets; 3 ml Glycerin; 200 mg Bromphenolblau; H₂O ad 10 ml)

3.3.4 Bradford zur Proteinquantifizierung

Die Methode nach Bradford [151] wird zur Bestimmung des Proteingehaltes verwendet. Hierzu wird vorab die Stammlösung des Protein-Reagens (BioRad Protein Assay, mit Coomassie G-250, BioRad) in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend werden 1 μ l des Proteinlysats und des entsprechenden Lysis-Puffers mit 200 μ l Bradford-Lösung vermischt. Die Messung erfolgt mit dem Photometer bzw. Tecan Reader bei 595 nm und wird anhand einer Eichkurve quantifiziert.

3.3.5 SDS-PAGE

Für die Verwendung einer SDS-PAGE wird zunächst ein Polyacrylamidgel gegossen und zur Auspolymerisation über Nacht feucht im Laufpuffer bei 4°C inkubiert. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wird das Polyacrylamidgel ausgesucht.

Das Polyacrylamidgel wird in das Gelkammersystem von BioRad eingespannt und bis zur Markierung mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben werden mit 1/6 Volumen Ladepuffer für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend kurz runterzentrifugiert. Pro Geltasche werden 20 – 30 μ l pro Probe bzw. bei IP-Eluaten 30 – 35 μ l pro Probe geladen, da die Eluate nach der Elution mit heißem Dissoziationspuffer bereits denaturiert vorliegen. Zusätzlich wird eine Tasche mit 7 μ l Größenstandard beladen. Die SDS-PAGE verläuft in zwei Etappen: der Lauf beginnt mit dem Sammelgel bei etwa 50 V und wird bei Erreichen des Trenngels auf bis zu 100 V eingestellt.

Benötigte Materialien:

- Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS)
- Trenngel-Puffer (1,5 M Tris pH 8,9; 0,4 % SDS)
- Acrylamid-Lösung (30 % w/v)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) von Serva Electrophoresis (Heidelberg)
- APS, 10 % (1g Ammoniumpersulfat ad 10 ml H₂O; sterilfiltrieren und lagern bei -20°C)

- Isopropanol
- Gelgießstand für Acrylamidgele von BioRad (München)
- 1x SDS-Laufpuffer (30,3 g Tris; 144,1 g Glycin; 5 g SDS; ad 1 l H₂O; pH 8,8)
- Größenstandard peqGOLD Prestained Proteinmarker IV von peqLab (Erlangen)

3.3.6 Native-PAGE

Die Native-PAGE sieht wie die SDS-PAGE vor der Verwendung die Herstellung eines Polyacrylamidgels vor. Hierbei wird allerdings kein SDS verwendet (siehe benötigte Materialien). Zur Auspolymerisation kann das Gel ebenfalls feucht im Laufpuffer für die native-PAGE bei 4°C inkubiert werden. Anschließend wird das Polyacrylamidgel in das Gelkammersystem eingespannt und bis zur Markierung mit dem Laufpuffer für die Native-PAGE befüllt. Die Lysate werden in diesem Fall mit ½ Volumen Sample Buffer vermischt und nicht mehr erhitzt. Die Geltaschen werden mit 30 µl Probe bzw. 7 µl Größenstandard beladen. Die Native-PAGE läuft im Vergleich zur SDS-PAGE deutlich langsamer (mehrere Stunden), sodass das Gelkammersystem auf Eis platziert wird, um eine Überhitzung zu verhindern. Für den Lauf des Sammelgels werden 60 V und für das Trenngel 100 V eingestellt.

Benötigte Materialien:

- 2x Sample Buffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 25 % Glycerol; 1 % Bromphenol Blau)
- 0,375 M Tris-HCl pH 8,8
- Acrylamid-Lösung (30 % w/v)
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) von Serva Electrophoresis (Heidelberg)
- APS, 10 % (1g Ammoniumpersulfat ad 10 ml H₂O; sterilfiltrieren und lagern bei -20°C)
- Isopropanol
- Gelgießstand für Acrylamidgele von BioRad (München)
- 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; pH 8,8)
- Größenstandard Pro Sieve Quad Color

3.3.7 Elektrophorese mit Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel

Die Verwendung von Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel für die PAGE ermöglicht eine zeitsparende Elektrophorese verbunden mit einer hohen Transfereffizienz, sowie einer schnellen Protein-Detektionsanwendung ohne benötigte Färbeschritte. Somit eignet sich dieses System hervorragend, um schnell und einfach die Protein-Auftrennung bei schwer darzustellenden Konstrukten zu kontrollieren.

Die Lysate werden wie gewohnt in die Taschen des Gels gefüllt und unter Gebrauch eines Lämmli-Laufpuffers im Gelkammersystems bei 150 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss muss kein Blotting-Prozess erfolgen, da die trihalo Verbindung in dem Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel mit den Tryptophanresten der Proteine nach einer 1-minütigen UV-Induktionsreaktion reagiert und Fluoreszenz produziert. Die Visualisierung kann somit direkt in dem Gel erfolgen.

Benötigte Materialien:

- Lysate
- Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gel
- Lämmli-Laufpuffer
- Größenstandard (Precision Plus Protein Standard, Protein Ladder 2-log)

3.3.8 Western Blot/ Immunblot

Bei der Western Blot Methodik erfolgt die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. In diesem Fall handelt es sich um eine PVDF-Membran, die vorab eine Minute in Methanol aktiviert und 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert wird. Das Blotting erfolgt mittels TurboBlotter mit einem der beiden Programme: Stauber 1 /Stauber 2: 20 Volt, 0.8, 45 Minuten.

Im Anschluss wird die Membran zum Blocken für 1 Stunde bei Raumtemperatur in etwa 5 ml Magermilchlösung auf dem Schüttler inkubiert. Für die Detektion erfolgt zunächst die Inkubation eines Primärantikörpers unter Verwendung der in Tabelle 5 angegebenen Verdünnung für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Membran zweimal 5 Minuten mit PBS + 0,1 % Tween 20 Waschpuffer und einmal 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgen weitere 3 Waschschrte bevor der Blot unter Zugabe von ECL-Lösung

nach Herstellerangaben entwickelt wird. Zur Lagerung können die Membranen in PBS bei 4°C aufbewahrt werden.

Benötigte Materialien:

- SDS-Polyacrylamidgel mit aufgetrennten Proteinen
- Roti® – PVDF-Membran von Roth (Karlsruhe), 9x6 cm
- Whatman-Papier von Fisher Scientific (Schwerte), 10x7 cm
- TurboBlot Transferpuffer
- Magermilchlösung (5% in PBS)
- Waschpuffer (0,1 % Tween 20 in PBS, PBS)
- Antikörper-Lösungen (Tabelle 5)
- TurboBlotter
- Entwickler ChemiDoc MP (BioRad)
- ECL-Lösung von Amersham (Buckinghamshire)
- Schüttler

3.3.9 Strippen der Western Blot Membran

Um die Western Blot Membran zu Strippen wird etwa 5 ml der 1:10 verdünnten Stripping-Lösung auf die Membran gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wird die Membran dreimal 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und erneut geblockt und im nächsten Primärantikörper inkubiert.

Benötigte Materialien:

- Re-Blot Plus Strong, 10x von Chemicon (1:10 in H₂O verdünnt)
- Waschpuffer (PBS)

3.4 Zellbasierte Methoden

3.4.1 Kultivierung von Zellen

Bei der Kultivierung von Suspensionszellen wird neben der mikroskopischen Sichtkontrolle der Farbumschwung des Mediums ebenfalls besonders begutachtet. Sobald das Medium eine deutliche gelbe Färbung zeigt, werden 1 – 2 ml frisches Medium zu der Zellkultur hinzugegeben und diese weiter kultiviert. Bei einer sichtlichen Zelldichte werden die Suspensionszellen im Verhältnis 1:2 gesplittet, wobei für die Kultivierung ein Medium aus 50% frischem Medium und 50% konditioniertem Medium besteht. Unter anderem ist es hilfreich mit der Zeit abgestorbene Zellen aus der Kultur zu entfernen. Dafür wurde das Dead Cell Removal Kit von MACS nach Herstellerangaben verwendet.

Für bestimmte Experimente ist die Verwendung von Monozyten notwendig, sodass für diese Experimente THP-1-Zellen in der gewünschten Verdünnung in Mikroskopie-Schälchen ausgesät und unter Zugabe von 50 ng/ml PMA zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen stimuliert werden. Genau 24 Stunden nach PMA-Zugabe sind die Zellen adhärent, sodass sie vorsichtig zwei Mal mit Medium gewaschen werden und anschließend für weitere 48 Stunden zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen inkubiert werden.

Benötigte Materialien:

- PMA
- Dead Cell Removal Kit von MACS

3.4.2 Zellen wegfrieren

Für eine lange Lagerung von Zellen werden diese im Stickstofftank weggefroren. Um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten, werden 2 konfluente T75-Kulturflaschen benötigt. Dies entspricht Zellen pro Cryo-Gefäß. Die Zellen werden wie bei den Schritten der Erhaltungskultur nach Abnahme des Zellmediums mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Nach der Aufnahme der abgelösten Zellen mit Medium werden diese in einem Falcon für 5 Minuten bei 1 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in FCS + 10 % DMSO resuspendiert und in je 1,5 ml pro Cryo-Gefäß überführt. Um den Zellen einen milden Einfrierprozess zu ermöglichen, wird eine Einfrierhilfe verwendet, die zunächst bei - 80°C aufbewahrt wird. Am nächsten Tag werden die Zellen aus der Einfrierhilfe in den Stickstofftank überführt.

Benötigte Materialien:

- PBS
- Medium
- Trypsin
- FCS
- DMSO
- Einfrierhilfe

3.4.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl der Zellsuspension in 10 ml Casy Ton verdünnt und mittels Casy TTC mit spezifisch eingestellten Parametern für die ausgewählte Zelllinie gemessen. Um die Parameter noch effizienter einzustellen und tote Zellen aus der gemessenen Probe herausrechnen zu können, wurden die Zellen in 200 µl Casy Blue für 10 Minuten inkubiert und anschließend mit Casy Ton verdünnt, bevor sie zusätzlich gemessen werden konnten.

3.4.4 Transfektionen

3.4.4.1 Transfektion mittels kationischer Polymere (PEI)

Die Transfektion mit PEI wird als schnelle Methode zur Kontrolle der Plasmidpräparation angewendet, sofern das Plasmid einen Fluoreszenz-tag beinhaltet. Hierzu werden die schnell proliferierenden Zellen 293T transfiziert (15 µl PBS vorlegen, 7µl DNA aus Miniprep und ein Gemisch aus 15 µl PBS + 2,7 µl PEI dazu; vortexen) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Kontrolle kann am nächsten Tag mittels Sichtkontrolle am Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Benötigte Materialien:

- PBS; DNA
- PEI: Polyethylenimin, 10 mM von Sigma-Aldrich (München); PBS, 1x, steril von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

3.4.4.2 JetPrime

Eine Transfektion mit dem Transfektionsreagenz JetPrime wird als Standard-Reagenz für Transfektionen verwendet. Die Transfektion wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In den meisten Fällen erfolgt diese Transfektion für den Zweck von Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop, sodass hier exemplarisch das Protokoll für eine 6 cm Schale erläutert wird. Die Zellen werden in der gewünschten Verdünnung in ein 6 cm Schälchen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80-90 % (für gewöhnlich am nächsten Tag) transfiziert. Zunächst werden 200 µl JetPrime Puffer in ein Epi vorgelegt und insgesamt 2 µg Plasmid-DNA von einem oder einer Kombination von Plasmiden hinzupipettiert. Dieses Gemisch wird 10 Sekunden gevortext bis 4 µl Reagenz hinzugegeben werden und dieses Gemisch erneut 10 Sekunden gevortext wird. Im Anschluss wird die Mischung kurz runterzentrifugiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der gesamte Inhalt in das Medium des 6 cm Schälchens vorsichtig hinzupipettiert wird. Je nach Protein (z.B. proapoptotische Proteine) kann das Medium nach 4-6 Stunden gewechselt werden, um die Viabilität der Zellen zu verbessern.

Benötigte Materialien:

- JetPrime Kit von Polyplus Transfection
- Medium

3.4.4.3 Lipofectamin 2000

Sofern eine Transfektion mit dem Standard-Transfektionsreagenz kein adäquates Ergebnis liefert, wird die Transfektion von Plasmid-DNA mit Lipofectamin™ 2000 durchgeführt. Die Zellen werden in der gewünschten Verdünnung ($0,5-2 \times 10^5$ Zellen pro 500 µl) ausgesät und beim Erreichen einer Konfluenz von 80-90% nach Angaben des Herstellers transfiziert. Exemplarisch wird hier die Transfektion im 24-Lochplattenformat beschrieben. In einem Epi werden 0,8 µg Plasmid-DNA in 50 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium gelöst. Separat in einem weiteren Epi werden 2 µl des Lipofectamin™ 2000 Reagenz in ebenfalls 50 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium gelöst und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden beide Lösungen vereint und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Benötigte Materialien:

- Lipofectamin™ 2000 Kit von Invitrogen (Karlsruhe)

- Opti-MEM Reduced Serum Medium
- Plasmid-DNA

3.4.4.4 Lipofectamin RNAi Max

Für die Transfektion von siRNA wurde in dieser Arbeit das Transfektionsreagenz Lipofectamin RNAi MAX von Invitrogen verwendet. Exemplarisch wird eine Transfektion im 6-Lochplattenformat dargestellt: Am Transfektionstag sollten die Zellen eine Konfluenz von 60-80% aufweisen bei einer adhärenenten Zellzahl von $0,25-1 \times 10^6$. Zunächst wird das Lipofectamin vorbereitet, indem in einem Epi 150 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium vorgelegt und 9 µl Lipofectamin-Reagenz gelöst werden. Im weiteren Schritt wird die siRNA vorbereitet, indem in einem weiteren Epi 150 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium vorgelegt und 30 pmol siRNA hinzugefügt werden. Die gelöste siRNA wird zu der Lipofectamin-Lösung hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Transfektionslösung in das Zellmedium gegeben. Nach 6 Stunden kann das Medium bei Bedarf gewechselt werden. Die Zellen müssen 1-3 Tage bei 37°C inkubiert werden.

Benötigte Materialien:

- Lipofectamin RNAi MAX Kit
- Opti-MEM Reduced Serum Medium
- siRNA

3.4.5 Inhibitor-Behandlung

Die Behandlung mit dem NPM1-Inhibitor NSC348884 oder Actinomycin-D wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt in der erforderlichen Konzentration zum Zellmedium hinzugefügt und anschließend inkubiert.

NSC348884: 5 mg/ml in DMSO, (7,852 mM)

Actinomycin-D: 5 µg/ml, (3,98 nM)

3.4.6 Bestrahlung mit γ -Strahlen

Die Zellen werden in der gewünschten Zellzahl ausgesät und bei Bedarf transfiziert. Die Bestrahlung wird zu im Experiment festgesetzten Zeitpunkten mit einer vorab bestimmten Gy-Stärke durchgeführt. Für den Transport zur Bestrahlungsanlage werden die Zellen in eine Isolierbox überführt. Schwankungen der Temperatur und des CO₂-Gehaltes sind daher anzunehmen und bei der Auswertung zu beachten.

3.4.7 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden die Zellen verdünnt in Mikroskopieschälchen ausgesät. Bei Bedarf werden die Zellen am nächsten Tag transfiziert und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden gefärbt. Dafür wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen soll unter allen Umständen verhindert werden. Anschließend folgt die Fixierung der Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 0,2%igem Triton-X-100 in PBS für 3 Minuten permeabilisiert. Folglich werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Je nach verwendetem Antikörper erfolgt nun ein zusätzlicher Blocking-Schritt für 30 Minuten mit 0,5% BSA in PBS bevor die Primärantikörperlösung für entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert wird. Vor der Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgt nochmals ein Waschschriff mit PBS. Dieser Waschschriff wird nochmals wiederholt, bevor die Zellen zur Darstellung der DNA mit Hoechst für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt werden. Am Ende des Färbeprozesses werden die Zellen ein letztes Mal mit PBS gewaschen, bevor sie am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können.

Benötigte Materialien:

- 4 % Paraformaldehyd (PFA)
- 0,2 % Triton-X-100 in PBS
- PBS (2g KCl; 2 g KH₂PO₄; 80 g NaCl; 14,35 g Na₂HPO₄*2 H₂O; ad 1 l H₂O)
- Blocking-Lösung (0,5 % BSA in PBS)
- Antikörper-Lösung (Tabelle 5 und 6)
- Hoechst-Farbstoff (0,5 mg ad 10 ml PBS)

3.4.8 Färbung mit PKH26 Red Fluorescent Linker Kit

PKH26 ist ein rot fluoreszierender, lipophilen Membranfarbstoff, der für die allgemeine Zellmembranmarkierung vorgesehen ist. Dieser Farbstoff eignet sich ebenfalls für die Färbung von Exosomen.

Das abgewandelte Protokoll zur Zellfärbung wird anschließend erläutert: Für die Durchführung der Zellfärbung wurden in Medium aufgenommene Zellen in ein Epi überführt und einmal mit FCS-freiem Medium gewaschen und für 5 Minuten bei 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, bis maximal 25 µl Flüssigkeit über dem Zellpellet übrigbleibt. Zur Herstellung der 2x Zell-Suspension wird das Pellet mit 250 µl Lösung C aus dem PKH26 Red Fluorescent Linker Kit resuspendiert. Parallel dazu wird eine 2x Färbelösung angesetzt, indem 1 µl PKH26 zu 250 µl Lösung C aus dem PKH26 Red Fluorescent Linker Kit hinzugefügt und vermischt wird. Anschließend wird die Zellsuspension zu der Färbelösung gegeben und für 1 – 5 Minuten bei periodischem Mischen inkubiert. Die Färbung wird durch die Zugabe von gleichem Volumen an Serum abgestoppt und für 1 Minute inkubiert. Die Zellen werden im Anschluss für 10 Minuten bei 400 xg und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das gefärbte Zellpellet wird in 10 ml Medium resuspendiert und in ein frisches Gefäß überführt, bis es erneut für 5 Minuten bei 400 xg und Raumtemperatur zentrifugiert wird. Es folgen zwei Wiederholungen der Medium-Waschschritte, bis das Pellet nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 2 ml Medium resuspendiert wird. Durch die Überführung in ein Mikroskopie-Schälchen kann eine Analyse am Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Benötigte Materialien:

- PKH26 Red Fluorescent Linker Kit von Sigma-Aldrich, Cat. Nr. Mini 26
- Serum
- Medium

Eine Zellfärbung mit PKH26 kann ebenfalls mit adhären Zellen durchgeführt werden. In diesem Fall entfallen die Zentrifugationsschritte und die Waschschritte werden direkt im Schälchen durchgeführt.

Die Exosomenfärbung mit PKH26 wird nach Herstellerangaben des PKH26 Red Fluorescent Linker Kits bis zu der Verwendung von der Succrose-Lösung durchgeführt. Stattdessen werden ab diesem Schritt des Protokolls die Vivaspin 500 Säulen zum Filtern der Proben verwendet.

Benötigte Materialien:

- Vivaspin 500 Säulen von Sartorius, 300 000 MWCO, PES-Filter

3.4.9 Zellsynchronisation

Um Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus beobachten zu können, gibt es die Möglichkeit den Ablauf der Zellteilung durch die Zugabe von Chemikalien zu synchronisieren. Durch die Zugabe von Thymidin wird der Zellzyklus beim Übergang der G1- Phase in die S-Phase angehalten. Sobald der Zelle überschüssig Thymidin zur Verfügung gestellt wird, erfolgt durch die negative Rückkopplung die Hemmung der DNA-Synthese, die normalerweise in der S-Phase stattfinden würde. Die Zellen verbleiben so lange im G1-Arrest bis das Thymidin mittels eines Medienwechsels entfernt wird. Durch das fehlende Thymidin wird in den Zellen der Zellzyklus wieder gestartet und diese treten nach etwa 8 Stunden in die Mitose ein.

Dieser Versuchsablauf wird für die Beobachtung der Quantum Dots und Exosomen-Lokalisation innerhalb der Zellen über die Zeit und insbesondere bei der Zellteilung verwendet. Somit werden die Zellen am Nachmittag mit einer Konfluenz von 30-40% in Grid-Mikroskopie-Schälchen mit Thymidin versetztem Medium ausgesät. Am übernächsten Morgen wird kurz vor der Injektion frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Benötigte Materialien:

- Thymidin-Lösung von Sigma-Aldrich (0,5 mg/ml)
- Grid-Mikroskopie-Schälchen

3.4.10 Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion werden Vero-Zellen in Mikroskopieschälchen mit Raster ausgesät und bei einer Konfluenz von 40 – 50 % mikroinjiziert.

Die Parameter für optimale Injektionsbedingungen sind t_i bei etwa 0,5 Sekunden, p_i in den Kern 50 hPa (Minimum) bzw. in das Cytoplasma etwa 120 hPa und p_c bei etwa 50 hPa.

Benötigte Materialien:

- Mikroskopieschälchen mit Raster
- Kapillare
- Eppendorf, Femtotips II (QD 570 nm)

3.5 Methoden zur Isolation von Zellen und Mikrovesikeln

3.5.1 Beadkopplung (Dynabeads MyOne Streptavidin T1)

Für die Durchführung der Beadkopplung wird zunächst der Antikörper, an den die Beads gekoppelt werden sollen, angesetzt. Hierfür werden 20 µl des anti-human CD326 (EpCAM) Antikörpers mit 480 µl PBS vermengt (dies entspricht einer Endkonzentration von 20 µg/ml). Im nächsten Schritt werden die Beads gewaschen, indem man 500 µl der Dynabeads MyOne Streptavidin T1 Beads für 10 Minuten magnetisch separiert. Der Überstand wird verworfen, die Beads werden von dem Magneten gelöst und mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Dieser Waschschrift mittels Magnetständer wird dreimal durchgeführt. Beim letzten Waschschrift werden die Beads mit 500 µl der zuvor angesetzten Antikörperlösung vermengt und für 60 Minuten im Überkopfschüttler unter Verwendung des Programms F5 inkubiert. Anschließend wird die Bead-Antikörpersuspension erneut 10 Minuten magnetisch separiert und der Überstand verworfen. Die nun mit dem Antikörper gekoppelten Beads werden mit 500 µl Biotinlösung vermischt und für 30 Minuten im Überkopfmischer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Biotinlösung mittels magnetischer Separation entfernt. Es folgt ein wie bereits zuvor beschriebener Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer. Zum Schluss werden die fertig gekoppelten Beads in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Benötigte Materialien:

- Antikörper: Anti-human CD326 (EpCAM) Clone 1B7 von eBioscience (Artikelnummer 13-9326-82)
- Beads: Dynabeads MyOne Streptavidin T1 von Life Technologies (Artikelnummer 65602)
- PBS
- Waschpuffer (PBS + 0,1 % BSA)
- Biotinlösung (0,5 mg Biotin + 500 µl PBS)

- Magnetständer (BioRad)

3.5.2 Zellfärbung mit CFSE (zum Fangen der Zellen)

Die zu fangenden Zellen werden in einer angemessenen Verdünnung für 5 Minuten bei 400 xg und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden 5 mM CFSE hinzugegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 400 xg und Raumtemperatur) erfolgt. Der Überstand wird erneut verworfen, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wird die Zellsuspension erneut für 5 Minuten bei 400 xg und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wird in 1 ml Medium resuspendiert und zum Fangen in ein Mikroskopie-Schälchen überführt. Damit die Zellen sich in dem Mikroskopie-Schälchen etwas setzen können, wird eine Lagerung bei 37°C im Dunkeln empfohlen.

Benötigte Materialien:

- 5mM CFSE
- PBS
- Zellmedium

3.5.3 Fangen von einzelnen Zellen

Die Zellen werden, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, mit CFSE gefärbt und im letzten Schritt in ein Mikroskopie-Schälchen überführt. Sobald sich die Zellen nach einigen Minuten abgesetzt haben, können diese unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops einzeln mit einer 10 µl Pipette einzeln aus dem Medium aufgesaugt werden. Dieser Prozess des Fangens wird zu Beginn des Projektes für die Etablierungsarbeiten und für die vereinfachte Wiederfindung der mit CFSE gefärbten Zellen unter Verwendung der Fluoreszenz durchgeführt. Im weiteren Verlauf des Projektes werden die Zellen ungefärbt unter einfachem Durchlicht gefangen. Somit sollen die Stressreaktionen der Zellen, die bei dem Färbeprozess entstehen können, minimiert werden.

Benötigte Materialien:

- 10 µl Pipettenspitzen low binding

3.5.4 Standardanreicherung (mit Dynabeads MyOne Streptavidin T1)

Für die Standardanreicherung werden 20 Zellen gefangen und in 7,5 ml Medium bzw. Blut gespikt. Nach der Zugabe von 150 µl gekoppelter Beads (siehe Kapitel 3.5.1 Beadkopplung) werden die Zellen für 30 Minuten bei wiederholtem Invertieren mit der Hand gemischt. Nach einer darauffolgenden 10-minütigen magnetischen Separation wird der Überstand entfernt und die Zellen werden mit 5 ml Waschpuffer vorsichtig resuspendiert. Nach einer 5-minütigen magnetischen Separation wird der Überstand erneut entfernt und die Zellen werden erneut mit 5 ml Waschpuffer vorsichtig resuspendiert. Nach einer weiteren 5-minütigen magnetischen Separation verringert sich das Waschpuffervolumen zunächst auf 4 ml und nach weiteren 5 Minuten Magnetseparation auf 1 ml Waschpuffer. Nach einem letzten Schritt der magnetischen Separation wird das Zellen-Beads-Gemisch mit einem Endvolumen von etwa 60 µl aufgenommen. Zum Zweck der statistischen Auswertung kann die Neubauer-Zählkammer verwendet werden oder es erfolgt eine Sichtung des gesamten Volumens in iBidi-Slides unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops.

Negativkontrolle (Nr. 198) Mouse IgG1 K Isotope Control Biotin

Benötigte Materialien:

- gekoppelte Beads (siehe Kapitel XY)
- Waschpuffer (PBS + 0,1 % BSA)
- Magnetständer Falcons
- Magnetständer Epis
- Neubauer-Zählkammer
- iBidi-Slides

3.5.5 Anreicherung EpCAM mit MACS-Miltenyi-Prinzip

Die Anreicherung nach dem MACS-Miltenyi-Prinzip sieht die Durchführung auf Eis vor. Im ersten Schritt wird die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension anschließend für 10 Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet in 300 µl Waschpuffer resuspendiert. Im Anschluss werden 100 µl CD326 (EpCAM) Microbeads von MACS Miltenyi hinzugegeben und gut durchmischt, bis sie für 30 Minuten bei 4-8°C inkubiert werden. Für die Negativkontrolle werden in diesem Fall HA-Beads verwendet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 5-10 ml Waschpuffer hinzugegeben und für 10 Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Zellpellet in einem Waschpuffervolumen von 500 µl resuspendiert.

Für die darauffolgende magnetische Separation werden die LS-Säulen von MACS verwendet, die für eine maximale Anzahl von 10^8 gelabelten Zellen bzw. für eine 2×10^9 Gesamtzellzahl verwendbar sind. Um einem Verstopfen der Säulen durch verklumpte Zellen vorzubeugen, werden diese zur Herstellung einer Einzelzellsuspension durch 30 µm Nylon-Maschen gefiltert. Nach Platzierung der Säulen im Magnetständer und Äquilibrieren, wird die Zellsuspension auf die Säulen gegeben und der Durchfluss aufgefangen. In vier aufeinanderfolgenden Waschschritten werden die Säulen mit je 3 ml Waschpuffer gewaschen. Dabei soll darauf geachtet werden, dass der Waschpuffer erst wieder nachgegeben wird, sobald die Säulen leergelaufen sind. Auch während dieser Waschschrritte wird der Durchfluss aufgefangen, der in diesem Fall die ungelabelte Zellfraktion beinhaltet. Die Säulen werden aus dem Magnetständer entfernt und auf ein Collection Tube gestellt. Durch Zugabe von 5 ml Waschpuffer und kräftiges Drücken des Plungers in die Säule, werden die magnetischen, gelabelten Zellen aus der Säule herausgelöst. Diese werden am Ende erneut zentrifugiert (10 Minuten bei 300 xg) und in 1 ml Waschpuffer resuspendiert, bis sie ein letztes Mal zentrifugiert (10 Minuten bei 300 xg) und in einem Endvolumen von 100-200 µl Waschpuffer aufgenommen und in Slides überführt werden.

Benötigte Materialien:

- Waschpuffer (0,5 % BSA, 2 mM EDTA ad 150 ml PBS)
- CD326 (EpCAM) Microbeads von MACS Miltenyi
- HA Beads
- LS-Säulen
- 30 µm Nylon-Maschen Filter
- Magnetischer Separator
- Plunger, Collection tube
- Mikroskopie-Slide

3.5.6 Anreicherung mit wieder ablösbaren Beads (Flow Comp Dynabeads Flexi-Kit)

Die Anreicherung von Zellen mit den Beads aus dem Flow Comp Dynabeads Flexi Kit ermöglicht es, die Zellen nach der magnetischen Separation wieder von den Beads abzulösen, um damit einerseits ein besseres Ergebnis bei der Immunfluoreszenzfärbung zu erreichen und andererseits die isolierten Zellen zur weiteren Kultivierung zu nutzen. Vor der Anreicherung erfolgt in einem ersten Schritt das Antikörper-Labeling und im nächsten Schritt erfolgt die Isolation.

Antikörper-Labeling

Zunächst werden 100 µl des Antikörpers (0,5 mg/ml) in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 10 µl 1 M NaHCO₃ hinzugegeben. Das DSB-X-Reagenz wird nach Herstellerangaben mit DMSO versetzt und ist damit einsatzbereit. Von diesem angesetzten DSB-X-Reagenz werden 1 µl zur Antikörper-Lösung gegeben und alles wird innerhalb von 60-90 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur in einem Überkopf-Schüttler gemischt. In der Zwischenzeit wird die Spinsäule in 13x100 mm großen Glasgefäß platziert und das Aufreinigungsharz (purification resin) bis zum erforderlichen Volumen aufgefüllt (etwa 1,5 ml). Die Spinsäule wird in ein Auffanggefäß gesetzt und für 3 Minuten bei 1 100 xg in einem Schwingrotor zentrifugiert. Im Anschluss wird etwa 150 µl des Reaktionsmixes auf die Mitte der Spinsäule gegeben und so lange gewartet, bis es ins Gel absorbiert ist. Die Spinsäule wird in ein neues Auffanggefäß gesetzt und für 5 Minuten bei 1 100 xg in einem Schwingrotor zentrifugiert.

Benötigte Materialien:

- CD326 purified
- DSB-X-Reagenz
- DMSO
- 1 M NaHCO₃
- Flow Comp Dynabeads Flexi-Kit (Reaktionsgefäß, Spinsäule, Glass-Gefäß, Auffang-Gefäß, Aufreinigungsharz)
- Überkopfschüttler

Isolation

Die Isolation erfolgt bis auf die Schritte der magnetischen Separation auf Eis. Vor Beginn der Isolation werden die Dynabeads gewaschen, indem diese zunächst 30 Sekunden lang resuspendiert bzw. gevortext werden. Es werden pro Waschung 500 µl Beads in ein Epi überführt und die gleiche Menge Isolationspuffer hinzugefügt. Nach einer magnetischen Separation von einer Minute wird der Überstand entfernt und die gleiche Menge des Isolationspuffers wieder hinzugefügt. Die Beads sind nach dem Waschen einsatzbereit. Für die Isolation zu einem Volumen von 500 µl Zellsuspension wurden 25 µl des DSB-X-gelabelten Antikörpers hinzugefügt und 2-3 Sekunden gevortext. Anschließend wird dieser Mix 10 Minuten auf Eis inkubiert, bis 2 ml von kaltem Isolationspuffer zum Waschen hinzugefügt werden. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 350 xg. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet in 1 ml Isolationspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 75 µl Dynabeads wird der Mix für 2-3 Sekunden gevortext und für 15 Minuten im Überkopfschüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird erneut 1 ml Isolationspuffer hinzugegeben und der Mix 2-3-mal auf- und abpipettiert. Es folgt eine magnetische Separation für 2 Minuten, bis der Überstand vorsichtig entfernt wird und der Waschvorgang mit 1 ml Isolationspuffer weitere zweimal wiederholt wird. Beim letzten Waschschrift wird der Mix aus Zellen und Beads in 1 ml Releasepuffer resuspendiert und auf dem Überkopfschüttler 10 Minuten lang inkubiert. Im Anschluss wird der Mix 10-mal auf- und abpipettiert und für 1 Minute in den Magnetständer gestellt. Während des Auf- und Abpipettierens sollen Blasenbildungen verhindert werden. Nach Vollendung der magnetischen Separation wird der Überstand abgenommen und in ein sauberes Epi überführt. Dieser Überstand mit den abgelösten Zellen nochmals für 1 Minute in den Magnetständer gestellt, um Verunreinigungen durch Beads zu minimieren. Die Zellen werden zur Auswertung in Zellkulturslides überführt oder weiterverwendet für das Färbeprotokoll (siehe Abschnitt 3.5.7).

Benötigte Materialien:

- Zellen
- DSB-X-CD326 gelabelter Antikörper
- Dynabeads
- Isolationspuffer (0,1 % BSA, 2 mM EDTA ad 150 ml PBS)
- Flow Comp Dynabeads Flexi-Kit
- Überkopfschüttler

- Magnetständer Falcon
- Magnetständer Epi

3.5.7 Färbeprotokoll für die Isolation mit DSB-X

Nach Vollendung der Isolation werden die Zellen für den Färbeprozess vorbereitet. Dafür werden die Zellen für 10 Minuten bei 400 xg zentrifugiert und der Release-Puffer im Überstand entnommen. Die Zellen werden in 1 ml DSB-X-Isolationspuffer resuspendiert und mit 10 µl CD45-FITC-Antikörper für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift werden die Zellen nach der Zentrifugation in 200 µl PBS resuspendiert und in einen iBidi-Slide überführt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt im Cytospin für 10 Minuten und 1 500 rpm. Im Anschluss werden die Zellen mit 4 % PFA und einer Inkubationszeit von 15 Minuten fixiert und folglich drei Mal mit PBS gewaschen. Als nächstes erfolgt die Permeabilisierung der Zellen für 3 Minuten mit 0,2 % Triton X-100 in PBS und ein erneuter Waschschrift mit drei Wiederholungen, bevor eine 30-minütige Inkubation mit 0,5 % BSA in PBS als Blocking-Schritt folgt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Blocking-Lösung vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und 200 µl pan-Cytokeratin-PE-Antikörperlösung zur Inkubation über Nacht bei 4°C im Dunkeln hinzugefügt. Am nächsten Tag werden die Zellen erneut drei Mal gewaschen und mit Hoechst für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt. Als letzter Schritt vor der Auswertung müssen die Zellen nochmals dreimal gewaschen werden.

Benötigte Materialien:

- PBS
- DSB-X-Isolationspuffer
- 4 % PFA
- 0,2 % Triton X-100 in PBS
- 0,5 % BSA in PBS
- Antikörper: CD45-FITC, pan-Cytokeratin-PE, Hoechst

3.5.8 Isolation mittels PluriSelect

Die Isolation von gespikten Zellen in Medium und Blutproben eines gesunden Donors wird bis auf die folglich aufgeführten Änderungen nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu den veränderten Protokollbedingungen zählen die Verlängerung der Inkubationszeit auf 1 Stunde und die Ablösung der Rotation während der Inkubationszeit auf das Invertieren der Probe.

Benötigte Materialien:

- pluriSelect Kit mit CD326-AK

3.5.9 Exosomen Isolation

Zellenvorbereitung für die Exosomen-Isolation

Für die Exosomen-Isolation gibt es zwei Möglichkeiten, Zellen für die Isolation vorzubereiten. Entweder werden Zellen frisch ausgesät, mit dem CD63-Plasmid transfiziert und für etwa 1,5 Tage inkubiert, wobei am Abend vor dem Isolationstag das Kulturmedium durch Medium ohne zusätzliches FCS ersetzt wird. FCS enthält ein hohes Level an Exosomen, sodass die Verwendung von FCS-freiem Medium optimal wäre! Die andere Option der Zellvorbereitung für die Isolation stellt die Herstellung von stabil transfizierten Zellen mit Selektion mittels Puromycin dar. Durch das Einbringen eines CD63-Plasmids in Kombination mit einem pPGK-Puro-Plasmid in die Zelle (Transfektion mit Lipofectamin 2000 oder JetPrime) kann die Selektion durch die Puromycin-Behandlung nach 24 Stunden erfolgen. Die Konzentration von Puromycin kann je nach Proliferationsverhalten der Zellen angepasst werden.

Die Transfektion mit den Reagenzien Lipofectamin 2000 und JetPrime wird jeweils mit 15 µg DNA (zusammengesetzt aus 13,5 µg CD63emGFP und 1,5 µg pPGK-Puro) durchgeführt. Erläuterung zu Transfektion mit Lipofectamin 2000 und JetPrime siehe Abschnitt 3.4.4. Nach 6 – 8 Stunden wird das Medium gewechselt und nach 24 Stunden wird mit der Selektion mittels Puromycin begonnen.

3.5.9.1 Exosomenfällung

Nach dem Mediumwechsel am Vorabend wird am Tag der Isolation das Zellkulturmedium gesammelt und für 30 Minuten bei 2000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Gefäß überführt und das Reagenz aus dem Invitrogen Kit (Invitrogen Cat. Nr. 4478359) nach Herstellerangaben hinzugefügt,

gevoertext und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Probe für 1 Stunde bei 10 000 xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Exosomen befinden sich im Pellet und sind je nach Menge meist nicht sichtbar. Das Pellet wird in PBS resuspendiert. Das PBS-Volumen richtet sich dabei nach dem zuvor gestarteten Zellkulturmedium-Volumen. Sobald das Exosomenpellet resuspendiert vorliegt, kann es analysiert werden und zur Lagerung für etwa eine Woche bei 4°C oder zur Langzeitaufbewahrung bei unter -20°C aufbewahrt werden.

3.5.9.2 Säulenisolation der Exosomen

Die Zellen werden wie in Abschnitt 3.5.9 beschrieben für die Exosomenisolation vorbereitet. Nach etwa 1,5 Tagen Inkubation wird das Zellkulturmedium gesammelt und in zwei Schritten zentrifugiert. Zunächst erfolgt die Zentrifugation für 10 Minuten bei 1 500 xg und anschließend für 10 Minuten bei 3 000 xg. Der Überstand wird abgenommen und nach dem Protokoll der Herstellerangaben über die iZON-Säulen isoliert.

Benötigte Materialien:

- Transfizierte/stabile Zellen
- iZON-Säulen Kit

3.5.9.3 Isolation mittels Ultrazentrifugation

Die Zellen werden wie in Abschnitt 3.5.9 beschrieben für die Exosomenisolation vorbereitet. Das Zellkulturmedium wird in zwei Schritten zentrifugiert. Der erste Zentrifugationsschritt wird für 10 Minuten bei 500 xg durchgeführt. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und anschließend für weitere 20 Minuten bei 3 000 xg zentrifugiert. An diesem Punkt könnte man die Probe bei -80°C lagern. Zusätzlich beginnt ab diesem Schritt des Protokolls die Verwendung der Ultrazentrifuge bei einer deutlich höheren Drehzahl, sodass die Proben vor Überführung in die Ultrazentrifuge auf einer Feinwaage auf $\pm 0,01$ g ausbalanciert werden, um eine Umwucht zu verhindern. Nach Überführung des Überstandes in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen (UZ-Röhrchen) erfolgt eine Zentrifugation für 20 Minuten und 12 000 xg. Der Überstand wird erneut in ein neues UZ-Röhrchen überführt und für 90 Minuten bei 100 000 xg mit dem Schwingrotor zentrifugiert. Nun wird der Überstand entfernt und das Pellet mit 30 ml PBS resuspendiert und weitere 90 Minuten bei 100 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird erneut entfernt und das Pellet

in 200 µl PBS (bzw. mit einem für das Experiment benötigten Volumen) resuspendiert und in ein neues Gefäß überführt, in dem es bei -20°C für die Kurzzeitlagerung bzw. bei -80°C für die Langzeitlagerung aufbewahrt wird. Bei einem größeren Endvolumen wird die Exosomen-Suspension aliquotiert eingefroren, da wiederholtes Auftauen die Exosomen verklumpen lässt.

Benötigte Materialien:

- Transfizierte/stabile Zellen
- PBS
- UZ-Röhrchen
- Schwingrotor JS 24.38

3.6 Biochemische Analysen

3.6.1 Cell Titer Glo Assay

Für die Cell Titer Glo Messung werden die Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät, bei erforderlicher Konfluenz transfiziert und anschließend für die Cell Titer Glo Assay Messung verwendet. Das Reagenz für das Cell Titer Glo Assay wird bei -20°C gelagert und muss vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Zu jedem Loch in der 96-Lochplatte wird eine dem Mediumvolumen entsprechende Menge an Cell Titer Glo Reagenz hinzugefügt (Mediummenge = Menge an Cell Titer Glo Reagenz) und für 2 Minuten auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgt eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden je 150 µl in eine weiße 96-Lochplatte umpipettiert und mit dem Luminometer gemessen. Die Integrationszeit beträgt dabei 0,25-1 Sekunde pro Loch.

3.6.2 Alamar Blue

Alamar Blue ist ein Reagenz, basierend auf einer Resazurin-Lösung, zur Messung der Zellviabilität, das als gesundheitlicher Indikator der Zellen fungiert und mit der Zeit reduziert wird, sodass eine quantitative Messung der Viabilität ermöglicht wird. Der aktive Bestandteil des Alamar Blue-Reagenz, Resazurin, ist nicht toxisch, zellpermeabel, farblich blau und nahezu fluoreszenzlos. Bei Eintritt in die Zelle wird Resazurin zu Resorufin reduziert, welches eine rötliche Färbung aufzeigt und höchst fluoreszent ist. Durch diesen

Reduktionsprozess können Veränderungen in der Viabilität der Zellen unkompliziert mittels Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen detektiert werden.

Das Reagenz wird nach Herstellerangaben im Rahmen eines Medienwechsels in einer 10%igen Endkonzentration verwendet. Nach durchgeführter Messung wird das Reagenz über einen erneuten Medienwechsel entfernt.

3.6.3 Life/Dead - Viability/Cytotoxicity-Kit

Das Prinzip der Methode des Life/Dead - Viability/Cytotoxicity-Kits basiert auf der intrazellulären Esterase-Aktivität in lebenden Zellen. Dabei erfolgt die enzymatische Umwandlung des nicht-fluoreszierenden, zellpermanenten Calcein AM zu intensiv fluoreszierendem Calcein. Für die Färbung von toten Zellen wird das Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) verwendet, welches in Zellen mit geschädigter Zellmembran eintritt und die Fluoreszenz um das 40-Fache bei Bindung an die DNA steigert. Lebendige Zellen mit einer intakten Zellmembran zeigen keine Färbung mit dem EthD-1 auf. Zudem ist die Hintergrundfluoreszenz bei der Verwendung dieser Chemikalien sehr gering, da die Fluoreszenz erst bei Interaktion mit der Zelle eintritt.

Zu Beginn der Durchführung werden die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Für die Färbung der toten Zellen, wird nach Abtöten der Zellen mit 70 % Ethanol bei 30-minütiger Inkubation, die zu verwendende Konzentration von EthD-1 auf 1 μM bestimmt. Mit dieser Vorabbestimmung soll eine Färbung ausschließlich an den Nukleoli erzielt werden. Bei der Bestimmung der Calcein AM-Konzentration wird eine fehlende Fluoreszenz in der Probe mit den toten Zellen bzw. eine ausreichende Fluoreszenz in der Probe der lebenden Zellen erzielt und wird in diesem Fall auf 0,5 μM festgesetzt. Die Zellen werden in Slides in der gewünschten Verdünnung ausgesät und am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen der Chemikalien behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 – 40 Minuten bei Raumtemperatur können die Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Benötigte Materialien

- Life/Dead - Viability/Cytotoxicity-Kit

4. Ergebnisse

4.1 Die nukleoläre Lokalisation von NPM wird durch Veränderungen im N-Terminus beeinträchtigt

Die bisherigen Arbeiten der Forschungsgruppe zeigten eine Bindung von NPM mit der onkologisch relevanten Protease Taspase1 sowie die Regulation der subzellulären Lokalisation und proteolytischen Aktivität [21, 24, 29]. Um den molekularen Mechanismus, die Interaktion und Regulation der beiden Proteine zueinander im Detail zu verstehen, wurden zunächst verschiedene Deletions- und Lokalisationsmutanten von NPM1 generiert. Die Deletionsmutanten umfassen Deletionen von verschiedenen funktionalen Domänen im N-terminalen und C-terminalen Bereich. Eine detaillierte Darstellung über das Vorhandensein bzw. Fehlen bestimmter funktionaler Domänen im Vergleich zu NPM1 innerhalb der sechs generierten Deletionsmutanten ist Abbildungen 7A und 7B zu entnehmen. Die Lokalisationsmutanten umfassen Mutationen im Bereich der Lokalisationssignale des nukleären Exports bzw. nukleären Imports. Zu diesem Zweck wurden innerhalb der Aminosäuresequenz der biologisch aktiven Lokalisationssignale bestimmte Aminosäuren ausgetauscht und somit inaktiviert. Die Inaktivierung des NES wird durch den Austausch folgender Aminosäuren ⁴²ASARTVSA⁴⁹ (ausgetauschte Aminosäuren in fett) erzielt. Die Mutationen des NLS umfassen den Austausch folgender Aminosäuren aa¹⁴¹KRSAPGGGSKVPQA¹⁵⁷ (ausgetauschte Aminosäuren in fett).

Mit Hilfe einer Fusion dieser generierten Mutanten mit dem GFP-Protein konnte anhand einer fluoreszenz-basierten Mikroskopieanalyse die subzelluläre Lokalisation überprüft werden. Die Lokalisation aller generierten Mutanten weicht von der bevorzugt nukleolären Akkumulation des wt-Proteins ab (Abbildung 7C). Im Vergleich zu den C-terminalen Mutanten aa1-117 und aa1-186, die innerhalb des nukleolären Kompartiments mit einer geringen Fraktion im Nukleo- sowie Zytoplasma lokalisiert sind, sind N-terminale Mutanten wie aa106-294 und aa118-294 im Nukleus mit fehlender nukleolärer Akkumulation lokalisiert. Die kurze Mutante aa260-294 ist bis auf die nukleoläre Akkumulation in der gesamten Zelle lokalisiert. Ähnlich zu der Lokalisation der N-terminalen Mutanten verhält sich die NES-Mutante, die ausschließlich im Nukleoplasma nachzuweisen ist (Abbildung 7C). Zwei weitere Mutanten (aa187-294 und NLS-Mutante, Abbildung 7C und 7E) zeigen eine dominierende Lokalisation im Zytoplasma sowie eine nukleoläre Akkumulation mit einem geringen Anteil im Nukleoplasma und bilden so eine gemischte Form der C-terminalen und N-terminalen Mutanten. Interessanterweise ist bis auf die beiden Mutanten aa187-294 und NLS-Mut keine der Mutanten, die das nukleoläre Lokalisationssignal im C-terminalen Bereich beinhalten, in der Lage, tatsächlich an den Nukleoli zu lokalisieren. Zusammenfassend kann man erkennen,

dass eine Veränderung innerhalb von ± 100 aa im N-Terminus zu einer Beeinträchtigung der nukleolären Lokalisation der NPM-Varianten führt.

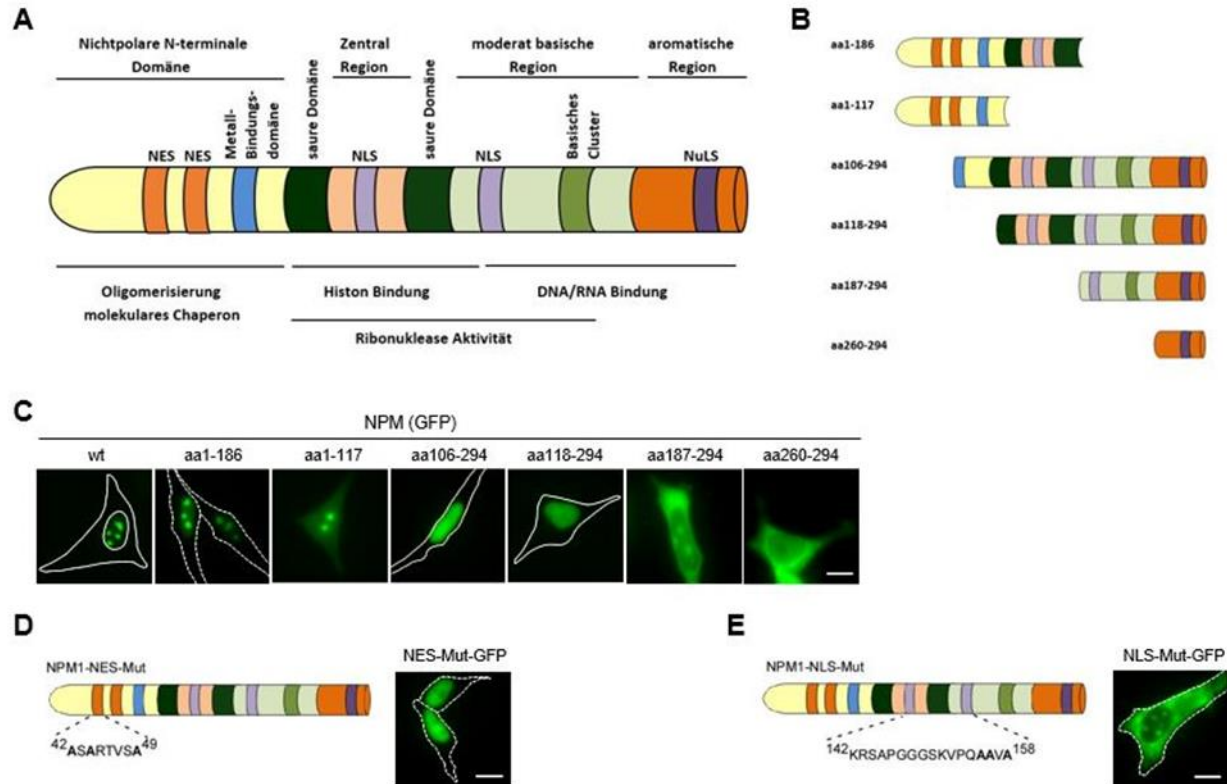


Abbildung 7: Darstellung der funktionellen Domänen von NPM1 und den erstellten NPM1-Mutanten

A Schematische Darstellung der wichtigsten funktionellen Domänen und der Lokalisationssignale von NPM1wt. Zum Vergleich wird die schematische Darstellung auf die Deletionsmutanten von NPM1 (**B**) mit den dazugehörigen intrazellulären Lokalisationen der GFP-markierten NPM1-Mutanten als immunfluoreszenz-basierte Aufnahmen aufgezeigt (**C**). Diese Art der Darstellung wird ebenfalls für die Lokalisationsmutante, die das NES (**D**) und das NLS (**E**) betrifft, übernommen. Maßstabsbalken 10 μ m.

4.2 Die Aktivität von NPM wird durch die Oligomerisationsdomäne gesteuert

Für die Aktivität innerhalb der Zelle und dementsprechend auch für die Interaktion mit anderen Proteinen wird anhand der N-terminalen Oligomerisationsdomäne die Funktion von NPM1 durch die Formation von Pentameren sichergestellt [60]. Um eine Beeinflussung dieser Oligomerformation von endogenem NPM1

durch die überexprimierten NPM1-Mutanten auf ihre zelluläre Lokalisation ausschließen zu können, wurden die Lokalisationsstudien ebenfalls mit NPM1 *knockdown* Zellen durchgeführt. Die Lokalisationen der NPM1-Mutanten sind durch den *knockdown* des endogenen NPM1 nicht signifikant verändert (Abbildung 8A). Zudem wurde die Formationsausbildung der NPM1-Mutanten mit fehlender Oligomerisationsdomäne (aa106-294 und aa118-294) mittels Immunpräzipitation untersucht. Diese Mutanten liegen ausschließlich als Monomere vor und sind nicht in der Lage, Oligomere mit dem endogenen NPM1 auszubilden (Abbildung 8D). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein NPM1-Oligomer-Inhibitor namens NSC348884 verwendet, um die Oligomerisationsdomäne von NPM1 zu inhibieren. Der Nachweis über die Inhibition der Oligomerformation erfolgte mittels nativer Western-Blot-Analyse (Abbildung 8E).

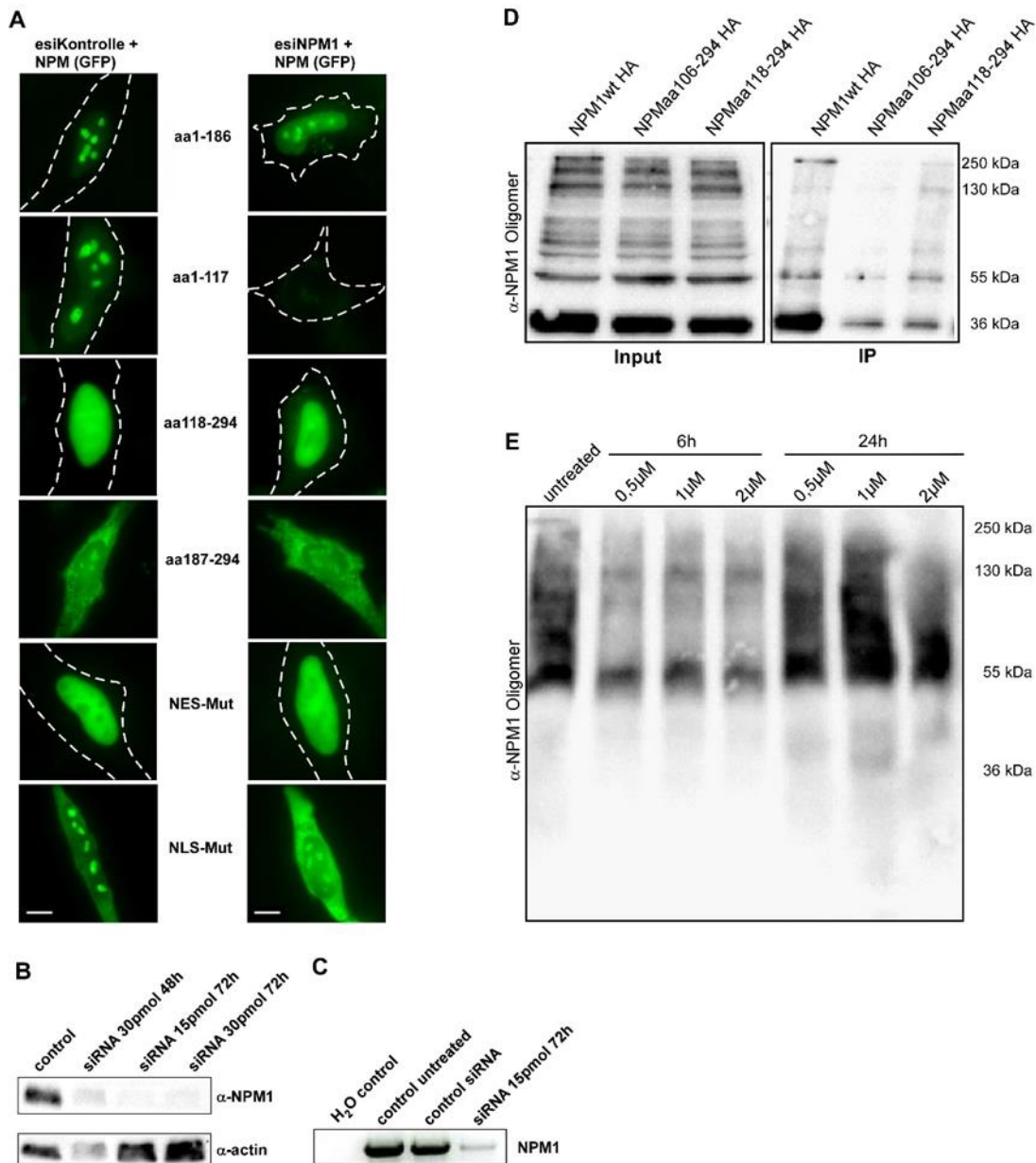


Abbildung 8: Auswirkungen des endogenen NPM1 und der Oligomerisationsfähigkeit auf die Lokalisation der NPM-Deletions- und Lokalisationsmutanten

A Transfektion von esiKontrolle-RNA (linke Spalte) und esiNPM1-RNA (rechte Spalte) zum NPM-*knockdown* für 72 h mit anschließender Transfektion der GFP-markierten NPM-Mutanten. NPM *knockdown*-Nachweis auf Protein- (**B**) und RNA-Ebene (**C**) erfolgte in 293T-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen und der angegebenen Inkubations-Zeitspanne. Die Fähigkeit zur Oligomerisierung wird mittels Immunpräzipitation und dem anti-NPM1-Oligomer-Antikörper dargestellt (**D**). Wirkungsraster des NPM-Inhibitors NSC348884 wird anhand unterschiedlicher Konzentrationen und Inkubationszeiten in einer nativen PAGE dargestellt (**E**). Maßstabsbalken 10 µm.

4.3 Mutationen im N-Terminus von NPM beeinflussen die nukleoläre Struktur

Die Expressionsanalysen der Deletionsmutante aa187-294 sowie der Lokalisationsmutanten NES-Mut und NLS-Mut zeigten eine Störung der nukleolären Struktur mit unterschiedlichen Phänotypen. Die Nukleoli dieser Mutanten sahen verlängert, gestört in ihrer Form und sogar teilweise aufgelöst aus (Abbildung 9A). Eine ähnliche Wirkung hatte die Verwendung des NPM-Inhibitors NSC348884 auf die Nukleoli (Anhang I). Mittels eines mikroskopiebasierten Hochdurchsatz-Bildgebungsverfahrens (Cellomics Plattform) konnte ein quantifizierter Nachweis durch multizelluläre Analysen für die Störung der Nukleoli-Struktur besonders für die Deletionsmutante erbracht werden (Abbildung 9B). Es wird beschrieben, dass eine (partielle) Reduktion des NPM1-Levels in normalen wie auch in Krebszellen zu einer zerstörten nukleolären Struktur führt [100]. Diese Beobachtung konnte anhand weiterer Analysen mit NPM1 *knockdown* Zellen bestätigt werden. Diese Zellen zeigten ebenfalls eine zerstörte nukleoläre Struktur (Abbildung 9C). Zudem wird vermutet, dass NPM1-defiziente Zellen eine Veränderung der runden Nukleoli-Struktur aufgrund einer Reorganisation des perinukleären Heterochromatins aufweisen könnten [100]. Um den Verlust der nukleolären Integrität zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit Fibrillarin (Abbildung 9D), einem speziellen Marker-Protein für die nukleoläre DFC (*dense fibrillar components*) Region, und dem Heterochromatin-Marker H3K9me3 (Abbildung 9E), den man innerhalb der Nukleoli nachweisen kann, durchgeführt. Beide Marker bestätigten den strukturellen Zerfall der Nukleoli, wie bereits in den vorangehenden Ergebnissen der Expressionsanalysen von NPM1-Mutanten und den Zellen mit NPM1 *knockdown* beschrieben (Abbildung 9F).

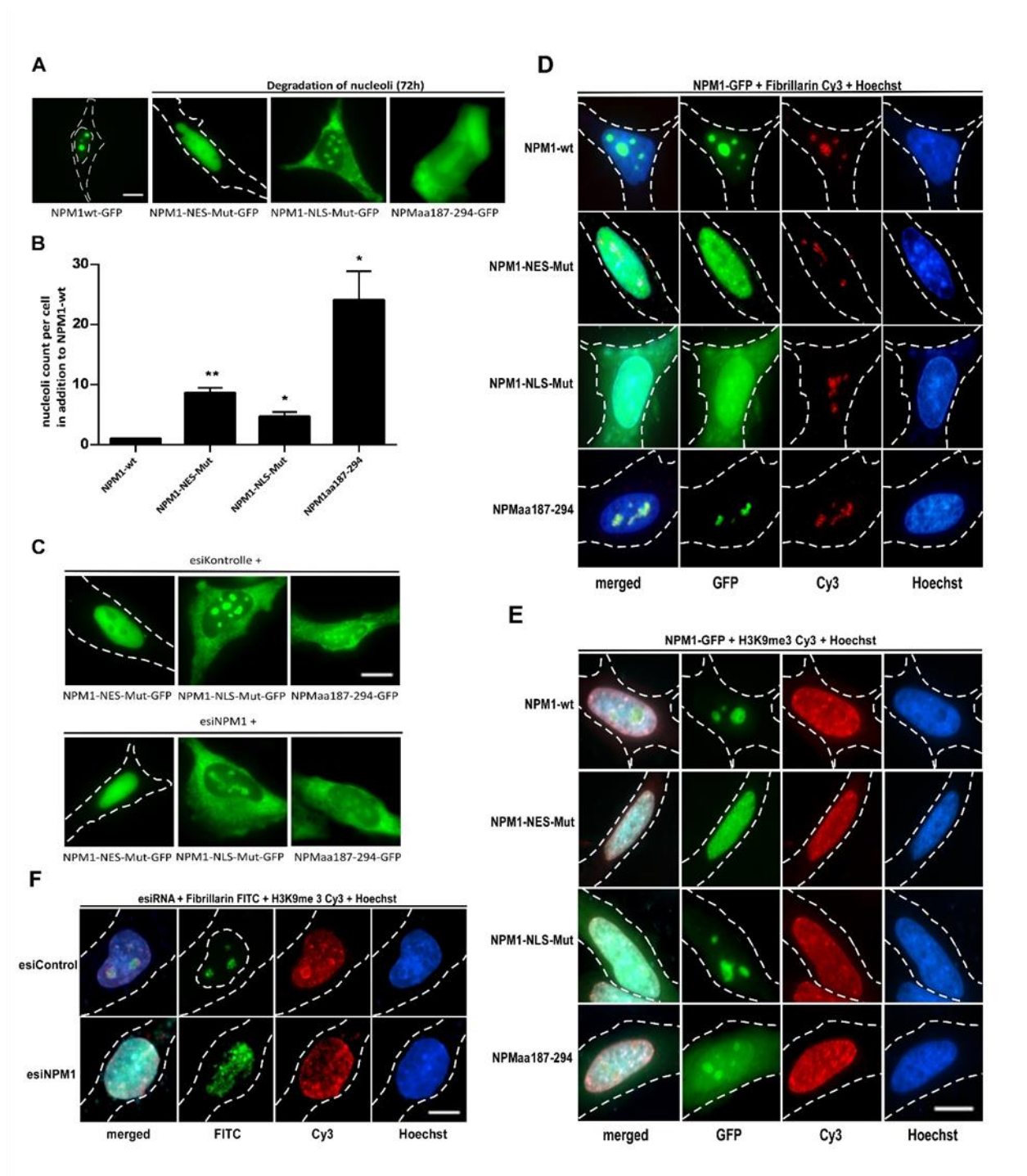


Abbildung 9: Degradation der Nukleoli in bestimmten NPM-Mutanten

Die Degradation der Nukleoli dargestellt als qualitative immunfluoreszenzbasierte Zellaufnahme von HeLa-Zellen (**A**) und quantitative Auswertung per MicroArray (**B**). Ein Vergleich des Nukleoli-Zerfalls wurde mit NPM1 *knockdown*-Zellen durchgeführt (**C**) und anschließend für die Untersuchung der nukleären Struktur immunohistochemisch mit Fibrillarin Cy3 (**D+F**) und H3K9me3 Cy3 (**E**) gefärbt. Maßstabsbalken 10 μ m.

Eine Actinomycin-D-induzierte Auflösung der Nukleoli bekräftigte die vorangehenden Beobachtungen. Eine Induktion von 5 nM Actinomycin-D für 4 Stunden reichte aus, um eine schrittweise Auflösung der Nukleoli-Struktur zu erzielen und diese anhand der Fibrillarin-Färbung zu bestätigen (Abbildung 10A). Der Effekt der Nukleoli-Auflösung ist durch die Aufhebung der Actinomycin-D-Induktion reversibel, sodass aufgelöst erscheinende Nukleoli nach etwa 3,5 Stunden ihre ursprüngliche Größe erreichten (Abbildung 10B). Eine wiederkehrende Auflösung der Nukleoli und die Translokation von NPM in das Nukleoplasma konnten in einzelnen Zellen 24 Stunden nach dem durchgeführten Mediumwechsel festgestellt werden (Abbildung 10C). Diese Ergebnisse deuten auf einen negativen *trans*-dominanten Effekt der analysierten Mutanten hin.

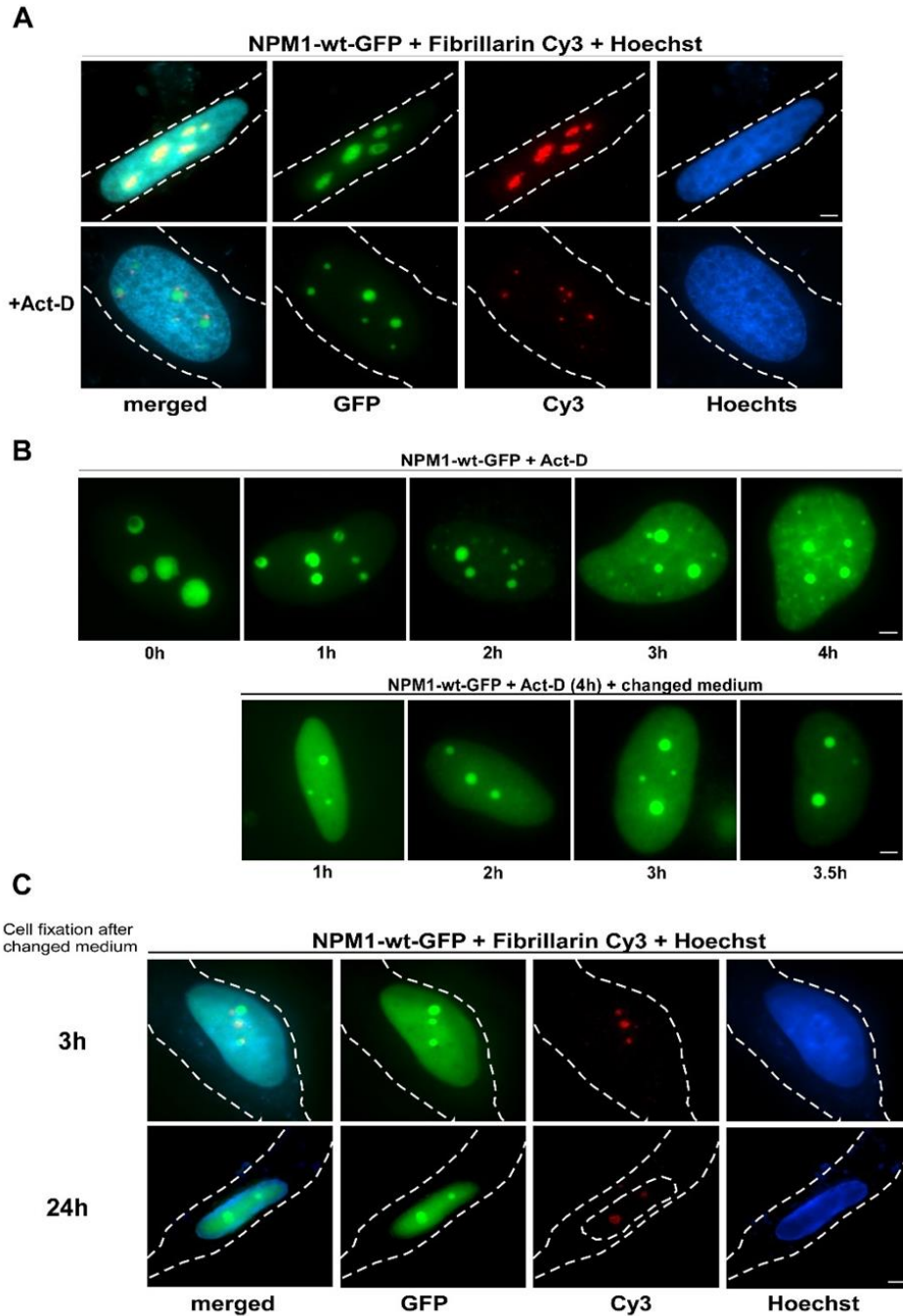


Abbildung 10: Nachbildung der Nukleoli-Degradation mittels Actinomycin-D

Darstellung immunhistochemisch gefärbter HeLa-Zellen mit Fibrillarin Cy3 und Hoechst nach einer Transfektion von NPM1wt-GFP und der Zugabe von Actinomycin-D 5 μ M im Vergleich zu Zellen ohne die Zugabe von Actinomycin-D (A). Die Kinetik des Nukleolizerfalls nach Zugabe von Act-D ist bis zu 4 Stunden und die Wiederherstellung nach Medienwechsel bis zu 3,5 h aufgezeigt (B). Darstellung fixierter Zellen nach Medienwechsel und zwei verschiedenen Zeitpunkten (3 und 24 h), sowie Fibrillarin Cy3-Färbung. Maßstabsbalken 1 μ m.

4.4 Die Interaktion von NPM1 mit Taspase1 wird anhand der N-terminalen Oligomerisations-/Chaperon-Domäne gesteuert

Die Bestimmung der Interaktionsdomäne von NPM1 und Taspase1 erfolgte mittels Ko-Expressionsstudien der generierten NPM1-Deletionsmutanten mit dem Taspase1-Fusionsprotein. Basierend auf dieser Untersuchung gilt die bereits beschriebene Tatsache, dass Taspase1 den Zugang zum Nukleus und den Nukleoli durch den Importin- α /NPM1-basierten Translokationsmechanismus erhält [29]. Die Ko-Expressionsstudien zeigten bemerkenswerterweise keine signifikante Veränderung der spezifischen Taspase1-nukleären/nukleolären Lokalisation nach der Ko-Expression mit den NPM1-Mutanten (Abbildung 11A). Ebenso verhielten sich die NPM1-Mutanten, die ihre subzelluläre Lokalisation bei Ko-Expression mit Taspase1 nicht veränderten im Vergleich zu der alleinigen Expression in der Zelle (Abbildung 11D). Innerhalb der Untersuchungen konnte eine starke nukleoläre Ko-Lokalisation von Taspase1 mit den generierten NPM1-Varianten, N-terminale NPM1aa1-117 und NPM1-NLSmut, beobachtet werden.

Zudem wurde die Interaktion zwischen den generierten NPM1-Varianten und Taspase1 mittels Immunpräzipitation und Western Blot untersucht (Abbildung 11B und 11C). Die Ko-Immunpräzipitation von NPM1 und den NPM1-Varianten aa1-186, aa187-294 und NLSmut zeigte eine starke Interaktion mit Taspase1, wohingegen eine Interaktion der Varianten aa1-117 und aa118-294 mit Taspase1 deutlich reduziert war. Eine Interaktion von Taspase1 mit den NPM1-Varianten aa106-294, aa260-294 und NESmut konnte ausgeschlossen werden. Anhand dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass eine Mutation und ein Verlust innerhalb der N-terminalen Domäne und der ersten etwa 100 Basenpaaren von NPM1 zu einer Störung in der Interaktion mit Taspase1 führen. Die NPM1-Mutante aa1-117 zeigte eine reduzierte Interaktion mit Taspase1, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieser Bereich der N-terminalen Domäne zentral, aber nicht ausreichend für die NPM1-Taspase1-Interaktion ist. Um eine starke Interaktion dieser beiden Proteine zu erreichen, scheint zudem ein Teil innerhalb des C-Terminus (aa187-260) ebenfalls wichtig zu sein. Dieser Effekt konnte anhand der starken Interaktion von Taspase1 mit der NPM1 aa187-294-Mutante, aber der reduzierten oder ausgeschlossenen Interaktion von Taspase1 mit den NPM1-Varianten aa106-294, aa118-294 und aa260-294 gezeigt werden. Zudem wurde festgestellt, dass lediglich die kürzere C-terminale NPM1-Mutante aa187-294 eine starke Interaktion mit Taspase1 aufweist. In diesem Zusammenhang kann die Vermutung aufgestellt werden, dass negativ geladene Regionen in den Bereichen ~120-132aa und ~161-188aa eine Auswirkung auf die Interaktion haben. Zudem kann anhand

dieser Ergebnisse von einer bestimmten Form der Protein-Faltung ausgegangen werden, sodass die ersten ~100aa des N-Terminus und aa187-260 des C-Terminus von NPM1 entscheidend sind.

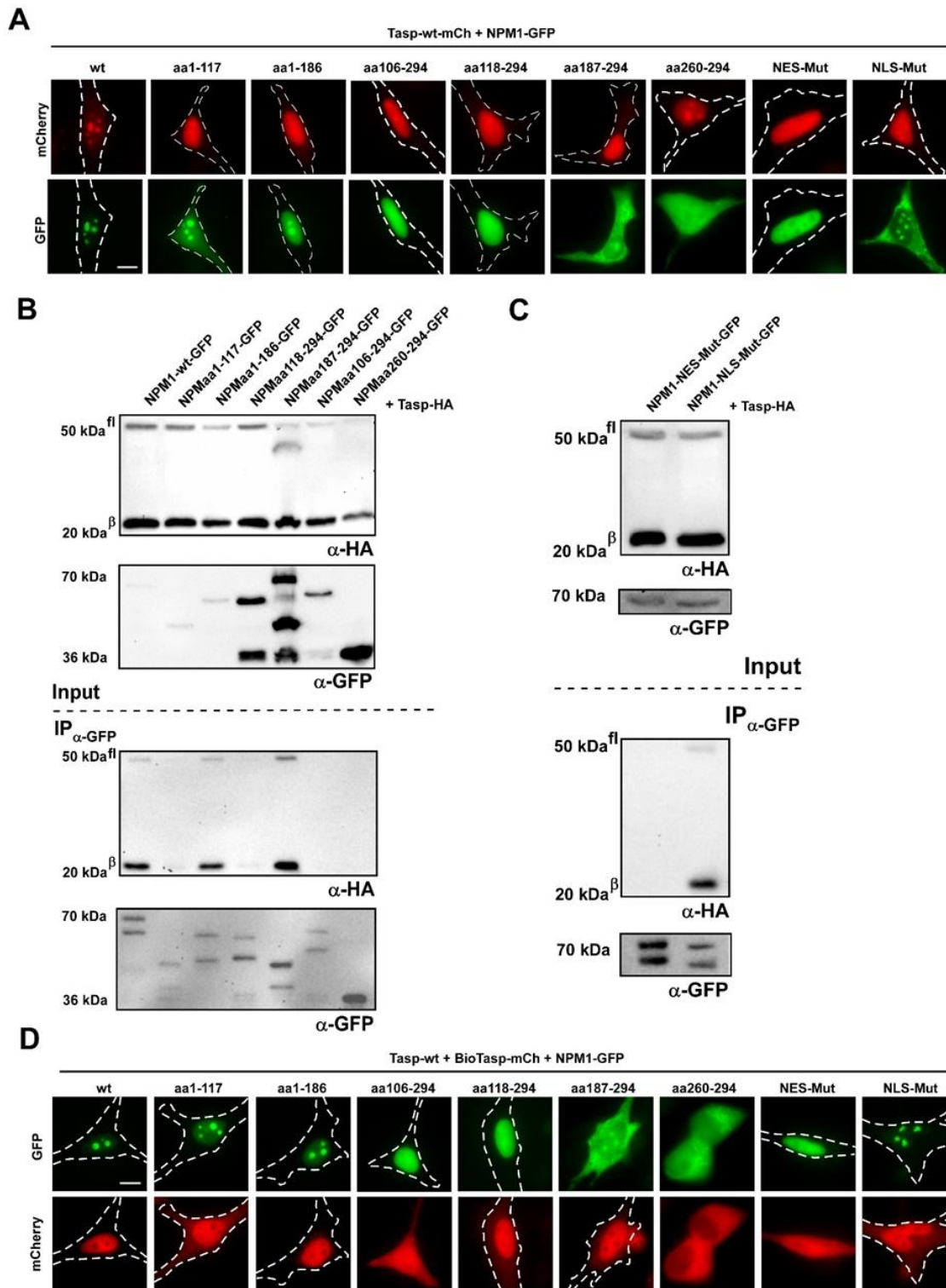


Abbildung 11: Darstellung von Taspase1-NPM-Mutanten-Interaktion

Immunfluoreszenzbasierte Aufnahmen von ko-transfizierten Taspase1-wt und NPM-Mutanten in HeLa-Zellen (A), sowie die entsprechenden Immunblots aufgeteilt nach NPM-Deletionsmutanten (B) und Lokalisationsmutanten (C). Eine Ko-Transfektion von drei Komponenten, bestehend aus Taspase1 wt, den NPM-Mutanten und dem Biosensor (D), wird ebenfalls in HeLa-Zellen immunfluoreszenzbasiert dargestellt. Maßstabsbalken 10 μ m.

4.5. Eingrenzung der Bindungsdomäne von Taspase1: Die Lokalisierungs- und Aktivitätsbereiche von Taspase1 sind in ihre Untereinheiten aufgeteilt

Die Domänenorganisation von Taspase1 ist nicht vollständig identifiziert worden, sodass bisher die beiden Untereinheiten α und β sowie das NLS bekannt sind. Vorherige Arbeiten der Gruppe haben gezeigt, dass eine Interaktion mit Taspase1 ausschließlich in Form einer aktiven Protease geschehen kann, die durch ein $\alpha\beta$ -Dimer gekennzeichnet wird {Bier, 2012 #78; Bier, 2011 #79}.

Um mehr Informationen über die Organisationsdomänen von Taspase1 zu erhalten, klonierten wir chimäre Konstrukte von Drosophila und menschlicher Taspase1, die in eine α - und eine β -Untereinheit unterteilt sind. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Protein-Alignment von Drosophila und humaner Taspase1 zwar nur 36 % Gesamt-Aminosäure-Identität ergab, die Region der autokatalytischen Spaltung jedoch vollständig konserviert ist (193LDTVGAV199), nur einige Nukleotide sind verändert (Abbildung 12A). Die vorhergesagte Sequenz konnte auch durch Klonierung von dTaspase1 aus Drosophila-Zellen verifiziert werden [152]. Drosophila Taspase1 stellt ein Volllängenprotein von 40 kDa dar, das die α -Untereinheit (20 kDa) und die β -Untereinheit (18 kDa) enthält, im Gegensatz zum menschlichen Taspase1-Protein, das ein Volllängenprotein von 50 kDa aufweist, das aus der α -Untereinheit (28 kDa) und der β -Untereinheit (22 kDa) besteht. In dieser Arbeit haben wir zwei chimäre Taspase1-Mutanten geschaffen: die erste Chimäre α -hTasp + β -dTasp, bestehend aus der menschlichen Taspase1' α -Untereinheit und der Drosophila Taspase1' β -Untereinheit, und die zweite Chimäre α -dTasp + β -hTasp, bestehend aus der Drosophila Taspase1' α -Untereinheit und der menschlichen Taspase1' β -Untereinheit. Beide Chimären wurden mit GFP markiert, um Immunoblot- und Lokalisierungsanalysen mittels Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen.

Separat klonierte humane Taspase1-Untereinheiten zeigen keine Interaktion mit endogenem NPM1 (Daten nicht gezeigt). Um weitere Informationen über den notwendigen Teil der Untereinheit zu erhalten, der für eine Interaktion mit endogenem NPM1 erforderlich ist, und um Hinweise auf die NPM1-Interaktionsdomäne von Taspase1 zu erhalten, führten wir eine Immunoblot-Analyse durch. Es konnte

keine Interaktion von Taspase1-Chimären mit endogenem NPM1 nachgewiesen werden (Abbildung 12B). Das Vorhandensein der Chimäre α -hTasp + β -dTasp konnte nicht nachgewiesen werden (unter Verwendung des α -GFP-Antikörpers), auch nicht die Interaktion mit endogenem NPM1, was auf die sehr geringe Expressionsrate zurückzuführen ist. Daher bestätigten wir den Protein-Nachweis auf Gel aller Konstrukte (Anhang II), so dass die Interaktion mit endogenem NPM1 von der Expressionsrate der Chimäre α -hTasp + β -dTasp abhängig sein könnte. Die Koexpressionsanalyse von GFP-markierten Taspase1-Chimären und NPM1-wt-blau fluoreszierendem Protein (BFP), die mittels fluoreszenzbasierter Mikroskopie durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls keine Translokation dieser Proteine (Abbildung 12C).

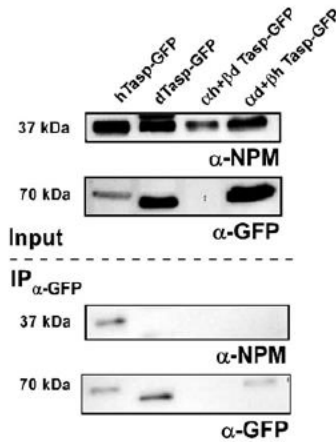
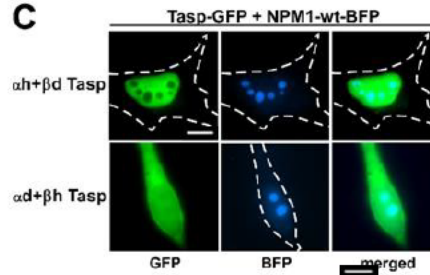
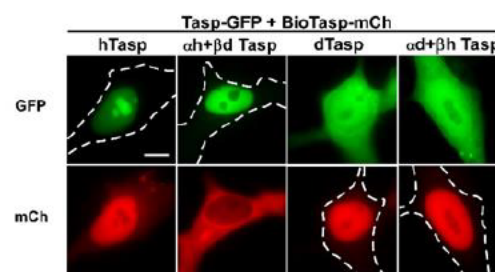
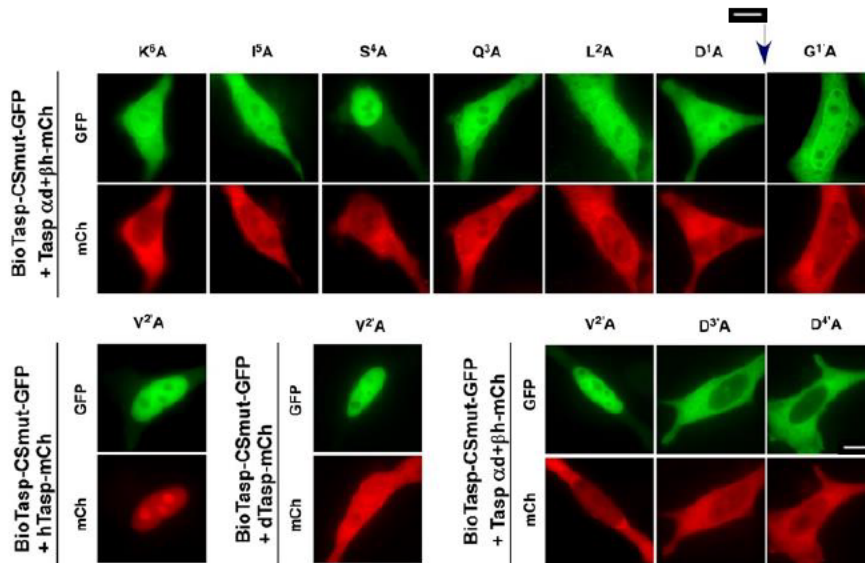
Um die Lokalisierung nachzuweisen und die Aktivität der Taspase1-Chimären in lebenden Zellen zu untersuchen, führten wir eine fluoreszenzbasierte Mikroskopieanalyse mit unserem Translokations-Biosensor-Assay (BioTasp) durch. Zunächst haben wir die GFP-markierten Chimäre in lebende Zellen transfiziert, um die Lokalisierung zu demonstrieren. Die Chimäre α -hTasp + β -dTasp lokalisiert sich vorwiegend im Nukleoplasma, ähnlich der Lokalisierung der menschlichen Taspase1 an den Nukleoli (Abbildung 12D). Im Gegensatz dazu lokalisiert die Chimäre α -dTasp + β -hTasp überwiegend im Zytoplasma und Nukleoplasma, genau wie die bekannte Lokalisierung von *Drosophila* Taspase1. Als Nächstes testeten wir die Aktivität durch Koexpression von BioTasp mCherry und GFP-markierter Chimäre α -dTasp + β -hTasp, was zu einer proteolytischen Spaltung der NES führt, die eine nukleäre Akkumulation des Biosensors, ausgelöst durch die NLS, bewirkt. Dieses Ergebnis entspricht der proteolytischen Spaltung von biologisch aktivem Wildtyp-*Drosophila* Taspase1 und Wildtyp-humanem Taspase1. Im Gegensatz dazu zeigt die Koexpression von BioTasp mCherry und der GFP-markierten Chimäre α -hTasp + β -dTasp keine proteolytische Aktivität, die durch die zytoplasmatische Lokalisierung des rot fluoreszierenden Biosensors erkennbar ist. Diese Ergebnisse geben neue Einblicke in die Organisation der Taspase1-Domäne und lassen den Schluss zu, dass die Lokalisierung der Taspase1-Chimären von der α -Untereinheit abhängig ist, im Gegensatz zur proteolytischen Aktivität, die von der β -Untereinheit abhängt.

Um mehr molekulare Details über die Reste zu erhalten, die für die trans-Spaltungsaktivität der proteolytisch aktiven Chimäre α -dTasp + β -hTasp wichtig sind, haben wir den Translokations-Biosensor-Assay verwendet und eine Alanin-Scanning-Mutagenese des Spaltstellenmotivs (Aminosäuren KISQLD↓GVDD) durchgeführt. Die Koexpression der mit rot fluoreszierendem Protein (mCherry) markierten Chimäre α -dTasp + β -hTasp und der mit GFP markierten BioTasp Alascan-Mutanten führte zu proteolytischer Spaltung und nukleärer Akkumulation der mutierten Reste S4A und V2'A (Abbildung 12E). Diese Reste wurden als nicht essentielle Reste in der Spaltstelle deklariert [21]. Die fehlende nukleäre Anreicherung des Biosensors der mutierten Reste Q3A, L2A, D1A und G1'A führte zur Bestätigung der

Konsensussequenz der trans-Spaltstelle für dTaspase1 (Q3[F/I/L/M]2D1↓G1'x2'x3') [21] und hTaspase1 (Q3[F,I,L,V]2D1↓G1'x2'x3'D4'/D3'x4') [25, 26]. In der Tat konnten diese Aminosäuren (Gln3, Leu2, Asp1 und Gly1') als essentiell für die proteolytische Aktivität der Taspase1-Chimäre bestätigt werden. Interessanterweise ist die nukleäre Akkumulation des Biosensors an der Mutationsposition V8A ähnlich wie die Translokation des Biosensors bei Koexpression mit aktiver *Drosophila* Tasp-mCherry-Fusion. Im Gegensatz dazu zeigt die Koexpression mit aktiver humaner Taspase-mCherry-Fusion keine nukleäre Lokalisierung des Biosensors mit dem Ergebnis, dass die Spaltstelle der Chimäre α -dTasp + β -hTasp der *Drosophila* Taspase1 entspricht.

A

cleavage site	193	L	D	T	V	G	A	V	199
human		TTG	GAC	ACG	GTA	GGC	GCT	GTG	
<i>Drosophila</i>		TTG	GAC	ACA	GTG	GGA	GCG	GTA	

B**C****D****E****Abbildung 12: Taspase-Chimäre**

Darstellung der Spaltsequenz von humaner und *Drosophila* Taspase1 (A). Immunpräzipitationsanalyse (B) und Immunfluoreszenzdarstellung (C) der transfizierten Taspase-Chimäre und dem Bindungsnachweis mit endogenem NPM1 bzw. ko-transfizierten NPM1wt. D Eine Darstellung der Taspase1-Aktivität mit Ko-Transfektion der Taspase-Chimäre und dem Biosensor nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. E Immunfluoreszenzdarstellung der ko-transfizierten Taspase-Chimäre α-dTasp + β-hTasp mit BioTasp Alascan-Mutanten. Maßstabsbalken 10 μm.

4.6 Interaktion mit NPM1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Spaltfähigkeit von Taspase1

Taspase1 ist über sein Substrat MLL an der Entwicklung von aggressiver Kinderleukämie und HER2-assoziiertem Brustkrebs beteiligt [24, 153]. Neben MLL wurden weitere essenzielle Proteine als native Taspase1-Ziele identifiziert, wie der TFIIA [34] und der Upstream Stimulatory Factor (USF2).

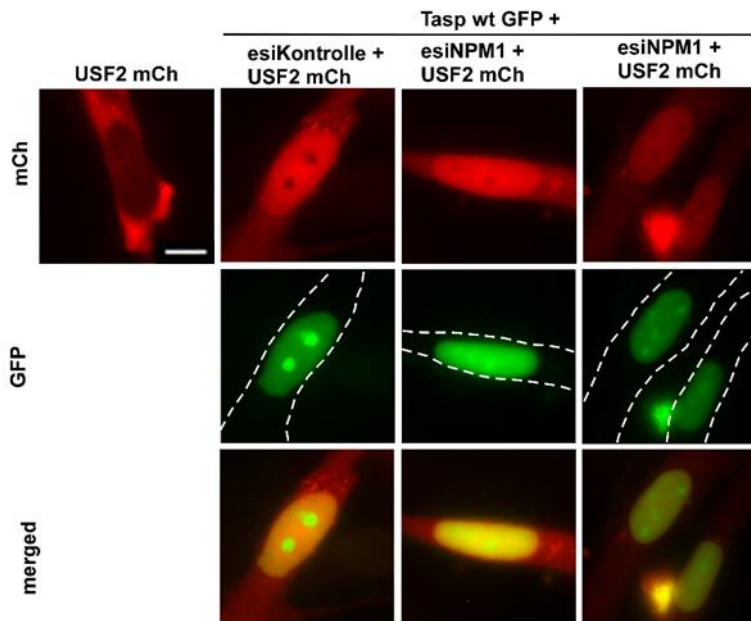


Abbildung 13: Identifiziertes Taspase1-Ziel-Protein: USF2

Darstellung transfizierter HeLa-Zellen mit dem potentiellen Taspase1-Substrat USF2 mit mCherry-Tag +/- Tasp wt GFP im Vergleich mit vorangegehendem NPM1 *knockdown* (esiNPM1) sowie einer Kontrollprobe (esiKontrolle). Maßstabsbalken 10 µm.

4.7 Die Rolle von "Taspase1" bei der Sensibilisierung von NPM-Mutanten gegenüber Chemotherapie

Wie bereits erwähnt, spielt Taspase1 nicht nur eine wichtige Rolle bei der Entwicklung aggressiver Kinderleukämien, sondern wird auch in einer Vielzahl solider Tumore überexprimiert, zum Beispiel bei Kopf- und Halskrebs [24]. Erstmals wurde in Primärgewebe von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen

des Kopfes und Halses (HNSCC) endogene Taspase1 als eine nukleäre/nukleolare Protease identifiziert [20, 29]. Diese Krebsart ist der sechst häufigste bösartige Tumor weltweit mit fast 650.000 neuen Fällen pro Jahr [154, 155]. Die 5-Jahres-Überlebensrate von HNSCC-Patienten liegt bei 40-50 % [154], so dass eine vielversprechende Therapie erforderlich ist.

Daher führten wir Messungen der Zelllebensfähigkeit von transfizierten HNSCC-Patientenzellen (HNSCCUM-02T) mit NPM-Mutanten in Kombination mit oder ohne Taspase1 wt durch. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hydroxyharnstoff (HU) behandelt, so dass dieser Wert den Ausgangspunkt für die Behandlung mit Chemotherapeutika darstellt. NPM-Mutanten, die wichtige Domänen für die Interaktion mit Taspase1 enthalten (aa1-117 und aa187-294), zeigen in Kombination mit einer HU-Behandlung geringere Lebensfähigkeitsergebnisse als die anderen behandelten Mutanten (Abbildung 14A, Diagramme für 48 und 72 Stunden; Abbildung 14B, Diagramme für 48 und 72 Stunden). Interessanterweise zeigen die NPM-Mutanten aa1-186 und aa106-294, die ohne Taspase1 wt transfiziert wurden, geringere Lebensfähigkeitsergebnisse als die mit Taspase1 transfizierten. NPM-Mutanten, die die Polymerisationsdomäne enthalten, scheinen empfindlicher auf Chemotherapie zu reagieren als NPM-Mutanten ohne diese Domänenregion (Abbildung 14A, Zeitpunkte 48 h und 72 h). Darüber hinaus zeigen alle NPM-Mutanten und auch NPM1 wt, die in Kombination mit Taspase1 wt transfiziert wurden, eine höhere Zelllebensfähigkeit, so dass wir annehmen, dass Taspase1 das NPM1-Protein in den Zellen stabilisiert. Dieser Stabilisierungseffekt von Taspase1 auf NPM1 wt kann in allen dargestellten Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) sehr gut beobachtet werden (Abbildung 14A). Wir überprüften diese Hypothese durch Transfektion von NPM-Mutanten in Kombination mit der inaktiven Taspase TV. Alle Proben, die mit inaktiver Taspase TV transfiziert wurden, zeigen keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen (Abbildung 14B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle NPM-Mutanten im Vergleich zu NPM1 wt eine geringere Lebensfähigkeit aufweisen.

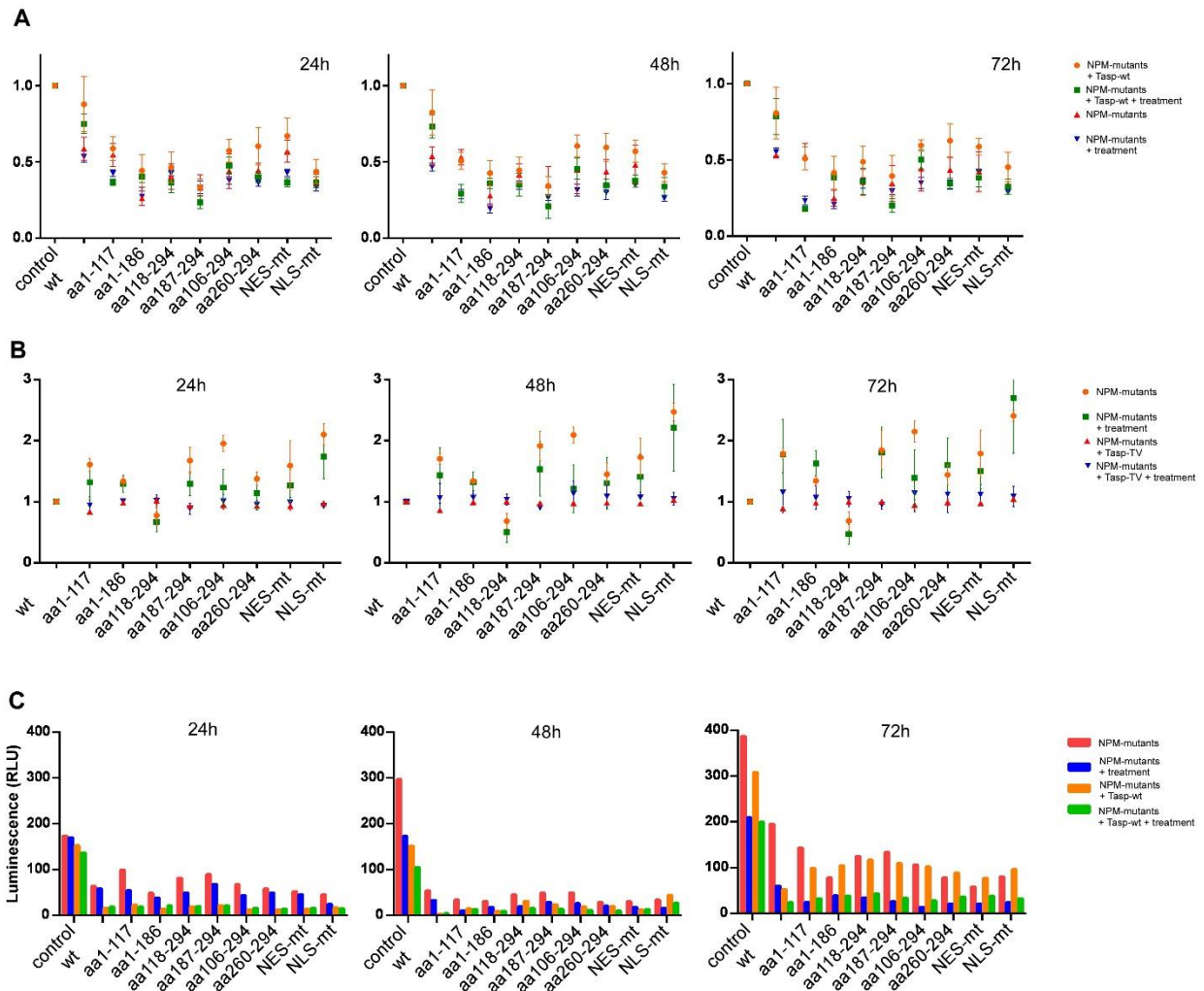


Abbildung 14: Zellviabilitätsmessungen in Verbindung mit Chemotherapeutika-Behandlung

HNSCC-Patientenzellen (HNSCCUM-02T) wurden mit NPM-Mutanten +/- Tasp wt transfiziert und nach 24 h mit HU (1,5 mM) behandelt und 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung fluorezenzbasiert (A) und lumineszenzbasiert (C) gemessen. Diese Versuchsreihe wurde parallel mit der inaktiven Tasp-TV-Variante durchgeführt (B).

Zusätzlich testeten wir die sensibilisierende Wirkung von Taspase1 auf NPM1 und seine Mutanten, indem wir eine andere humane Karzinomzelllinie A431 in Kombination mit einem *knockdown* von NPM1 vor der Transfektion der Zellen verwendeten, um Nebenwirkungen zu vermeiden. A431-Zellen mit NPM1-Knockdown wurden mit NPM-Mutanten in Kombination mit aktiver oder inaktiver Taspase1 transfiziert und anschließend mit HU behandelt. Die mit HU behandelten und die nicht behandelten Zellen, die mit Taspase wt transfiziert wurden, zeigen einen großen Unterschied in der Lebensfähigkeit aller Proben

(Abbildung 15A) im Gegensatz zu den Ergebnissen der transfizierten Zellen mit inaktiver Taspase1 (Abbildung 15B).

Weitere Analysen bestätigten die Hypothese, dass Taspase1 eine wichtige Rolle bei der Behandlung von HNSCC-Zellen mit Cisplatin spielt, dem Goldstandard in der chemotherapeutischen Behandlung von Patienten mit Kopf- und Halskrebs. Wir transfizierten HNSCCUM-02T-Zellen mit NPM1 wt, Taspase1 wt, inaktivem Taspase1 (Tasp TV) und der Kombination von NPM1 wt mit aktiver und inaktiver Form von Taspase1 in 6-Well-Platten. Die transfizierten Zellen wurden in 96-Well-Halbraumplatten mit je 3000 Zellen pro Vertiefung umgesiedelt. Nach vollständiger Adhärenz wurden die Zellen mit 5 μ M Cisplatin behandelt und nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden alle 30 Minuten gemessen (Endpunkt 48 Stunden). Mit Cisplatin behandelte und transfizierte Zellen mit NPM1 wt und der Kombination mit aktiver Taspase1 zeigen nahezu die gleichen Ergebnisse wie die nicht transfizierten Kontrollzellen, so dass dieses Ergebnis den Eindruck einer intakten Zellmembran und einer stabilen Zellviabilität vermittelt (Abbildung 15C und 15D). Im Vergleich dazu durchlaufen mit Cisplatin behandelte Zellen, die mit Taspase1 wt, inaktiver Taspase1 und der Kombination der inaktiven Taspase1-Form mit NPM1 wt transfiziert wurden, eine frühe Apoptose. Darüber hinaus sind transfizierte Zellen mit Taspase1 wt und inaktiver Taspase1 in Kombination mit NPM1 wt empfindlicher gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen und anderen Transfektionsvarianten. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass eine direkte Inaktivierung von Taspase1 zu einer höheren Empfindlichkeit von HNSCC-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin und zu einer besseren chemotherapeutischen Prognose führt.

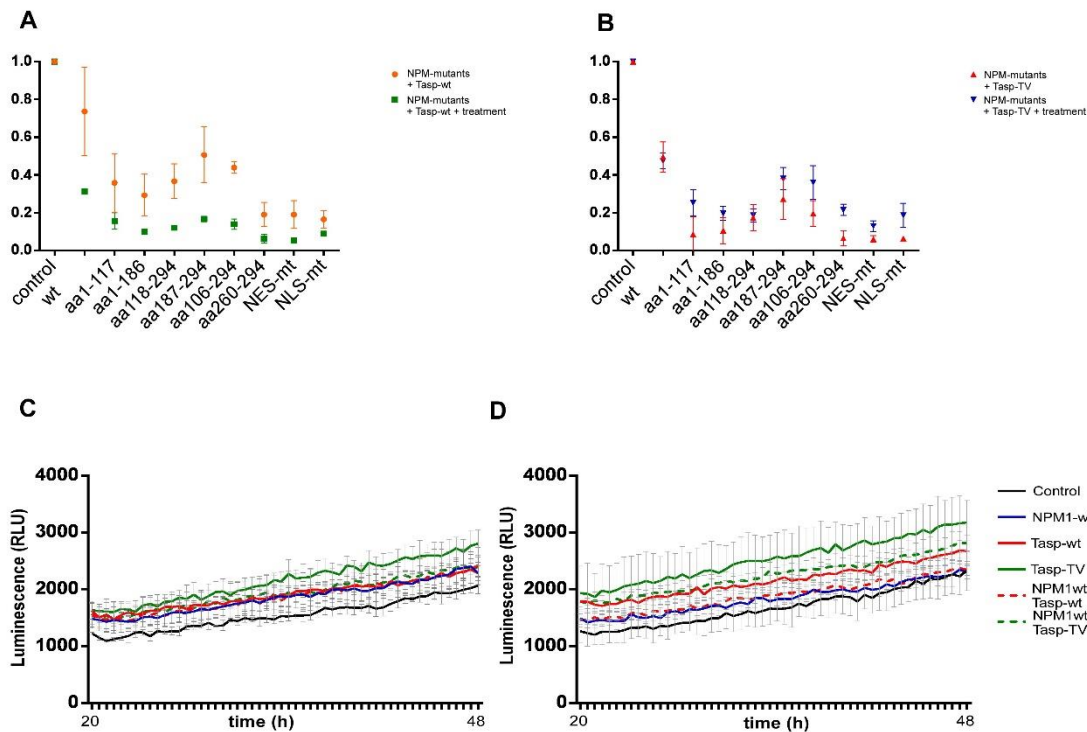


Abbildung 15: Einfluss der Taspase auf die Cisplatin-behandelten NPM-Mutanten

A431-Zellen mit NPM1-Knockdown wurden mit NPM-Mutanten in Kombination mit aktiver (A) oder inaktiver Taspase1 (B) transfiziert und anschließend mit HU behandelt. HNSCCUM-02T-Zellen wurden mit NPM1 wt, Taspase1 wt, inaktivem Taspase1 (Tasp TV) und der Kombination von NPM1 wt mit aktiver und inaktiver Form von Taspase1 transfiziert und anschließend mit 5 μ M Cisplatin behandelt und nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden alle 30 Minuten gemessen (Endpunkt 48 Stunden; C und D).

4.8 Taspase1 beeinflusst den synergistischen Effekt einer Kombinationsbehandlung

Es ist bekannt, dass eine gleichzeitige Behandlung von HNSCC-Patienten mit Chemo- und Strahlentherapie die effektivste Behandlungsoption darstellt und zu einer verbesserten Gesamtüberlebensrate von etwa 5 % führt [156]. Daher haben wir Messungen der Zellviabilität von transfizierten HNSCCUM-02T-Zellen mit NPM1 wt, Taspase1 wt, inaktivem Taspase1 und der Kombination von NPM1 wt mit der aktiven und inaktiven Form von Taspase1 mit verschiedenen Behandlungskombinationen (nur Cisplatin-Behandlung, nur Strahlentherapie und Cisplatin-Behandlung kombiniert mit Strahlentherapie) durchgeführt.

HNSCCUM-02T-Zellen wurden in 6-Well-Platten transfiziert und am folgenden Tag in 96-Well-Platten umgesiedelt. Nach der Umsiedlung wurden die Zellen mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen (5 μM und 10 μM) behandelt und einer Strahlentherapie (7 Gy) unterzogen. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde nach 24 Stunden (Daten nicht gezeigt) und nach 48 Stunden Inkubation gemessen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen bei einer kombinierten Chemo- und Strahlentherapie im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Chemo- oder Strahlentherapie deutlich abnimmt (Abbildung 16). Die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit einer höheren Cisplatin-Dosis (10 μM ; Abbildung 16 B) zeigen einen deutlichen synergistischen Effekt im Vergleich zu einer niedrigeren Cisplatin-Dosis (5 μM ; Abbildung 16 A).

Darüber hinaus bestätigten wir unsere Hypothese durch die Durchführung von Zelltod-Analysen, wie den Apoptose/Nekrose-Messungen. Zur Durchführung dieses Tests transfizierten wir HNCCUM-02T-Zellen in 6-Well-Platten mit NPM1 wt, Taspase1 wt, inaktivem Taspase1 und der Kombination von NPM1 wt mit der aktiven und inaktiven Form von Taspase1. Am folgenden Tag wurden diese Zellen in 96-Well-Platten umgesiedelt und nach der Umsiedlung mit Cisplatin in Konzentrationen von 5 μM , 7,5 μM (Daten nicht gezeigt) und 10 μM behandelt. Unmittelbar nach der chemotherapeutischen Behandlung wurden diese Zellen einer 7 Gy-Strahlentherapie unterzogen und für die Messungen mit den Reagenzien des Apoptose-/Nekrose-Assay-Kits gemäß den Empfehlungen des Herstellers vorbereitet. Die Messungen wurden zu ausgewählten Zeitpunkten durchgeführt (nur die Zeitpunkte 24 h und 48 h sind dargestellt). Die synergistische Wirkung der kombinierten Chemo- und Strahlentherapie konnte nach 24 Stunden (Abbildung 16C und 16D) und auch nach 48 Stunden (Abbildung 16E und 16F) nachgewiesen werden. Die Messergebnisse nach 24 Stunden verdeutlichen den Beginn einer frühen Apoptose (Abbildung 16C) nach der kombinierten Behandlungstherapie, die nach 48 Stunden eindeutig nachgewiesen werden kann (Abbildung 16E). Interessanterweise reagieren die mit Taspase1 wt transfizierten Zellen empfindlicher auf die Behandlungstherapie, was die wichtige Rolle von Taspase1 bei Kopf- und Halskrebserkrankungen bestätigt und unterstreicht. Wie erwartet zeigen unsere Ergebnisse auch, dass die Zellen hauptsächlich den Apoptoseweg durchlaufen und nicht hauptsächlich die Nekrose aktivieren. Die Nekrose-Werte sind zwischen den Transfektionsvarianten homogen verteilt und lassen sich durch die in den Vertiefungen verbliebenen toten Zellen erklären (Abbildung 16D und 16F), die aufgrund der porösen Membran die Messung des freien Nekrose-Reagenzfarbstoffs im Medium beeinflussen. Die hohe Menge an abgestorbenen Zellen, die mit der hohen Cisplatin-Konzentration (10 μM) im Medium zusammenhängt, beeinflusst auch die Messung, so dass die Lumineszenz- und Fluoreszenzwerte bei einer Behandlung mit 10 μM Cisplatin eine geringere Wirkung auf den Zelltod zeigen als bei einer Behandlung mit 5 μM Cisplatin.

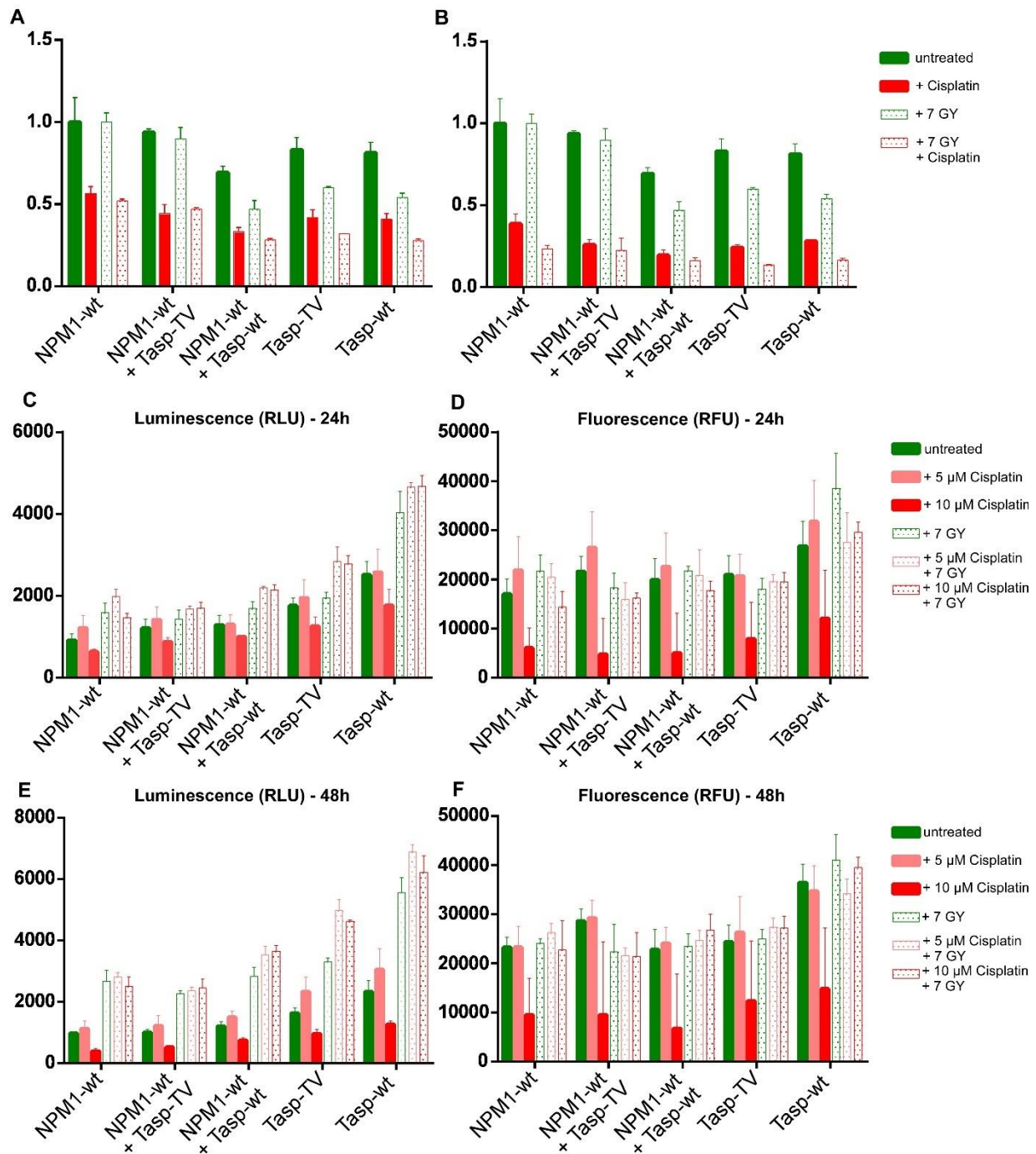


Abbildung 16: Kombinationsbehandlung aus Chemotherapie und Bestrahlung

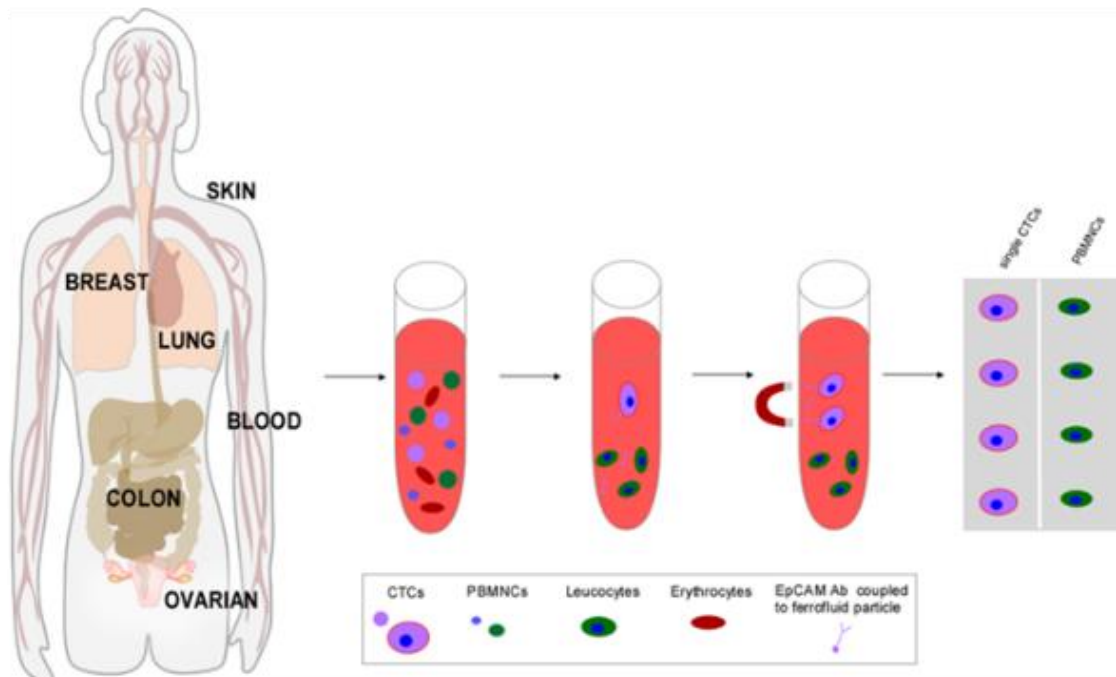
HNSCCUM-02T-Zellen wurden mit NPM1 wt, Taspase1 wt, inaktivem Taspase1 und der Kombination von NPM1 wt mit der aktiven und inaktiven Form von Taspase1 transfiziert und mit verschiedenen Behandlungskombinationen (nur Cisplatin-Behandlung, nur Strahlentherapie und Cisplatin-Behandlung kombiniert mit Strahlentherapie) und verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen von 5 μ M (A) und 10 μ M (B) durchgeführt. Dieser Versuchsansatz wurde

auch mit Reagenzien des Apoptose-/Nekrose-Assay-Kits durchgeführt. Die Messergebnisse nach 24 h (**C** und **D**) und 48 h (**E** und **F**) sind dargestellt.

4.9 Die Etablierung der IsoMAG IMS Einheit zur Isolation von CTCs

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Etablierung der IsoMAG IMS Einheit am Kopf-Hals-Tumorpatienten-Modell mit dem vorgegebenen Protokoll des Kooperationspartners Fraunhofer Institut Mainz (Verweis Abschnitt 4.11). Der Etablierungsprozess beinhaltet die Aufbereitung der Zellen (Zellzählung, Herstellen von Verdünnungsreihen, Fangen einzelner Zellen, Färbung der Zellen), die Kopplung der Zellen an die Antikörper und Beads sowie die Durchführung des Isolationsprozesses an der CTCelect Einheit und die anschließende Auswertung dieser Zellen (Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer, Färbung der Zellen). Die Etablierung der IsoMAG IMS Einheit wird in dieser Arbeit nicht beschrieben, da dieses Teilprojekt unter meiner Führung in Zusammenarbeit mit einer medizinischen Doktorandin durchgeführt wurde und nun in der folgenden medizinischen Doktorarbeit „Nachweis und Bedeutung zirkulierender Tumorzellen bei Kopf-Halskarzinomen“ von Sophie Madeleine Nagel nachgelesen werden kann.

A



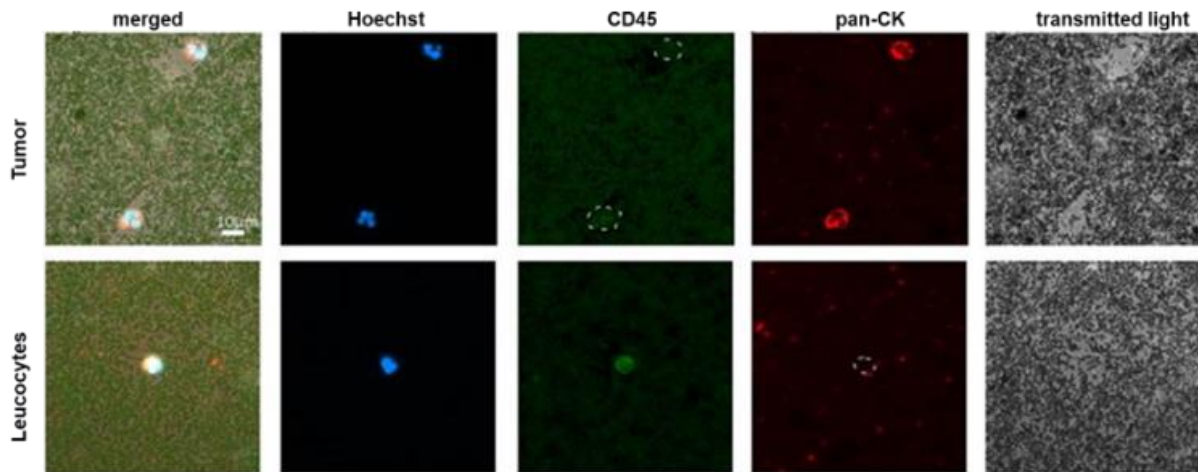
B

Abbildung 17: Immunomagnetische Detektion und Isolation von Zellen aus einer Blutprobe

Schematische Darstellung einer Isolationsmethode zirkulierender Tumorzellen aus einer Patientenblutprobe mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln und anschließender immunhistochemischer Färbung (A). Das Resultat dieser Methodik wird in Form von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt; Beispielhafte Färbung mit Hoechst, anti-CD45 und anti-pan-Cytokeratin detektierter Tumorzellen und Leukozyten (B). Maßstabsbalken 100µm.

In Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner konnten zudem weitere interessante Ergebnisse bezüglich einer Protokoll-Optimierung zur vollautomatisierten Isolation erzielt werden, die in der folgenden Veröffentlichung „IsoMAG – an automated system for the immunomagnetic isolation of squamous cell carcinoma-derived circulating tumor cells“ [157] erläutert werden.

Zusammenfassung: Die Publikation beschreibt die Entwicklung und Validierung des IsoMAG IMS-Systems, einer automatisierten Plattform zur immunomagnetischen Isolation von CTCs aus Blutproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen, insbesondere Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen. Das System nutzt magnetische Beads, die mit EpCAM-Antikörpern beschichtet sind, um CTCs effizient zu isolieren. Die Ergebnisse zeigen, dass das System mehr als 86,5% der angereicherten Krebszellen aus Zellkulturmedien und menschlichem Blut zurückgewinnen kann, während die Kontamination mit weißen Blutkörperchen auf etwa 1200 Zellen pro 7,5 ml Blut minimiert wird. Das IsoMAG-System ermöglicht eine vollautomatische CTC-Isolation und -Detektion, was die Überwachung von Krankheiten und die Durchführung von Einzelzellanalysen erleichtert. Zukünftige Entwicklungen zielen darauf ab, das System in einen mikrofluidikbasierten Workflow zu integrieren, um die Detektion einzelner CTCs weiter zu verbessern.

Article

IsoMAG—An Automated System for the Immunomagnetic Isolation of Squamous Cell Carcinoma-Derived Circulating Tumor Cells

Alena Gribko ^{1,†}, Janis Stiefel ^{2,†} , Lana Liebetanz ², Sophie Madeleine Nagel ¹, Julian Künzel ³ , Madita Wandrey ¹, Jan Hagemann ¹ , Roland H. Stauber ¹, Christian Freese ^{2,*}  and Désirée Gül ^{1,*} 

- ¹ Department of Otorhinolaryngology, University Medical Center Mainz, Langenbeckstr. 1, 55131 Mainz, Germany; algribko@uni-mainz.de (A.G.); sophiemadeleine.nagel@web.de (S.M.N.); wandrey@uni-mainz.de (M.W.); jan.hagemann@unimedizin-mainz.de (J.H.); rstauber@uni-mainz.de (R.H.S.)
² Fraunhofer Institute for Microengineering and Microsystems IMM, Carl-Zeiss-Str. 18-20, 55129 Mainz, Germany; Janis.Stiefel@imm.fraunhofer.de (J.S.); lana-liebetanz@web.de (L.L.)
³ Department of Otorhinolaryngology, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; julian.kuenzel@ukr.de
* Correspondence: Christian.freese@imm.fraunhofer.de (C.F.); guel@uni-mainz.de (D.G.)
† These authors contributed equally.



Citation: Gribko, A.; Stiefel, J.; Liebetanz, L.; Nagel, S.M.; Künzel, J.; Wandrey, M.; Hagemann, J.; Stauber, R.H.; Freese, C.; Gül, D. IsoMAG—An Automated System for the Immunomagnetic Isolation of Squamous Cell Carcinoma-Derived Circulating Tumor Cells. *Diagnostics* **2021**, *11*, 2040. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112040>

Academic Editor:
Gustavo Baldassarre

Received: 20 September 2021
Accepted: 1 November 2021
Published: 4 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: detailed information about circulating tumor cells (CTCs) as an indicator of therapy response and cancer metastasis is crucial not only for basic research but also for diagnostics and therapeutic approaches. Here, we showcase a newly developed IsoMAG IMS system with an optimized protocol for fully automated immunomagnetic enrichment of CTCs, also revealing rare CTC subpopulations. Methods: using different squamous cell carcinoma cell lines, we developed an isolation protocol exploiting highly efficient EpCAM-targeting magnetic beads for automated CTC enrichment by the IsoMAG IMS system. By FACS analysis, we analyzed white blood contamination usually preventing further downstream analysis of enriched cells. Results: 1 µm magnetic beads with tosyl-activated hydrophobic surface properties were found to be optimal for automated CTC enrichment. More than 86.5% and 95% of spiked cancer cells were recovered from both cell culture media or human blood employing our developed protocol. In addition, contamination with white blood cells was minimized to about 1200 cells starting from 7.5 mL blood. Finally, we showed that the system is applicable for HNSCC patient samples and characterized isolated CTCs by immunostaining using a panel of tumor markers. Conclusion: Herein, we demonstrate that the IsoMAG system allows the detection and isolation of CTCs from HNSCC patient blood for disease monitoring in a fully-automated process with a significant leukocyte count reduction. Future developments seek to integrate the IsoMAG IMS system into an automated microfluidic-based isolation workflow to further facilitate single CTC detection also in clinical routine.

Keywords: automation; liquid biopsy; circulating tumor cells; head and neck squamous cell carcinoma; immunomagnetic particle-based detection; metastasis

1. Introduction

Cancer is the second major cause of death in modern society. Besides improved treatment strategies, the development of innovative diagnostics is indispensable for long-term improvement of diagnosis and treatment of cancer patients. The lymph-/hematogenous spread of cancer cells into distant organs and their subsequent growth to overt metastases is the most fatal complication of solid tumors, such as squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) [1,2]. Moreover, therapy resistance and associated relapses are common and associated with high patient morbidity [3,4]. The classical view is that metastatic spread is a late process in malignant progression, but today it is accepted that

blood circulation and dissemination of primary cancer cells to distant sites is already an early event [5,6].

The fact that these circulating tumor cells (CTCs) are detectable in the peripheral blood of cancer patients months to years after complete removal of the primary tumor in a period called “metastatic cancer dormancy” supports the idea that these cells circulate between metastatic sites [7]. Since their early discovery in the 19th century [8], CTCs have been demonstrated to be clinically recognized and present in the blood circulation of many cancer types including colon [9], lung [10], ovarian [11], breast [12], melanoma [13], prostate [14] and head and neck cancer [15]. Clinical studies present a correlation between the progression of cancer disease and the number of detected CTCs [16–18]. A high number of detected CTCs can give information about tumor burden, recurrence and usually represents a poor prognosis. In detail, the determination of CTCs before and after resection also opens up the possibility for monitoring therapeutic response [19] in combination with analyses of circulating tumor DNA (ctDNA) [20]. Hence, the detection and characterization of CTCs as a part of minimal invasive “liquid biopsy” has gained (pre)clinical considerable attention over the last decade [21,22].

However, the capture and detection of CTCs are extremely challenging because of their rarity, the property to move as individual cells or as multi-cellular clumps, and their heterogeneity regarding size and biological and molecular changes during the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) processes. These challenges require the ability to handle a very small number of cells by isolation methods with high efficiency in an acceptable time scale [23]. Various techniques that are based on physical or immunological properties have been developed [24], and different materials with their unique properties according to their shape, size and surface were applied in this field [25–27]. Only a few systems are available on the liquid biopsy market but have been shown to isolate CTCs in a proper way. Thereby, these methods often dictate an exact protocol to the user, taking away application flexibility. In contrast to that, researchers aim for process-adaptable platforms as the disciplines of liquid biopsy expand permanently, concerning various sample types such as tissue-derived single cell suspensions or adjustable sample sizes.

All techniques developed for CTC enrichment have their advantages and disadvantages. In contrast to immunomagnetic separation, physical separation methods (e.g., Parsortix[®] technology, Angle, Surrey, UK) allow label-free isolation but lack cell distinction due to overlapping sizes of CTCs and white blood cells [28]. A microstructure-based enrichment is limited in throughput and sieve-shaped technologies, error-prone to complex liquids such as whole blood, are consequently at risk of clogging in automated lab solutions. Though it has drawbacks in target selectivity, immunomagnetic enrichment is often the method of choice because it is easily automatable and enables a high sample throughput. Since the establishment of the “Food and Drug Administration” (FDA)-approved CellSearch[®] system, which is held as the gold standard of automated immunomagnetic enrichment and staining platforms, the sensitivity of CTC detection has markedly improved [29,30]. CellSearch[®] relies on the expression of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) for the quantification of CTCs in different tumor types [31]. Although this optical detection method have been used in numerous studies, the cost for instruments (220,000 dollars), sample preparations and analysis are still laborious and relatively high (approx. 1000 dollars/run) [32]. Consequently, such assays did not succeed in establishing in clinical routine as a low-cost diagnostic test. Due to the above-mentioned obstacles, fully automated, easy-to-use platforms will demonstrate future solutions to improve cancer diagnostics and therapies as well as basic scientific knowledge of tumor development.

The Fraunhofer CTSelect unit has been developed to meet the need of such a fully automated, easy-to-use platform for CTC isolation out of 7.5 mL whole blood samples. Herein, we characterized the IsoMAG IMS device as the core unit of such a platform applying fully automated immunomagnetic enrichment of rare cells with flexibly selectable antigen targets. In this proof-of-principle study, we established a robust protocol for the automated isolation of an EpCAM- and CSV (cell surface vimentin)-positive subpopulation

of cells with a concomitant reduction of background white blood cells as a prerequisite for implementation of the device into the CTCelect unit allowing downstream analyses on a single cell level. Furthermore, we proved feasibility of the method for two squamous cell carcinoma cell lines and HNSCC patient samples.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines

The SCL-1 squamous cell carcinoma line was established by Dr. Petra Boukamp (DKFZ, Heidelberg, DE, Germany) [33] and kept in Gibco™ DMEM (low glucose, pyruvate) medium supplemented with 10% FCS. HNSCCUM-02T squamous cell carcinoma cell line was established by Welkoborsky et al. (UMC Mainz, DE, Germany) [34], and kept in DMEM:F-12 (cc-pro) medium supplemented with 10% FCS and 1% L-glutamine. Cell lines were cultured at subconfluence and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Other cell lines (A431, HEK293T, MV3, BLM) were received from cell line collections (DSMZ, ATCC) and handled as described before [35–37].

2.2. Blood Samples

All blood samples were obtained from the University Medical Center Mainz, DE. To quantify leukocyte contamination, whole blood bags (500 mL CompoFlex, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) from healthy donors were purchased at the local Blood Transfusion Center. Whole blood from HNSCC patients was collected at the Department of Otorhinolaryngology in compliance with ethical guidelines [38].

2.3. Immobilization of EpCAM Antibodies on Immunomagnetic Beads

Immunomagnetic beads at different sizes and surface properties (Table 1) were purchased at Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE and coated with biotinylated monoclonal mouse anti-human EpCAM (CD326) antibody 1B7 (20 µg/mL, eBioscience, GB) or anti-human CSV antibody (clone 84-1, Abnova, Taiwan) for 1 h as described by the manual. Free streptavidin binding sites on anti-EpCAM beads were then saturated with a biotin/PBS solution for 30 min. Anti-EpCAM beads were stored at 4 °C for several weeks.

Table 1. Overview of tested Dynabeads.

Beads	Size	Surface Functionalization
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	1 µm	Tosyl-activated, hydrophobic
Dynabeads MyOne Streptavidin C1	1 µm	Carboxylic acid, hydrophilic
Dynabeads M-270 Streptavidin	2.8 µm	Carboxylic acid, hydrophilic
Dynabeads M-280 Streptavidin	2.8 µm	Tosyl-activated, hydrophobic

2.4. Manual Cell Isolation by Immunomagnetic Beads

To compare the performance of the IsoMAG IMS unit it was also necessary to establish a standard protocol for manual cell isolation. Cells (SCL-1, HNSCCUM-02T) were released from culture flasks and stained using the CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (CFSE) according to the manufacturer's protocol. A defined number of stained single cells were aspirated with a 10 µL pipette from a 1:100 diluted cell suspension in a petri dish and spiked into 7.5 mL sample volume consisting of cell culture medium, or blood of healthy donors. Next, 100 or 150 µL (depending on medium or blood) of anti-EpCAM Dynabeads MyOne Streptavidin were added (see Table 1) and incubated for 30 min with slow rotation of the tube. Next, the bead-bound cells were magnetically separated for 10 min by using DynaMag-15 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) and resuspended in 5 mL washing buffer. Washing steps and magnetic separation were repeated three times using a decreased incubation time of 5 min and resuspension in washing buffer with decreasing volumes (ranging from 5 mL, 4 mL up to 1 mL).

2.5. Automated CTC Enrichment Using the IsoMAG Device

For the establishment of a standard protocol using the IsoMAG IMS unit, antibody-coupled beads were added to a 7.5 mL sample volume consisting of cell culture medium, blood of healthy donors or patient blood samples with spiked EpCAM+ SCL-1 or patient-derived HNSCC cells (HNSCCUM-02T). Before initiating the assay in the software, five tubes containing the input sample and washing buffers were placed in the tube holder carousel and a 10 mL pipet tip was put in the holder of the IsoMAG device as described in Table S1. The sample was incubated for 30 min. After incubation, bead-bound CTCs were magnetically separated alternately with several washing steps in decreasing volumes from 5 mL to 1 mL (see Supplementary Table S1 for detailed protocol).

2.6. Characterization of Leukocyte Contamination in IsoMAG Isolates

To quantify analysis-disrupting white blood cell (WBC) contamination in tumor cell isolates, CD45+ cell count after manual and automated IMS was determined by flow cytometry. Therefore, we established a double staining protocol for leukocytes using a CD45-PE antibody targeting the specific surface protein of WBCs (1:50 dilution; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE, Germany) and nuclear stain RedDot™ (Biotium, Fremont, CA, USA). Wash buffers were set up in the IsoMAG IMS unit and 150 µL EpCAM beads were added to 7.5 mL whole blood before initiating the automated protocol. Manual enrichment was performed in parallel. The final samples were separated in a magnet separator, the supernatant was discarded and the bead cell pellet was stained with the above-mentioned solutions. Dual-positive cells [CD45+/RedDot+] were analyzed by FACS using the BD Accuri C6 flow cytometer. Cell counts after IMS were measured in four samples of different healthy donors and the average WBC contamination with standard deviation (SD) was calculated.

2.7. Immunostaining of IsoMAG Isolated CTCs

To assess possible tumor origin of isolated cells, the final 1 mL sample was administered several staining steps. First, isolated cells were stained with fluorescent CD45-FITC antibody (1:1000 dilution) to label leukocytes. Subsequently, the sample was washed three times with PBS in a magnetic separator and transferred to an ibidi 8-well slide (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) after the last separation step. Cells were centrifuged to the bottom of the slide by a CytoSpin device and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min. After further washing steps, cells were permeabilized (0.1% Triton X in PBS, 5 min) and stained with nuclear dye Hoechst33342 (1:1000 dilution) for 20 min. Following further washing steps, unspecific binding was blocked for 30 min using 0.5% BSA in PBS and staining with fluorescent anti-pan-Cytokeratin-PE antibody (1:200 dilution, overnight) was performed.

2.8. Statistical Analysis

Each experiment was repeated at least three times. Data are shown as means with SD and statistical analysis was performed using GraphPad PRISM for Windows (GraphPad Software v9.1.2.226, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com, accessed on 13 July 2021). *p*-values were reported as significant when * $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Optimization of Biofunctionalized Beads for Cell Enrichment

The selection of magnetic beads and immobilized antibodies on the bead surface are decisive factors in terms of cell-specific enrichment. First, EpCAM-biotin antibodies were immobilized on the streptavidin-biofunctionalized beads. To identify a proper CTC model to characterize IsoMAG, manual immunomagnetic enrichment of various epithelial cancer cell lines, such as cutaneous squamous cell carcinoma cells (SCL-1, SCL-2), and A431 was performed (Supplementary Figure S1). We determined the highest recovery rates for EpCAM beads using SCL-1 (85%, $n = 3$) and A431 cells ($100 \pm 20\%$, $n = 3$). As controls, we were also able to isolate melanoma cells (MV3, BLM) targeting melanoma-associated

chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP), but not HEK293T (Supplementary Figure S1B). Being an appropriate squamous epithelial-derived model close to HNSCC, we therefore chose to proceed with the characterization of IsoMAG using the combination of EpCAM beads and SCL-1 cells. For this cell line, high expression of epithelial marker EpCAM is described. EpCAM mRNA expression in SCL-1 cells was confirmed on a single cell level using RT-qPCR (Supplementary Figure S2).

Since there are numerous commercially available beads with different surface modifications and sizes, the next step was to investigate their potential to enrich EpCAM-positive cells spiked into cell culture medium. In this context, four different types of magnetic beads varying in size and surface properties were tested (Table 1). Therefore, 20 fluorescently labeled SCL-1 cells were spiked into 7.5 mL cell culture medium and functionalized magnetic beads were added. After incubation, these cells were manually enriched with a magnetic separator. We obtained the best recovery rates by using 1 μ m T1 beads and 2.8 μ m M280 beads (Figure 1A). Using these beads, the cell recovery rate was 88.3% ($\pm$ 2.9% SD) whereas the use of 1 μ m C1 or 2.8 μ m M270 beads resulted in less than 50% cell recovery.

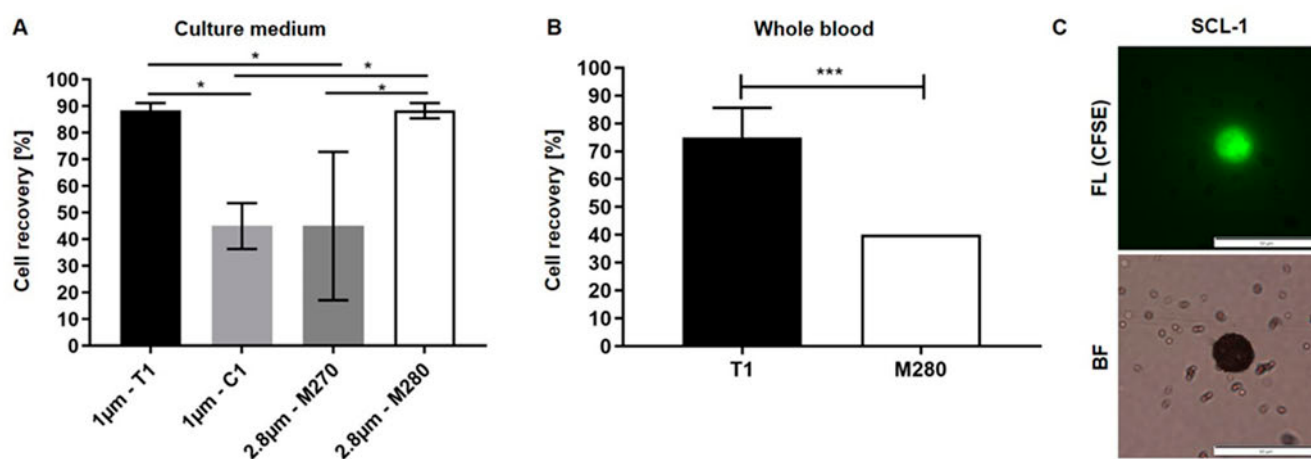


Figure 1. Enrichment of HNSCC cells from cell culture medium (A) and whole blood (B) differs depending on size and type of functionalized magnetic beads. Values are displayed as means of recovered cells using antibody-coupled magnetic beads with specific sizes and surface modifications. Twenty fluorescently labelled SCL-1 cells were spiked into 7.5 mL cell culture medium (A) or 7.5 mL full blood samples (B), and manually enriched by using EpCAM antibody coupled magnetic beads. (A) Welch's *t*-test, $n = 3$, *: $p < 0.05$ (one-way ANOVA test with Tukey's *t*-test); (B) Welch's *t*-test, $n = 6$ (T1), $n = 2$ (M280), ***: $p < 0.002$; (C) recovered, CFSE-stained SCL-1 cells were analyzed by fluorescence microscopy (FL). Corresponding bright-field image (BF) shows beads bound to cell and freely distributed in the medium. Scale bar, 50 μ m.

Subsequently, the performance of T1 and M280 beads was investigated in blood samples of healthy donors. Again, 20 fluorescently labeled SCL-1 cells were spiked into 7.5 mL blood and were manually enriched using the same protocol. As depicted in Figure 1B, the number of recovered cells is significantly higher using T1 beads compared to M280 beads (75 vs. 40%). Microscopic analysis of isolated cells in the counting chamber revealed that cells are densely covered by magnetic beads which are also freely distributed in the enrichment medium (Figure 1C).

Regarding our previous results, T1 beads were chosen for establishment of the automated cell isolation using the IsoMAG IMS demonstrator (Figure 2A). The centerpiece of the benchtop device is a rotatable tube holder carousel with max. 6 reagent slots (Figure 2B). The different positions of the carousel and the 10 mL pipet tip holder to pick up the pipet tip and perform the enrichment are driven by a pipetting robot on a vertical and horizontal axis. The magnet arm is moveable at a swivel joint to capture bead bound cells and free beads in the pipet tip while reducing the sample volume by discarding the supernatant wash buffers. Macrofluidic sample pipetting is directed pneumatically with a syringe pump. The 7.5 mL starting sample is placed into the first position of the carousel. Posi-

tions 2–5 are subsequently filled with washing buffers in a decreasing volume and the assay is initiated in the software on an external computer (for detailed protocol see also Supplementary Table S1).

The results obtained with the IsoMAG IMS unit were directly compared to manually enriched cells with the same batch of magnetic beads. Automated isolation resulted in 86.9% cell recovery while 88.8% of the spiked cells could be detected by manual isolation. This means that in our spiking experiments more than 17 out of 20 cells were recovered from a volume of 7.5 mL by both manual enrichment and the fully automated protocol without significant difference. Statistical analysis of recovery rates showed a slightly lower SD of 2.4% ($n = 4$) after automated isolation compared to manual enrichment (4.8% SD; $n = 4$), indicating a reproducible automation.

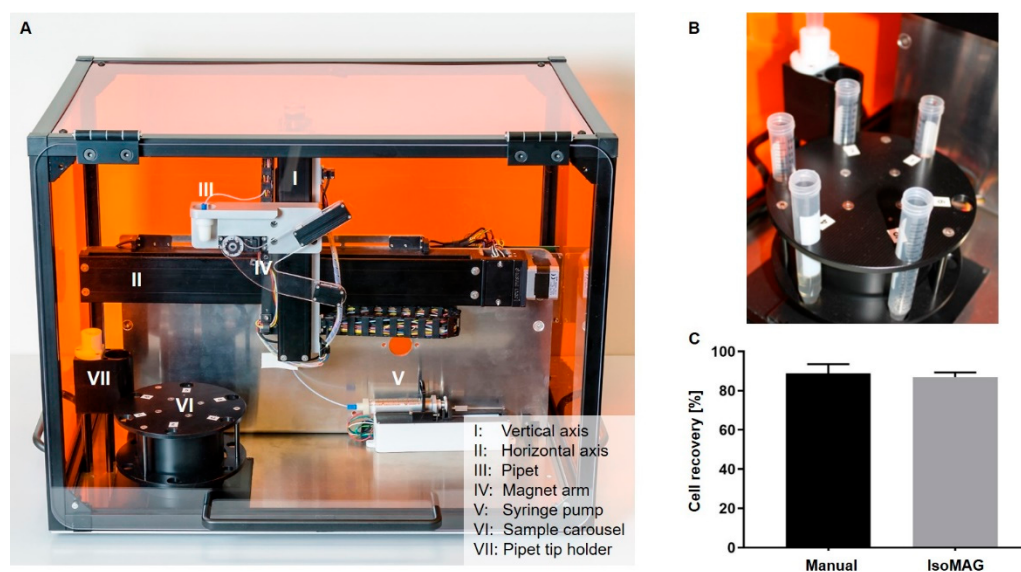


Figure 2. Establishment of automated cell recovery using IsoMAG IMS unit. (A) IsoMAG IMS demonstrator with horizontal and vertical axis driving the pipet unit and magnet arm; (B) the carousel as tube holder for prestorage of sample and wash buffers; (C) 20 fluorescently labelled cells were spiked into 7.5 mL cell culture medium and enriched by using EpCAM antibody coupled T1 (1 μ m) magnetic beads. The sample was processed manually or automated using the IsoMAG IMS system. Welch's *t*-test, $n = 4$, ns: $p > 0.1234$.

3.2. Reduction of Blood Cell Contamination

Besides a robust protocol and an easy-to-handle automated system, it is crucial to reduce the number of “background” WBCs to enable high quality downstream analyses. In preliminary work we already established the basic isolation process, including optimization of necessary washing steps (data not shown). In this study, the automated assay was characterized regarding washing buffers to minimize the unspecific carryover of dual-positive leukocytes [CD45+/RedDot+]. Samples were analyzed by FACS to determine WBC contamination. Gates were set with CD45-PE/RedDotTM-stained blood dilution as positive control and stained beads as negative control. The results presented in Figure 3A show that the number of leukocytes after the automated isolation process was about 1200 cells. Comparable results were achieved after manual enrichment (5123 dual-positive cells). However, we observed a broad scattering of WBC counts with a standard deviation of almost 4900 cells in manually enriched samples. Thus, an automated protocol has been developed considering both a high efficiency of cell recovery as well as a low rate of WBC contamination.

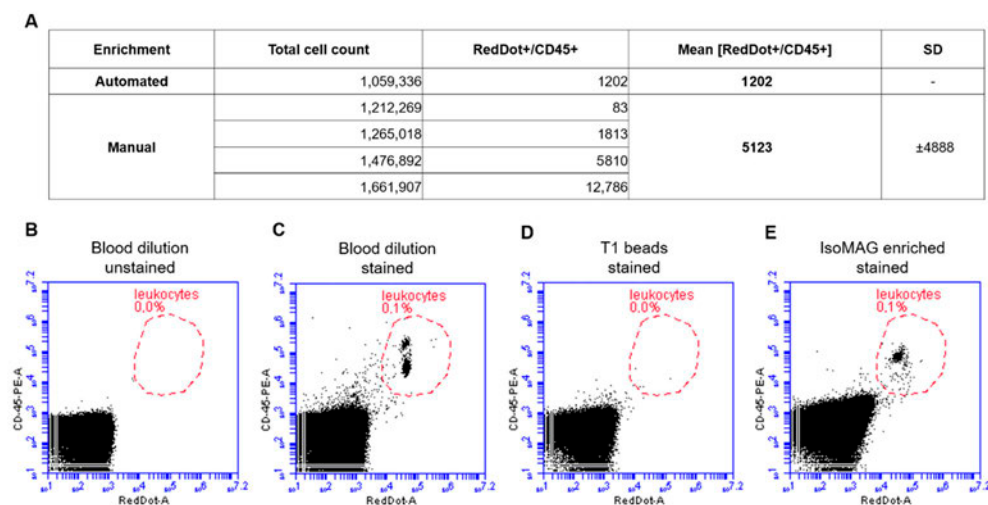


Figure 3. Automated immunomagnetic enrichment procedure exhibits a significantly lower amount of leukocyte contamination compared to manual cell isolation. **(A)** Summary of enrichment processes and quantification of leukocyte contamination. **(B–E)** After the automated enrichment process, cells were stained with CD45-PE antibody and nucleic staining reagent RedDot™. Blood dilution (1:1000) shows a dual-positive cell population **(B,C)**. After the enrichment process, this gating was used to quantify the leukocyte contamination **(E)** while showing no staining of the free beads themselves **(D)**.

3.3. Automated Enrichment of Head and Neck Cancer Cells

We applied the method to a second cancer entity originating from squamous cell tissue with an epithelial, EpCAM-positive phenotype as proof-of-principle. Thus, enrichment experiments were also performed with an epithelial cell line model derived from head and neck squamous cell carcinoma (HNSCCUM-02T). HNSCCUM-02T cells show high EpCAM expression allowing enrichment with our system (Supplementary Figure S3A).

Automated enrichment (spike-in) experiments with HNSCCUM-02T cells were conducted as described before and demonstrated applicability of the IsoMAG IMS unit using blood samples, both from healthy donors and patient blood (Figures 4 and 5). In total, 95% (± 15) of spiked cells were recovered (Figure 4A), quantified by fluorescence microscopy after intracellular staining of epithelial tumor marker pan-cytokeratin (pan-CK) [39] and CD45 (Figure 4B). Isolated tumor cells were identified by expression of cytokeratin [Hoechst+/CD45−/panCK+] and could be differentiated from CD45-positive leukocytes [Hoechst+/CD45+/panCK−] appearing at low frequency after enrichment.

As dynamic EMT and MET processes seem to modulate primary tumors, metastases and CTCs disease- and patient-dependently, detection systems allowing the use of variable CTC/cancer markers are highly desirable. To underline the advantage and full flexibility of our device to also isolate cells by using variable cancer markers, we here targeted cell-surface vimentin (CSV) as an additional proof-of-concept example. As shown in Figure 4C, we performed spike-in experiments using engineered CSV-coupled immunomagnetic beads to isolate HNSCCUM-02T cancer cells from human blood. Expression of CSV was verified by Western blot analysis and immunofluorescent staining (Supplementary Figure S3C,D). Importantly, automated isolation of spiked HNSCCUM-02T cells using CSV-coupled beads also resulted in high recovery rates of $\pm 95\%$ (Figure 4C).

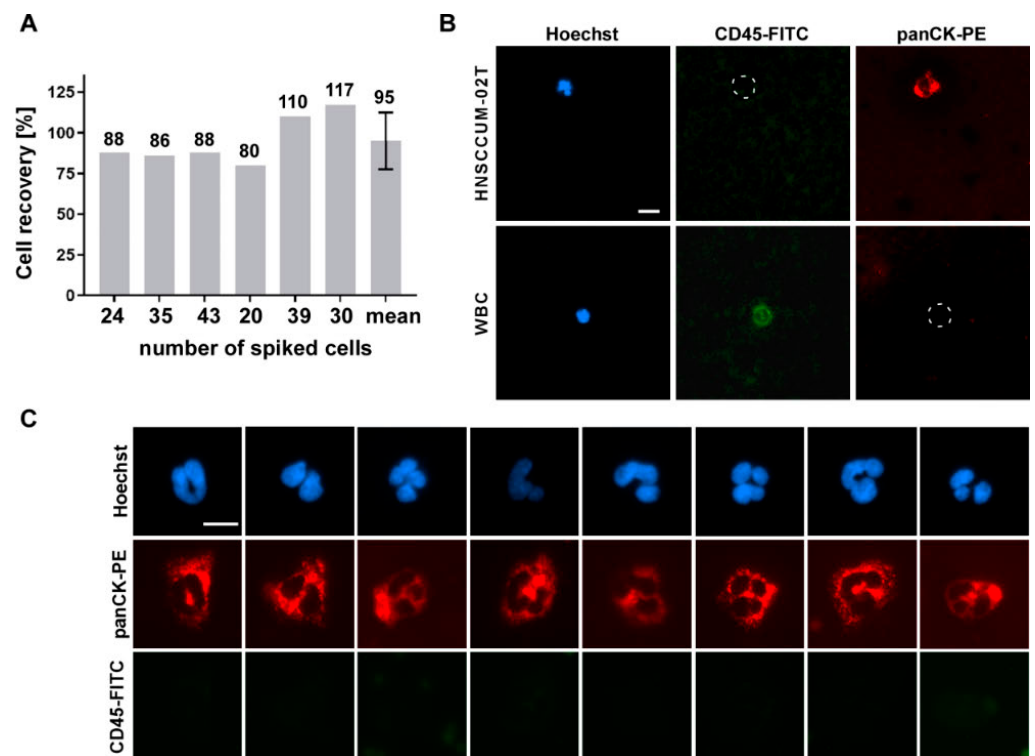


Figure 4. Cell isolation by the IsoMAG System resulted in high recovery rates for head and neck cancer cells. **(A)** Different numbers of HNSCCUM-02T cells were spiked in blood samples and enriched by EpCAM-coupled T1-beads using the IsoMAG unit. **(B)** For cell counting, recovered cells were stained with Hoechst dye, cytokeratin (panCK-PE) and CD45-FITC antibodies and quantified by fluorescence microscopy. [Hoechst+/CD45−/panCK+] cells were classified as HNSCCUM-02T cells, [Hoechst+/CD45+/panCK−] cells as leukocytes (WBC). Scale bar, 10 μ m. **(C)** Examples of cells enriched by CSV-coupled T1-beads. Cells were stained as described in **(B)**. Scale bar, 10 μ m.

3.4. CTC Screening Using Blood of HNSCC Patients

Finally, three HNSCC patients were screened for CTCs applying our established protocol for the IsoMAG IMS system. The results shown in Figure 5 impressively demonstrate the clinical applicability of the system. All cells positive for cytokeratin but negative for CD45 expression [Hoechst+/CD45−/panCK+] were counted and classified as potential CTCs (Figure 5B). Here, we were able to isolate 74 to 93 potential CTCs with an epithelial-like character from patients suffering from different head–neck tumor subtypes (hypo- and oropharynx cancers with lymph node metastasis, see Figure 5A). We also captured preliminary data on isolation of CTCs out of patient blood using a combination of EpCAM and CSV beads (Supplementary Figure S4). However, these results obtained from a small and heterogeneous group of patients are preliminary and have to be confirmed by larger studies and further analysis methods, e.g., sequencing.

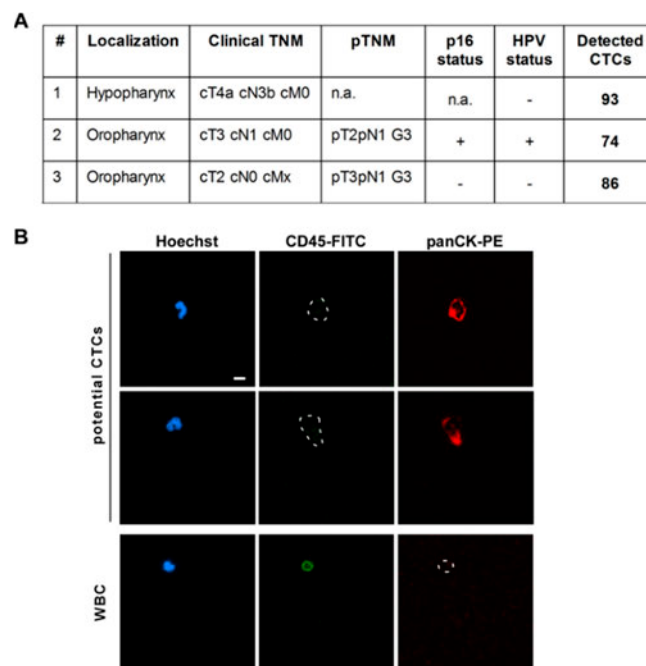


Figure 5. Potential circulating tumor cells (CTCs) could be enriched from head and neck cancer patient blood. **(A)** Clinical parameters and numbers of detected CTCs for three patients suffering from hypo- or oropharyngeal cancers including lymph node metastases. **(B)** 7.5 mL of patient blood was mixed with EpCAM-coupled T1 beads and placed into the IsoMAG unit for automatic enrichment of CTCs. For cell counting, enriched cells were stained with Hoechst dye, cytokeratin (panCK-PE), and CD45-FITC antibodies and quantified by fluorescence microscopy. [Hoechst+/CD45−/panCK+] cells were classified as potential CTCs, [Hoechst+/CD45+/panCK−] cells as leukocytes (WBC). Scale bar, 10 μ m.

4. Discussion

Personalized cancer therapy will benefit from analysis of single solid and circulating tumor cells in the future. In order to develop a fully automated system for the enrichment and isolation of single tumor cells, the reduction in sample volume plays a pivotal role. Thus, excellent performance is required for the enrichment step depending on the developed system but also on the developed protocol.

In the present study, we successfully established a robust protocol for the automated isolation of CTCs by the IsoMAG IMS device, a core unit of the CTCelect platform. As a first step, we developed a suitable CTC model system to establish the protocol for squamous cell carcinoma. Although we also achieved high recovery rates for the epithelial A431 cells, we decided to use SCL-1 and HNSCCUM-02T cell lines as squamous epithelial-derived models close to HNSCC. Of note, we are aware of variable EpCAM expression in “primary CTCs” versus established cancer cell lines. However, for the development and comparison of CTC selection procedures and devices, CTC models with defined EpCAM levels are mandatory. Using this model, we demonstrated improved performance of 1 μ m tosyl-activated, hydrophobic magnetic beads (T1) which thus were chosen for our final protocol. In addition to their advantageous characteristics for automated applications, such as a low sedimentation rate and faster reaction kinetics compared to M-280/M-270 beads, our results are in line with other studies showing improved capture efficiency and specificity of 1 μ m T1 beads for magnetic cell detection [40,41].

Downstream analyses of isolated cells by fluorescence microscopy not only confirmed expression of relevant cancer markers, but also revealed tight binding of magnetic beads to the cell surface (see also Figure 1C). Regarding the size of the used T1 beads (1 μ m) and an average diameter of CTCs between 10–12 μ m [28], the surface of a cancer cell could theoretically be covered with 300–450 magnetic beads suggesting severe consequences for cell integrity and viability. However, we observed that isolated CTCs are not completely

covered with beads, and preliminary studies revealed that re-attachment and cultivation of isolated cells is not excluded, albeit very challenging (see Supplementary Figure S5). Here, additional washing and bead detachment steps, as well as careful adjustments of cell cultivation, such as the use of preconditioned medium and collagen-coated slides, are necessary to receive viable and proliferating cells. Due to the highly versatile construction and design of the device, it is possible to implement such additional purification steps to the automated IsoMAG protocol. Moreover, the biocompatibility of micro/nanocarriers may be affected by biomolecule corona formation [26,42,43]. It is accepted that when micro/nanocarriers enter physiological environments, proteins and other biomolecules bind to their surfaces, leading to the rapid formation of a biomolecule corona [44]. The corona may be critically co-defining the biological, medical, biotechnological and pathophysiological identity of micro/nanocarriers, although the mechanistic details have not been resolved in detail [45,46].

As an additional relevant factor, reduction of background white blood cells is mandatory for the establishment of a reliable protocol allowing downstream single-cell analysis. In summary, our study shows that using the optimized protocol for IsoMAG tumor cells from patient samples can be enriched and detected in a semi-automated process combined with a reduction of white blood cells (WBC) starting from a large volume (7.5 mL). The broad scattering of WBC counts we observed could depend on a naturally different blood cell count between healthy individuals. It is conceivable that the WBC count could be a hindrance to nucleic acid-based downstream applications at this point due to enforced background noise. A purity of at least 50% is recommended for proper genomic analysis, whereas in our small patient screening, a vast percentage of total output cells was WBCs. On an average, we were able to isolate 84 potential CTCs from three patient samples, while EpCAM-based enrichment entailed a bycatch of ~1200 WBCs. Nevertheless, the relatively low number of 10^3 WBCs (compared to 10^7 WBCs/mL in healthy adults) enabled immunofluorescent assessment of the patient isolates and marker-based distinction between potential CTCs and WBCs to deliver a ready-to-use assay in an otorhinolaryngology lab environment. In comparison, a similar WBC bycatch of over 800 cells/sample was described for CellSearch[®] [47], whereas size-based Parsortix[®] delivers purity grades ranging from 29–97% depending on the study [48,49].

To address downstream analysis, subsequent microfluidic cell sorting of the IsoMAG isolates, manual cell picking or aspiration technologies such as the ALS CellCelector[™] are appropriate tools to improve signal-to-noise ratio for transcriptomic analysis. We already started implementing IsoMAG in an in-house developed microfluidic single-cell-sorting workflow resulting in a purity of $\geq 75\%$ (Supplementary Figure S6). By aspirating only dispensed droplets that contain fluorescent cells for RNA isolation, we obtained promising PCR results detecting even small numbers of EpCAM+ tumor cells with low WBC background signal. These findings underline that (immunomagnetic) pre-enrichment of the CTCs by IsoMAG is an indispensable prerequisite for microfluidic cell sorting and downstream CTC analysis.

Interestingly, during protocol establishment we observed cell recovery rates of $>100\%$. This was likely due to false positive panCK or false negative CD45 staining which has been optimized during establishment. However, our automated protocol combines both a high efficiency of cell recovery as well as a low rate of WBC contamination.

Furthermore, in the presented study we could also show that the established method is adaptable to the detection of EpCAM-, as well as CSV-positive subpopulation of CTCs. Typically, immunomagnetic cell isolation devices use epithelial markers, mostly EpCAM, for CTC detection neglecting the fact that cancer cells undergo morphological changes during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and the reverse process (MET). Importantly EMT/MET which takes place during entry and transport in the blood stream is accompanied by up- and downregulation of surface markers used for CTC detection, such as EpCAM, N-/E-Cadherine, and cell-surface vimentin [50]. Thus, in contrast to other commercial systems we are able to capture cells exhibiting not only epithelial, but

also mesenchymal and/or an intermediate phenotype. Preliminary data combining beads targeting EpCAM as well as CSV for automated cell enrichment were also promising but have to be confirmed in larger studies to assess the added value of using multiple markers for HNSCC.

In our small patient screening study, we were able to isolate 74 to 93 potential CTCs with the optimized protocol. Previous studies applying different methods for CTCs detection in HNSCC revealed a broad range of enumerated cells. Whereas Grisanti et al. detected 0–2 CTCs in 16–40% of the patients using the CellSearch[®] platform [51], manual enumeration of immunofluorescent stained cells resulted in higher CTC numbers (0–37 CTCs/1000 PBMC) [18]. Despite the broad ranges of detected CTCs, the obtained results of our IsoMAG IMS unit are in the order of previous studies combined with low numbers of leukocyte contamination. We could also observe a slight tendency for an increasing CTC number in T4 staged tumors compared to T1–3 as described previously [16,18]. Of course, these results have to be interpreted with caution because the small number of patients does not allow reliable assessment. This observation and the fact that a high mortality rate of HNSCC patients correlates to late diagnosis show the necessity of an early and reliable detection method of CTCs. Semi-automated detection of CTCs such as IsoMAG has the potential to be related as a standardized part of liquid biopsy with the advantages of real-time personalized analysis in combination with non-invasiveness and individual prognostic therapy [15].

Taken together, there are several findings of this study underlining the advantages of the IsoMAG device compared to other immunomagnetic isolation methods. Whereas CellSearch[®] is marketed relying only on epithelial targeting of preserved cells in the CELLTRACKS[®] AUTOPREP[®] System and requires centrifugation [52], the IsoMAG protocol allows highly flexible targeting of viable CTCs without blood pre-processing. Implementation into the CTCelect workflow in future will allow downstream single-cell analysis and cell cultivation. The general major advantage of automated cell isolation in contrast to manual enrichment consists of standardizing protocols and preventing human errors while reducing costs and hands-on time. Commercial magnetic cell separation devices, i.e., an autoMACS[®] Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were strongly improved over the last few years but were mostly marketed to isolate abundant cell populations, rather than rare cells such as CTCs. With regard to the long-term goal of a low-cost diagnostic test, IsoMAG was characterized with in-house functionalized EpCAM beads minimizing material expenses to 35 EUR per 7.5 mL blood compared to 102 EUR for Miltenyi StraightFrom[®] Whole Blood CD326 MicroBeads. Conclusively, the overall aim of our study is the implementation of IsoMAG IMS unit as a core unit of the CTCelect for the fully automated isolation of single CTCs without sample preparation. Due to urgently needed low cost minimally invasive diagnostics methods in the clinical routine, allowing the sensitive and reliable detection of tumor components in patients' blood, the establishment of our IsoMAG IMS unit of CTCelect also represents a technology for single cell isolation and comprehensive downstream “omics”-based analyses. Such approaches will deepen our understanding of CTC pathobiology, a prerequisite for improved treatments and management of cancer patients in the future.

5. Conclusions

Here, the automated IsoMAG IMS unit was thoroughly characterized as a reliable, economic, and straightforward technology for automated and reproducible CTC detection and enrichment. In addition, the IsoMAG IMS system was shown to allow the use of variable cancer/CTC markers, such as cell surface vimentin. Its flexibility can be tailored to the user's specific needs for various malignancies and/or cell types. Future developments aim to combine immunomagnetic separation with microfluidic devices to further improve the power of automated immunomagnetic cell isolation devices for research and the clinics.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics11112040/s1>: Figure S1: Recovery rates of different cancer cell lines; Figure S2: Gel

electrophoresis of EpCAM RT-qPCR products from SCL-1 single cell RNA; Figure S3: Expression of EpCAM protein (A and B) and CSV (C and D) in HNSCCUM-02T; Figure S4: Potential CTCs could be enriched from whole blood of a HNSCC patient using EpCAM- and CSV beads; Figure S5: Brightfield microscopic images of HNSCCUM-02T cells cultivated after immunomagnetic isolation; Figure S6: Establishment of CTSelect unit improves purity of isolated tumor cells from whole blood; Table S1: Detailed protocol of IsoMAG isolation procedure.

Author Contributions: Conceptualization, A.G., J.S., C.F. and D.G.; methodology, A.G., J.S., L.L., S.M.N. and J.H.; validation and formal analysis, A.G., J.S., M.W., C.F. and D.G.; investigation, A.G., J.S., L.L., S.M.N. and M.W.; resources, R.H.S., C.F. and D.G.; data curation, A.G., J.S., C.F. and D.G.; writing, review and editing, A.G., J.S., M.W., J.K., J.H., R.H.S., C.F. and D.G.; visualization, A.G., J.S., C.F. and D.G.; project supervision and administration, R.H.S., C.F. and D.G.; funding acquisition, A.G. and D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work was supported by the Brigitte and Konstanze Wegener Stiftung, DFG, STFKH, intramural Funding of the University Medical Center Mainz, and by the Federal Ministry of Education and Research (131A020B; 03VP01061).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the local ethics committee (ref.no. 837.485.15 (10253); date 01/29/2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: The authors acknowledge Michael Baßler, Sabine Alebrand and all the team members of Fraunhofer IMM involved in the development of the IsoMAG IMS device. The authors would like to thank Ralf Himmelreich and Lisa Schott for their work, and Tom Teichmann for the preliminary experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kunzel, J.; Gribko, A.; Lu, Q.; Stauber, R.H.; Wunsch, D. Nanomedical detection and downstream analysis of circulating tumor cells in head and neck patients. *Biol. Chem.* **2019**, *400*, 1465–1479. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Gül, D.; Habtemichael, N.; Dietrich, D.; Dietrich, J.; Gößwein, D.; Khamis, A.; Deuss, E.; Kunzel, J.; Schneider, G.; Strieth, S.; et al. Identification of cytokeratin24 as a tumor suppressor for the management of head and neck cancer. *Biol. Chem.* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Siemer, S.; Fauth, T.; Scholz, P.; Al-Zamel, Y.; Khamis, A.; Gül, D.; Freudelsperger, L.; Wollenberg, B.; Becker, S.; Stauber, R.H.; et al. Profiling Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer: A Critical Role of the VRAC Ion Channel for Chemoresistance. *Cancers* **2021**, *13*, 4831. [\[CrossRef\]](#)
4. Beltz, A.; Gosswein, D.; Zimmer, S.; Limburg, I.; Wunsch, D.; Gribko, A.; Deichelbohrer, M.; Hagemann, J.; Stauber, R.H.; Kunzel, J. Staging of oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck: Prognostic features and power of the 8th edition of the UICC staging manual. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2019**, *45*, 1046–1053. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Kiweler, N.; Wunsch, D.; Wirth, M.; Mahendrarajah, N.; Schneider, G.; Stauber, R.H.; Brenner, W.; Butter, F.; Kramer, O.H. Histone deacetylase inhibitors dysregulate DNA repair proteins and antagonize metastasis-associated processes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2020**, *146*, 343–356. [\[CrossRef\]](#)
6. Hu, Y.; Yu, X.; Xu, G.; Liu, S. Metastasis: An early event in cancer progression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 745–757. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Park, S.-Y.; Nam, J.-S. The force awakens: Metastatic dormant cancer cells. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 569–581. [\[CrossRef\]](#)
8. Ashworth, T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australas. Med. J.* **1869**, *14*, 146–147.
9. Murray, N.P.; Albarran, V.; Perez, G.; Villalon, R.; Ruiz, A. Secondary Circulating Tumor Cells (CTCs) but not Primary CTCs are Associated with the Clinico-Pathological Parameters in Chilean Patients With Colo-Rectal Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2015**, *16*, 4745–4749. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Wendel, M.; Bazhenova, L.; Boshuizen, R.; Kolatkar, A.; Honnatti, M.; Cho, E.H.; Marrinucci, D.; Sandhu, A.; Perricone, A.; Thistlethwaite, P.; et al. Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early-and late-stage non-small cell lung cancer: A glimpse into lung cancer biology. *Phys. Biol.* **2012**, *9*, 016005. [\[CrossRef\]](#)

11. Engel, H.; Kleespies, C.; Friedrich, J.; Breidenbach, M.; Kallenborn, A.; Schondorf, T.; Kolhagen, H.; Mallmann, P. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 1165–1173. [\[CrossRef\]](#)
12. Jaeger, B.A.; Jueckstock, J.; Andergassen, U.; Salmen, J.; Schochter, F.; Fink, V.; Alunni-Fabbroni, M.; Rezai, M.; Beck, T.; Beckmann, M.W.; et al. Evaluation of two different analytical methods for circulating tumor cell detection in peripheral blood of patients with primary breast cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 491459. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Mocellin, S.; Hoon, D.; Ambrosi, A.; Nitti, D.; Rossi, C.R. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 4605–4613. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. de Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, R.B.; Parker, C.; Miller, M.C.; Tissing, H.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.; Pienta, K.J.; Raghavan, D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6302–6309. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhou, S.; Wang, L.; Zhang, W.; Liu, F.; Zhang, Y.; Jiang, B.; Wang, J.; Yuan, H. Circulating Tumor Cells Correlate With Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2021**, *20*, 1533033821990037. [\[CrossRef\]](#)
16. Kulasinghe, A.; Perry, C.; Jovanovic, L.; Nelson, C.; Punyadeera, C. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 2515–2523. [\[CrossRef\]](#)
17. Muller, V.; Stahmann, N.; Riethdorf, S.; Rau, T.; Zabel, T.; Goetz, A.; Janicke, F.; Pantel, K. Circulating tumor cells in breast cancer: Correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3678–3685. [\[CrossRef\]](#)
18. Weller, P.; Nel, I.; Hassenkamp, P.; Gauler, T.; Schlueter, A.; Lang, S.; Dountsop, P.; Hoffmann, A.C.; Lehnerdt, G. Detection of circulating tumor cell subpopulations in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113706. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Pantel, K.; Alix-Panabieres, C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 398–406. [\[CrossRef\]](#)
20. Pérez-Barrios, C.; Nieto-Alcolado, I.; Torrente, M.; Jiménez-Sánchez, C.; Calvo, V.; Gutierrez-Sanz, L.; Palka, M.; Donoso-Navarro, E.; Provencio, M.; Romero, A. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: Impact on biomarker testing. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, *5*, 665–672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Cristofanilli, M.; Broglio, K.R.; Guarneri, V.; Jackson, S.; Fritsche, H.A.; Islam, R.; Dawood, S.; Reuben, J.M.; Kau, S.W.; Lara, J.M.; et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Biologic staging beyond tumor burden. *Clin. Breast Cancer* **2007**, *7*, 471–479. [\[CrossRef\]](#)
22. Tinhofer, I.; Staudte, S. Circulating tumor cells as biomarkers in head and neck cancer: Recent advances and future outlook. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2018**, *18*, 897–906. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Satelli, A.; Mitra, A.; Brownlee, Z.; Xia, X.; Bellister, S.; Overman, M.J.; Kopetz, S.; Ellis, L.M.; Meng, Q.H.; Li, S. Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 899–906. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Reisbeck, M.; Richter, L.; Helou, M.J.; Arlinghaus, S.; Anton, B.; van Dommelen, I.; Nitzsche, M.; Baßler, M.; Kappes, B.; Friedrich, O.; et al. Hybrid integration of scalable mechanical and magnetophoretic focusing for magnetic flow cytometry. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *109*, 98–108. [\[CrossRef\]](#)
25. Gribko, A.; Kunzel, J.; Wunsch, D.; Lu, Q.; Nagel, S.M.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H.; Ding, G.B. Is small smarter? Nanomaterial-based detection and elimination of circulating tumor cells: Current knowledge and perspectives. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 4187–4209. [\[CrossRef\]](#)
26. Siemer, S.; Wunsch, D.; Khamis, A.; Lu, Q.; Scherberich, A.; Filippi, M.; Krafft, M.P.; Hagemann, J.; Weiss, C.; Ding, G.B.; et al. Nano Meets Micro-Translational Nanotechnology in Medicine: Nano-Based Applications for Early Tumor Detection and Therapy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 383. [\[CrossRef\]](#)
27. Rauscher, H.; Sokull-Kluttgen, B.; Stamm, H. The European Commission’s recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 1195–1197. [\[CrossRef\]](#)
28. Shashni, B.; Ariyasu, S.; Takeda, R.; Suzuki, T.; Shiina, S.; Akimoto, K.; Maeda, T.; Aikawa, N.; Abe, R.; Osaki, T.; et al. Size-Based Differentiation of Cancer and Normal Cells by a Particle Size Analyzer Assisted by a Cell-Recognition PC Software. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, *41*, 487–503. [\[CrossRef\]](#)
29. Nichols, A.C.; Lowes, L.E.; Szeto, C.C.; Basmaji, J.; Dhaliwal, S.; Chapeskie, C.; Todorovic, B.; Read, N.; Venkatesan, V.; Hammond, A.; et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck* **2012**, *34*, 1440–1444. [\[CrossRef\]](#)
30. Riethdorf, S.; Fritsche, H.; Muller, V.; Rau, T.; Schindlbeck, C.; Rack, B.; Janni, W.; Coith, C.; Beck, K.; Janicke, F.; et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 920–928. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Riethdorf, S.; O’Flaherty, L.; Hille, C.; Pantel, K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *125*, 102–121. [\[CrossRef\]](#)
32. Obayashi, K.; Akatsuka, J.; Endo, Y.; Takeda, H.; Hayashi, T.; Toyama, Y.; Suzuki, Y.; Hamasaki, T.; Kimura, G.; Ohnaga, T.; et al. Initial detection of circulating tumor cells from metastatic prostate cancer patients with a novel small device. *Prostate Int.* **2019**, *7*, 131–138. [\[CrossRef\]](#)

33. Boukamp, P.; Tilgen, W.; Dzarlieva, R.T.; Breitkreutz, D.; Haag, D.; Riehl, R.K.; Bohnert, A.; Fusenig, N.E. Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J. Natl. Cancer Inst.* **1982**, *68*, 415–427.
34. Welkoborsky, H.J.; Jacob, R.; Riazimand, S.H.; Bernauer, H.S.; Mann, W.J. Molecular biologic characteristics of seven new cell lines of squamous cell carcinomas of the head and neck and comparison to fresh tumor tissue. *Oncology* **2003**, *65*, 60–71. [\[CrossRef\]](#)
35. Gribko, A.; Hahlbrock, A.; Strieth, S.; Becker, S.; Hagemann, J.; Deichelbohrer, M.; Hildebrandt, A.; Habtemichael, N.; Wunsch, D. Disease-relevant signalling-pathways in head and neck cancer: Taspase1's proteolytic activity fine-tunes TFIIA function. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14937. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Goesswein, D.; Habtemichael, N.; Gerhold-Ay, A.; Mazur, J.; Wunsch, D.; Knauer, S.K.; Kunzel, J.; Matthias, C.; Strieth, S.; Stauber, R.H. Expressional analysis of disease-relevant signalling-pathways in primary tumours and metastasis of head and neck cancers. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7326. [\[CrossRef\]](#)
37. Wünsch, D.; Hahlbrock, A.; Heiselmayer, C.; Backer, S.; Heun, P.; Goesswein, D.; Stocker, W.; Schirmeister, T.; Schneider, G.; Kramer, O.H.; et al. Fly versus man: Evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of *Drosophila*'s Taspase1. *FASEB J.* **2015**, *29*, 1973–1985. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Deuss, E.; Gosswein, D.; Gul, D.; Zimmer, S.; Foersch, S.; Eger, C.S.; Limburg, I.; Stauber, R.H.; Kunzel, J. Growth Factor Receptor Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Cancer: Her1-4 and c-Met in Conjunction with the Clinical Features and Human Papillomavirus (p16) Status. *Cancers* **2020**, *12*, 3358. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Barak, V.; Goike, H.; Panaretakis, K.W.; Einarsson, R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 529–540. [\[CrossRef\]](#)
40. Foddai, A.; Elliott, C.T.; Grant, I.R. Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7550–7558. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Foddai, A.C.G.; Grant, I.R. A novel one-day phage-based test for rapid detection and enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cows' milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 9399–9412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Siemer, S.; Westmeier, D.; Barz, M.; Eckrich, J.; Wunsch, D.; Seckert, C.; Thyssen, C.; Schilling, O.; Hasenberg, M.; Pang, C.; et al. Biomolecule-corona formation confers resistance of bacteria to nanoparticle-induced killing: Implications for the design of improved nanoantibiotics. *Biomaterials* **2018**, *192*, 551–559. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Hussain, T.; Gellrich, D.; Siemer, S.; Reichel, C.A.; Eckrich, J.; Dietrich, D.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H.; Strieth, S. TNF-alpha-Inhibition Improves the Biocompatibility of Porous Polyethylene Implants In Vivo. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2021**, *18*, 297–303. [\[CrossRef\]](#)
44. Westmeier, D.; Siemer, S.; Vallet, C.; Steinmann, J.; Docter, D.; Buer, J.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H. Boosting nanotoxicity to combat multidrug-resistant bacteria in pathophysiological environments. *Nanoscale Adv.* **2020**, *2*, 5428–5440. [\[CrossRef\]](#)
45. Stauber, R.H.; Siemer, S.; Becker, S.; Ding, G.B.; Strieth, S.; Knauer, S.K. Small Meets Smaller: Effects of Nanomaterials on Microbial Biology, Pathology, and Ecology. *ACS Nano* **2018**, *12*, 6351–6359. [\[CrossRef\]](#)
46. Stauber, R.H.; Westmeier, D.; Wandrey, M.; Becker, S.; Docter, D.; Ding, G.B.; Thines, E.; Knauer, S.K.; Siemer, S. Mechanisms of nanotoxicity—Biomolecule coronas protect pathological fungi against nanoparticle-based eradication. *Nanotoxicology* **2020**, *14*, 1157–1174. [\[CrossRef\]](#)
47. Sieuwerts, A.M.; Kraan, J.; Bolt-de Vries, J.; van der Spoel, P.; Mostert, B.; Martens, J.W.; Gratama, J.W.; Sleijfer, S.; Foekens, J.A. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *118*, 455–468. [\[CrossRef\]](#)
48. Chudziak, J.; Burt, D.J.; Mohan, S.; Rothwell, D.G.; Mesquita, B.; Antonello, J.; Dalby, S.; Ayub, M.; Priest, L.; Carter, L.; et al. Clinical evaluation of a novel microfluidic device for epitope-independent enrichment of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. *Analyst* **2016**, *141*, 669–678. [\[CrossRef\]](#)
49. Ciccioli, M.; Bravo-Santano, N.; Davis, A.; Lewis, J.; Malcolm, R.; Pailhes-Jimenez, A.S. Mesenchymal markers: The new avenue for circulating tumor cells detection. In Proceedings of the ANGLE plc AACR 2021, Virtual Meeting, 9–14 April 2021.
50. Grover, P.K.; Cummins, A.G.; Price, T.J.; Roberts-Thomson, I.C.; Hardingham, J.E. Circulating tumour cells: The evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, 1506–1516. [\[CrossRef\]](#)
51. Grisanti, S.; Almici, C.; Consoli, F.; Buglione, M.; Verardi, R.; Bolzoni-Villaret, A.; Bianchetti, A.; Ciccicarese, C.; Mangoni, M.; Ferrari, L.; et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: Prognostic and predictive significance. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103918. [\[CrossRef\]](#)
52. Menarini Silicon Biosystems Inc. Available online: https://documents.cellsearchctc.com/pdf/e631600006/e631600006_EN.pdf (accessed on 10 October 2021).

4.9.1. Kultivierungsversuch von einzelnen Zellen

Als weiterführendes Projekt soll eine Möglichkeit gefunden werden, eine Kultivierung von isolierten einzelnen Tumorzellen zu erreichen, sowie eine Verbesserung der Färbung isolierter Zellen zum Zweck einer qualitativ genauen Analyse. Für den Versuch der Kultivierung von einzelnen Zellen werden 6 Zellen pro Slide gefangen und unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert.

1. Konditioniertes Medium
2. Medium + 30 % FCS
3. Medium + 10 % FCS + 10 ng/ml EGF + 10 ng/ml FGF
4. Medium + 10 % FCS + 10 ng/ml EGF + 20 ng/ml FGF

Für konditioniertes Medium wird das „alte“ Medium einer Erhaltungskultur entnommen und abzentrifugiert. Der Überstand wird im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium gemischt und auf die Zellen des Kultivierungsversuchs gegeben. Unter Punkt 3 und 4 wird immer im Wechsel alle 24 Stunden das Medium gewechselt bzw. die Wachstumsfaktoren hinzugefügt.

Unter Bedingung 1 (konditioniertes Medium) sind die Zellen am besten gewachsen. Es sind Zellcluster und vereinzelte Zellen im Slide erkennbar. Unter Bedingung 2 sind die Zellen ebenfalls gewachsen unter Ausbildung von Zellclustern, allerdings sind deutlich weniger Zellen erkennbar als in dem Kultivierungsslide mit Bedingung 1. Bedingung 3 und 4 haben keine Kultivierung ermöglicht.

Um die Bedingung 1 für die Kultivierung zu kontrollieren und weiter zu verbessern, wird die Kultivierung mit 5 und 10 Zellen pro Slide wiederholt und das konditionierte Medium aus 1/3 „altem“ Medium und 2/3 frischem Medium hergestellt.

4.9.2 Wachstum von einzeln gefangenen Zellen im Slide

Um die Kultivierung von einzelnen Zellen in einem Slide zu ermöglichen, werden die Kultivierungsbedingungen stetig verbessert.

Der Slide mit ursprünglich 5 gefangenen Zellen zeigt ein Wachstum von Zellen am Sliderand entlang sowie mittig im Slide. Die Zellen sind in beiden Slides in einem Zellgeflecht gewachsen. Bei einer Kultivierung von einzeln gefangenen Zellen über die Dauer von 7– 10 Tagen sterben einzeln gewachsene Zellen im Slide ab. Ein Zellengeflecht allerdings überlebt und wächst weiter. Um den Zellen das Zusammenfinden in einem Slide zu ermöglichen, wird auf ein kleines Volumen skaliert und testweise die iBidi Angiogenese-Slides

verwendet. Der Angiogenese-Slide führte trotz des deutlich reduzierten Flüssigkeitsvolumens und der geringeren Fläche nicht zu einem verbesserten Haften und Ansiedeln einzelner Zellen.

Um den Zellen eine anhaftendere Oberfläche zum Anwachsen zu bieten, werden für die Kultivierung mit Collagen beschichtete Slides verwendet. Die Slides werden zusätzlich mit konditioniertem Medium bei 37°C vorinkubiert (Abbildung 18 A–C).

4.9.3 Kultivierung von Antikörper-gelabelten Zellen

Bei der Ablösung des Flow Comp Flexi Kits werden die Beads, die über die DSB-X-Bindestelle am Antikörper gebunden sind, gelöst. Der Antikörper verbleibt somit an den Zellen. Um auszuschließen, dass der gebundene Antikörper die Zellanhaftung an den Slides verhindert, werden 25 einzeln gefangene Zellen mit dem DSB-X-Antikörper gekoppelt und anschließend zur Kultivierung in Slides überführt. Eine Kontrolle nach 72 Stunden bestätigt ein gutes Anwachsen der Zellen an den Slideboden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die verbleibende Antikörperbindung keine Behinderung darstellt (Abbildung 18D).

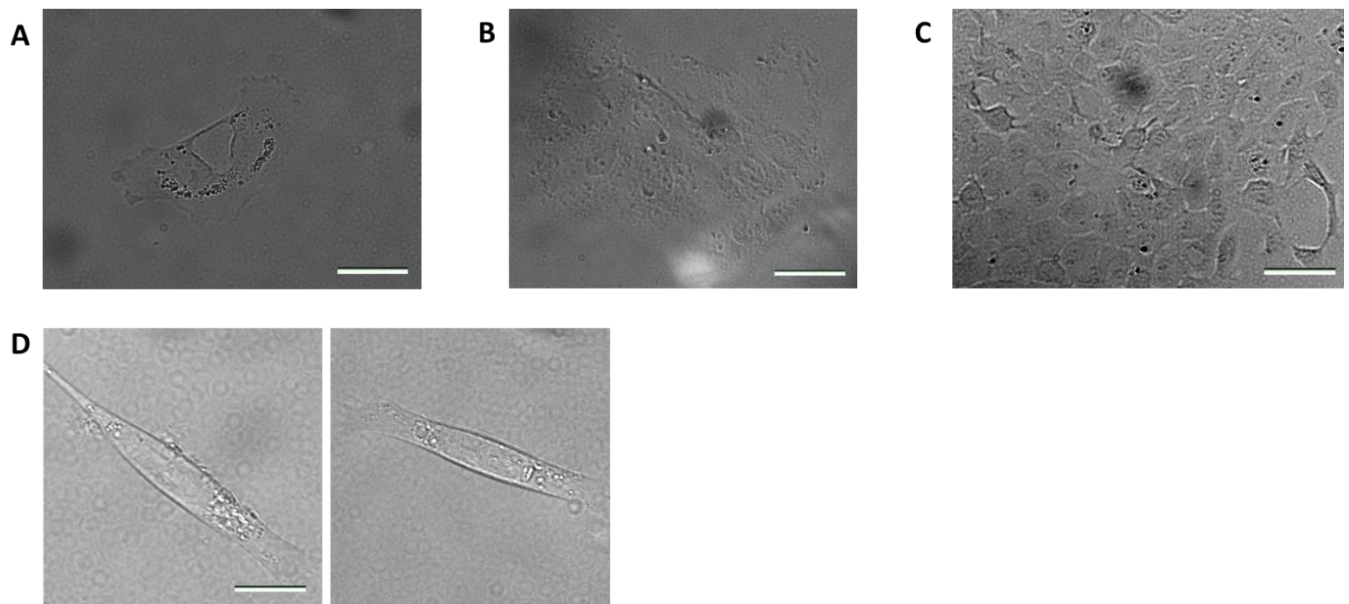


Abbildung 18: Lebendzellaufnahmen von Zellenkultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Aufnahmen von HNSCCUM-02T-Zellen bei Kultivierungsversuchen von Einzel-Zell-Aussiedlungen nach 4 Tagen (A), 7 Tagen (B) und 10 Tagen (C). Aufnahmen von HNSCCUM-02T-Zellen nach erfolgter Bead-Kopplung (D).

4.9.4 Kultivierung von Zellen auf MEF-Rasen

Um einzelnen Zellen eine verbesserte Haftung zu geben und die Umgebung bei der Metastasenbildung des Körpers besser nachahmen zu können, wird testweise versucht, Zellen auf einem Rasen von MEFs wachsen zu lassen. Die MEFs werden dafür im Slide ausgesät und bis zu einer nahezu vollständigen Konfluenz kultiviert. Anschließend werden jeweils pro Slide einzeln gefangene Zellen und mit einem schwachen Magneten isolierte Zellen gesetzt.

In einem weiteren Versuch werden 20 Zellen in Blut eines gesunden Donors gespiked und anschließend nach dem Standard-Isolationsprotokoll isoliert. Nach dem Ablösungsschritt werden die Zellen mit CFSE gefärbt und auf den MEF-Rasen gegeben.

Durch die Inkubation der isolierten Zellen mit den MEFs wurden diese ebenfalls allmählich gefärbt, sodass eine Unterscheidung ausschließlich unmittelbar nach der Zugabe möglich ist. Im Rahmen der Kultivierung kann man sich die Position der auf die MEFs abgesetzten isolierten Zellen merken und bei voranschreitender Proliferation picken. Die MEFs überwachsen allerdings die anderen Zellen in zu kurzer Zeit, sodass die isolierten Zellen nicht vor Beginn der Proliferation gepickt werden können.

4.10 Etablierung des Flow Comp Flexi Kits

Das Flow Comp Flexi Kit wird etabliert, um die Zellen nach der Isolation von den magnetischen Beads wieder ablösen zu können, um diese Zellen weiter zu kultivieren.

Das in Abschnitt 3.5.6 beschriebene Protokoll wird nach Herstellerangaben zunächst mit einer Zellmenge von 1000 Zellen durchgeführt. Nach durchgeführter Isolation sind kaum Zellen im Überstand zu finden, sondern befinden sich im Slide mit den Beads. Um zu klären, ob der Ablöseschritt der Beads von dem DSB-X-Antikörper nicht funktioniert oder ob die Zellen zwischen den Beads während der magnetischen Separation eingeschlossen bleiben, folgen Änderungen des Herstellerprotokolls.

Zunächst wird das Protokoll des Herstellers, wie in Abschnitt 3.5.6 beschrieben, auf die standardisierte Verwendung der Zellisolation abgestimmt: Es werden 20 Zellen gefangen und in 500 µl Medium aufgenommen. Nach Zugabe des DSB-X-Antikörpers wird die Inkubationszeit von 10 auf 30 Minuten verlängert, um die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von Antikörper und Zelle zu erhöhen. Um ein Absetzen der Zellen auf dem Boden zu verhindern, wird innerhalb der Inkubationszeit immer wieder invertiert. Anschließend werden anstelle von 2 ml lediglich 500 µl Isolationspuffer hinzugefügt. Der

darauffolgende Zentrifugationsschritt bleibt wie angegeben bestehen, genauso wie das Resuspendieren des Zellpellets mit 1 ml Isolationspuffer. Die Zugabe von 75 µl Dynabeads wird durch ein Beadvolumen von 50 µl ersetzt und die folgende Inkubationszeit wird erneut von 15 auf 30 Minuten verlängert und durch ein wiederholtes Invertieren ersetzt. Die darauffolgende magnetische Separationszeit wird von 2 auf 7 Minuten erhöht. Die Waschschriffe werden wie angegeben durchgeführt. Um die Bindung der Zellen an den DSB-X-Antikörper und die Beads zu kontrollieren, werden die Zellen nach dem letzten Waschschriff in einen Slide überführt und dort 20 Minuten mit Cell Mask inkubiert. Mittels dieser Färbung kann unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops die Zellzahl kontrolliert werden.

Nach der Zellzahlkontrolle werden die Zellen erneut in ein Epi überführt und nach Zugabe von 1 ml Isolationspuffer 7 Minuten lang magnetisch separiert. Nach der Entnahme des Überstandes wird 1 ml des Releasepuffers hinzugefügt und für 30 Minuten mit wiederholtem Invertieren inkubiert. Nach dem 10-maligen Auf- und Abpipettieren wird die magnetische Separation erneut von 1 auf 7 Minuten verlängert. Der Überstand wird in ein neues Epi überführt und die magnetische Separation noch zwei Mal wiederholt, um möglichst viele Beads aus dem Überstand zu entfernen. Am Ende wird der Überstand für 10 Minuten bei 350 xg zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Medium resuspendiert und in ein Slide überführt.

Die Bindung der Zellen an den DSB-X-Antikörper und an die Beads funktioniert. In Abbildung 19 B sind an Beads gebundene Zellen nachweislich erkennbar. Allerdings befinden sich die Zellen nach der Ablöse-Prozedur immer noch zum größten Teil im Slide mit den Beads. Es sind wenige Zellen im Überstand zu finden, sodass man davon ausgehen kann, dass die Ablösung der Beads durch die Zugabe des Releasepuffers funktioniert (Abbildung 19 A). Allerdings besteht das Problem des Einschlusses von Zellen zwischen den Beads während der magnetischen Separation. Die Verwendung einer sehr geringen Zellzahl in Relation zu der Menge an Beads scheint für den Ablösungsprozess ein Problem darzustellen, da die sehr große Beadmenge die Zellen während des Ablöseprozesses auf der Magnetseite einzuschließen scheint. Der Magnet scheint zudem sehr stark zu sein, sodass weitere Änderungen notwendig sind - vor allem in Bezug auf die Verwendung eines schwächeren Magneten.

Die magnetische Separation des Ablöse-Schrittes wird mittels eigens angefertigter Konstruktion aus drei Küchenmagneten durchgeführt. Nach Zugabe des Releasepuffers wird innerhalb einer 10-minütigen Inkubationszeit die Puffer-Zellsuspension ganz langsam auf- und abpipettiert und fünf Mal in ein neues Epi überführt, sodass eine milde und langsame Form der Ablösung durchgeführt werden kann. Beim letzten Schritt wird die Puffer-Zellsuspension nochmal kurz mit starken Magneten separiert, um Verunreinigungen mit den Beads zu minimieren. Mit dieser Technik der schwachen und langsamen Magnetseparation

befinden sich die Zellen im Überstand, sind jedoch sehr stark gestresst und setzen sich nur sehr langsam im Slide ab (Abbildung 19 C). Die Beobachtung der Zellen über sieben Tage zeigte keine überlebenden Zellen. Im Anschluss konnte die Überlebensrate der Zellen durch die Zugabe von konditioniertem Medium verbessert werden (Abbildung 19 D).

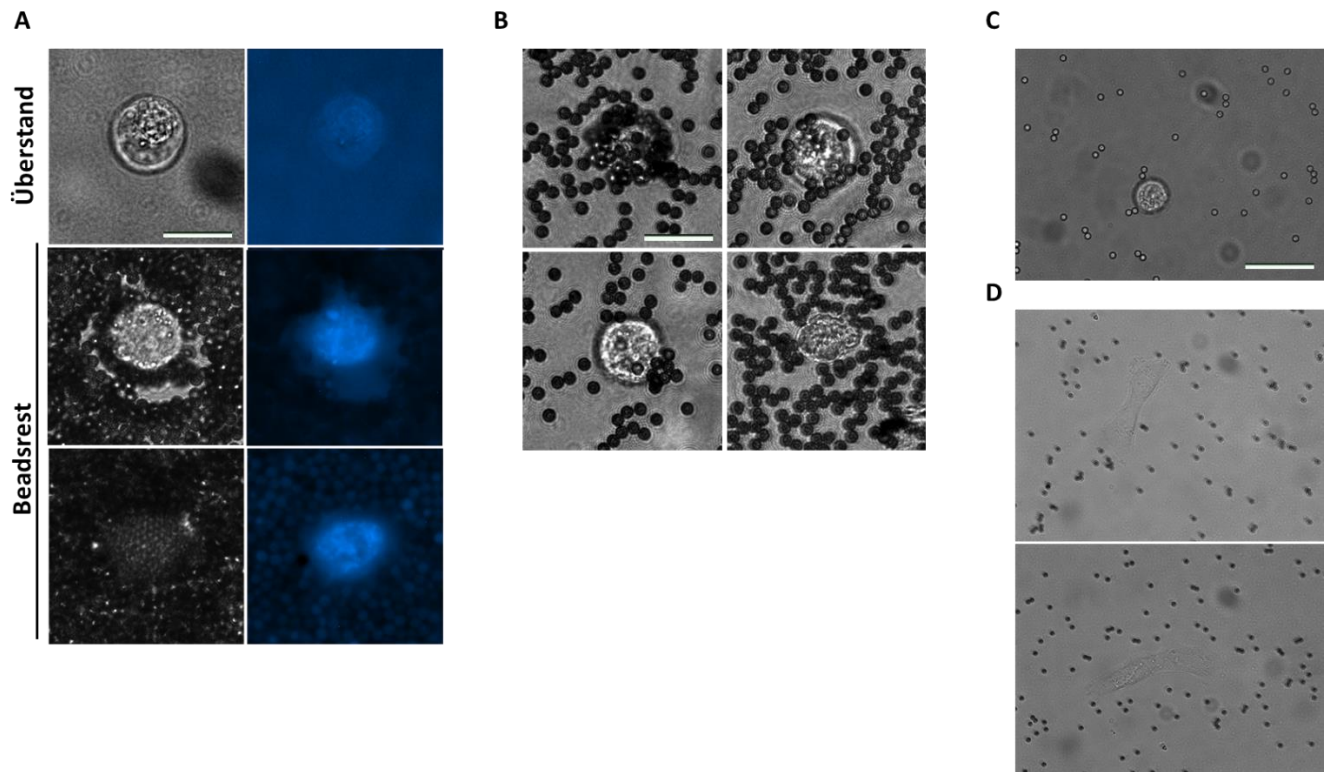


Abbildung 19: Positiv isolierte Zellen aus gespikter Probe mittels IsoMAG IMS Einheit

Aufnahmen von isolierten und vorab gespikten HNSCCUM-02T-Zellen in Blutproben eines „gesunden“ Donors. **A** Isolierte HNSCCUM-02T-Zelle im Überstand und eingeschlossene HNSCCUM-02T-Zellen im Beadsrest, gefärbt mit Cell Mask. **B** An Beads gekoppelte HNSCCUM-02T-Zellen. **C** Isolierte HNSCCUM-02T-Zellen mit der „milden Ablösung mittels selbstkreierten Küchenmagnet-Ensemble“ und **D** anschließende Kultivierung mit konditioniertem Medium. Maßstabsbalken 20 µm.

4.11 Flow Comp Flexi Kit in Verbindung mit IsoMAG IMS Einheit

Zukünftig soll die manuelle Isolation mit dem Flow Comp Flexi Kit automatisiert werden. Testweise wird ein Durchlauf des mit dem DSB-X-Antikörper und den Dynabeads mit dem Protokoll der IsoMAG IMS Einheit einmal gestartet. Für diesen Versuch werden 30 Zellen gefangen. Die manuelle Isolation wird nach Zugabe der Dynabeads beendet und die Probe für die weiteren Waschschrte und die magnetische

Isolation in die IsoMAG IMS Einheit gegeben. Die Ablöseprozedur wird anschließend wieder manuell durchgeführt. Das Protokoll der manuellen Isolation und der Isolation am Gerät wird für einen direkten Vergleich aufgelistet:

Manuelle Isolation

1. 25 µl DSB-X-Ab in 500 µl Zellsuspension
2-3 s vortexen
2. 10 min inkubieren (auf Eis)
3. 2 ml kalten IB hinzugeben
Zentrifugieren 350 xg, 10 min
4. Überstand entfernen
5. Hinzufügen von 1 ml IB
Resuspendieren
6. + 75 µl Dynabeads, vortexen 2-3 s
7. 15 min inkubieren
8. Waschen mit 1 ml IB (2-3x pip.)
9. Magnetseparation 2 min
10. Waschen mit 1 ml IB (2-3x pip.)
11. Magnetseparation 2 min
12. Waschen mit 1 ml IB (2-3x pip.)
13. Magnetseparation 2 min
14. in 1 ml Release Buffer resuspendieren
15. 10 min inkubieren
16. 10x pip.; Magnetseparation
17. Separation Küchenmagnet
18. Zellkultur in Slide überführen

Isolation mit IsoMAG IMS Einheit

1. 25 µl DSB-X-Ab in 500 µl Zellsuspension
2-3 s vortexen
2. 10 min inkubieren (auf Eis)
3. 2 ml kalten IB hinzugeben
Zentrifugieren 350 xg, 10 min
4. Überstand entfernen
5. Hinzufügen von 7,5 ml Medium
Resuspendieren
6. + 75 µl Dynabeads, mischen

Beginn der Isolation am Gerät

7. 30 min inkubieren
8. Waschen mit 5 ml IB (10 min)
9. Magnetseparation 10 min
10. Waschen mit 5 ml IB (10 min)
11. Magnetseparation 10 min
12. Waschen mit 4 ml (10 min)
13. Magnetseparation (ca. 7 min)
14. Waschen mit 1 ml IB
15. Ausgabe der Probe (1 ml)

Ende der Isolation am Gerät

16. Magnetseparation (5 min)
17. in 1 ml Release Buffer resuspendieren
18. 10 min inkubieren
19. 10x pip.; Magnetseparation
20. Separation Küchenmagnet
21. Zellkultur in Slide überführen

Die Zellen haben die Isolation am Gerät nicht überlebt, sodass man davon ausgehen kann, dass Zeit ein limitierender Faktor innerhalb des gesamten Vorgangs ist und das kürzere manuelle Protokoll in ein automatisiertes Programm für die IsoMAG IMS Einheit umgeschrieben werden muss.

4.11.1 Isolation von gespikten Zellen in Blut

Die Isolation von einzelnen Zellen aus einer Blutprobe ist mit deutlich erschwerten Bedingungen verbunden, sodass das Protokoll der Zellisolation mit dem Flow Comp Flexi Kit getestet werden muss. Einzeln gefangene Zellen werden in 7,5 ml Blut eines gesunden Donors gespiked. Nach der Zugabe von 25 μ l DSB-X-Antikörper wird die Probe 2-3 Sekunden lang gevortext und anschließend 10 Minuten bei wiederholtem Invertieren inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen für 10 Minuten bei 350 xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wird die Probe auf ein Volumen von 7,5 ml mit Isolationspuffer aufgefüllt und 75 μ l Dynabeads werden hinzugefügt. Die Probe wird erneut 2-3 Sekunden gevortext und für 15 Minuten bei wiederholtem Invertieren inkubiert. Im Anschluss erfolgen die Schritte der magnetischen Separation, sowie die Waschschrte mit einem immer kleiner werdenden Volumen von 1 x 4 ml und 2 x 1 ml des Isolationspuffers. Nach dem Waschen der Probe wird 1 ml Release-Puffer hinzugefügt und innerhalb von 10 Minuten in der Küchenmagnetkonstruktion immer wieder langsam auf- und abpipettiert. Der Überstand wird dabei jeweils fünfmal in ein frisches Epi überführt. Am Ende der Isolation wird der Überstand für 10 Minuten bei 350 xg zentrifugiert und in einem Volumen von 30 μ l konditioniertem Medium, bestehend aus 1/3 frischem Medium und 2/3 konditioniertem Medium, testweise in ein Angiogenese-Slide zu Kultivierungszwecken überführt.

Die Kontrolle des Angiogenes-Slides hat ergeben, dass alle 30 gespikten Zellen erfolgreich aus der Blutprobe isoliert werden konnten, allerdings sind die Zellen in dem Slide abgestorben.

Beim nächsten Versuch der Isolation einer gespikten Blutprobe wird für die Kultivierung der Zellen das Slide mit Collagen-Beschichtung verwendet.

Ein weiterer Versuch, 35 Zellen in Blut eines gesunden Donors zu spiken und zu isolieren, ergab eine erfolgreiche Isolation von allen gespikten Zellen. Zur Kultivierung wurden die isolierten Zellen in mit konditioniertem Medium vorinkubierte Collagen Slides überführt. Nach 7 Tagen Kultivierung waren die Zellen adhärent und proliferierten.

Eine Isolation mit einer geringen Zellzahl von 5 gespikten Zellen in Blut einer gesunden Donors war ebenfalls erfolgreich, da alle gespikten Zellen am Ende der Isolation wiedergefunden werden konnten. Diese Zellen haben nach einer Kontrolle von 7 Tagen nicht überlebt. Das Medium wurde in dieser Zwischenzeit einmal gewechselt.

4.11.2 Isolation mit CSV-DSB-X-Antikörper

Eine verbreitete Methode zur Erkennung von CTCs verschiedener Entitäten ist die Verwendung von EpCAM, eines spezifischen Markers für Epithelzellen. Obwohl CTCs ursprünglich epithelialen Ursprungs sind, durchlaufen sie häufig die EMT, die den Zellen mesenchymale Eigenschaften verleiht, wodurch sie beweglicher und invasiver werden. Dies hat zu einem langjährigen Widerspruch zwischen der auf EpCAM basierenden Identifikation von CTCs und der EMT-Theorie geführt.

Studien zeigen, dass eine hohe Vimentin-Expression – ein Marker für EMT – in Tumorgewebebiopsien als unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Anzahl von CTCs im peripheren Blut angesehen wird [158]. Eine erhöhte CTC-Anzahl scheint daher mit EMT in Verbindung zu stehen. Daraus ergibt sich die Annahme, dass CTCs eher einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen könnten. Die ausschließliche Nutzung von EpCAM könnte jedoch zu einer Unterschätzung der tatsächlichen CTC-Anzahl führen, da EpCAM-negative Zellen, die einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen und eine zentrale Rolle bei der Fernmetastasierung spielen könnten, nicht erfasst werden.

Um den Einsatz im Bereich Kopf-Hals-Tumore zu testen, werden 20 Zellen in 7,5 ml Blut eines gesunden Donors gespiked und mittels des Standard-Isolationsprotokolls mit dem CSV-DSB-X-Antikörper isoliert. In HNSCCUM-02T-Zellen wird der CSV-DSB-X-Antikörper an der gesamten Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 20 A) und auf Proteinbasis nachgewiesen (Abbildung 20 C). Das Integrieren des CSV-Antikörpers in die etablierte Methodik zur Isolation von CTCs zeigte positiv isolierte Zellen (Abbildung 20 B), die mit Hilfe der Detektion als Hoechst positiv, pan-Cytokeratin-PE positiv und CD-45-FITC negativ identifiziert werden konnten. Eine Verwechslung mit möglichen fälschlich isolierten Zellen des peripheren Bluts kann durch ein negativ ausfallendes Detektionsergebnis von THP1-Zellen (Monozyten und Makrophagen) mit dem CSV-Antikörper auf Proteinebene ausgeschlossen werden.

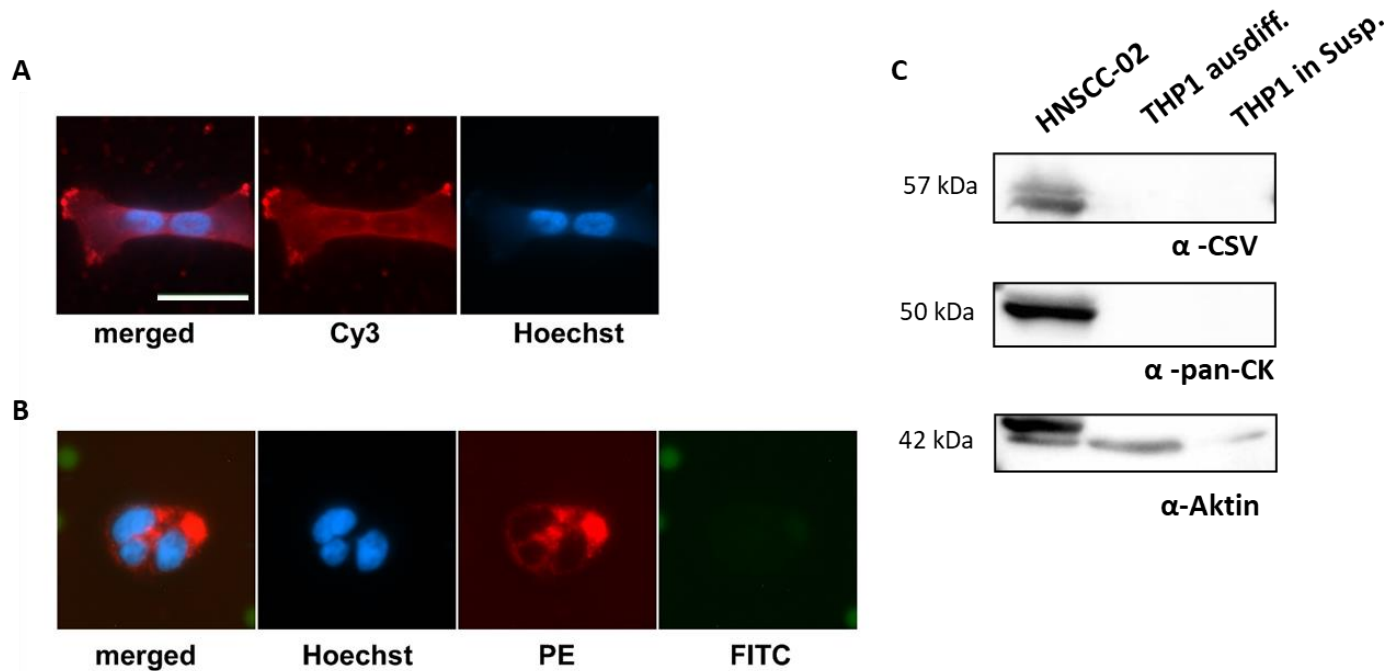


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von positiv detektierten Zellen

HNSCCUM-02T-Zellen werden mit dem CSV-Cy3-Antikörper und Hoechst gefärbt (**A**) sowie testweise in die magnetische Isolationsmethodik integriert, mit einem positiven Ergebnis (**B**; Details sind im Kapitel 4.11.2 enthalten). Proteinbasierter Nachweis des CSV-Antikörpers konnte in HNSCCUM-02T-Zellen im Gegensatz zu Monozyten und Makrophagen positiv dargestellt werden. Maßstabsbalken 50 μm .

4.11.3 Minimierung des Zellstress durch Verwendung eines schwachen Magneten

Um den Isolationsprozess für die Zellen noch stressfreier zu gestalten, wird die magnetische Separation innerhalb der Isolation testweise mit einem schwachen Küchenmagneten durchgeführt. Für diesen Versuch werden 20 Zellen gespiked und unter Durchführung des standardisierten Isolationsprotokolls isoliert. Innerhalb der magnetischen Separation werden der magnetische Falconständer und der magnetische Epiständer durch einen Küchenmagneten ersetzt. Dieser Küchenmagnet entspricht der Magnetkonstruktion aus dem Ablöseprozess.

Es werden nur 12-13 Zellen von den gespikten 20 Zellen isoliert. Die Nutzung dieses Küchenmagneten scheint zu schwach für die Isolation zu sein. Die Zellen sind jedoch nach dieser milden magnetischen Separation deutlich weniger gestresst, da alle isolierten Zellen sogar in einem unbeschichteten Slide mit frischem Medium anwachsen.

4.12 Etablierung des Färbeprotokolls und Isolation von CTCs aus Patientenblutproben

Die isolierten Zellen aus der Patientenprobe werden einem Färbeprotokoll unterzogen, um sie als Tumorzellen identifizieren zu können. Das zu etablierende Färbeprotokoll wurde zunächst wie folgt durchgeführt.

Die Zellsuspension wird zunächst bei 0,4 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Sollte ein Pellet sichtbar sein, wird dieses in 1 ml PBS und 10 µl anti-CD45-FITC resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 0,4 xg für 10 Minuten. Das Pellet wird dann gründlich mit PBS gewaschen. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt.

Nach dem Waschen wird das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und auf Slides überführt. Die Überführung auf die Slides erfolgt mittels eines Cytospin-Verfahrens bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 10 Minuten. Danach werden die Zellen mit 4 % PFA für 10 Minuten fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Nach der Fixierung wird eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 Minuten durchgeführt. Auch hier erfolgt anschließend wieder ein dreimaliges Waschen mit PBS. Die Zellen werden dann für 60 Minuten mit Pan-Cytokeratin-PE (Verdünnung: 1:100) inkubiert und erneut dreimal gewaschen.

Abschließend werden die Zellen für 20 Minuten mit Hoechst (Verdünnung: 1:1000) inkubiert und nochmals dreimal gewaschen.

Das Färbeergebnis zeigt eine schwache pan-Cytokeratin-Färbung (Abbildung 21 A) einer isolierten Tumorzelle und eine eindeutige Identifizierung von Leukocyten-Zellen (Abbildung 21 B). Die untersuchte Blutprobe eines Patienten mit einem Tonsillen-Karzinom (P13092018) ließ eine Identifizierung von 3-4 CTCs zu.

Um eine verbesserte pan-Cytokeratin-Färbung zu erreichen, wurde die Permeabilisierung mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 3 Minuten angepasst. Diese Änderung sollte zu einer erhöhten Zellpermeabilisierung bei geringerem Zellstress führen. Ein zusätzlicher Schritt zur Minimierung des Zellstress sieht zudem vor, die Hoechst-Färbung in die pan-Cytokeratin-Färbung zu integrieren und die Waschschrte zwischen beiden Färbeschritten wegzulassen. Somit ergibt sich eine Solo-Färbung mit pan-Cytokeratin für 40 Minuten, die durch eine zusätzliche Zugabe von Hoechst für weitere 20 Minuten komplementiert wird.

Diese Anpassung im Färbeprotokoll führte zu einer deutlichen Intensivierung der pan-Cytokeratin-Färbung bei gleichbleibend gutem Färbeergerbnis mit Hoechst beim Patienten (P09102018) mit einem Oropharynx mit Radiotherapie und operativer Entfernung. Bei diesem Patienten konnten bis zu 7 CTCs identifiziert werden (Abbildung 21 C und D).

Die isolierten Zellen zeigen weiterhin eine atypische Ausformung des Zellkerns, der ein vergrößertes, langgezogenes und segmentiertes Aussehen hat. Die Vermutung liegt nahe, dass die Zellen nach der Isolation und einem zusätzlichen Cytospin zu sehr gestresst werden und sich dies in der atypischen Ausformung des Zellkerns widerspiegelt. Dementsprechend wird der Cytospin durch ein selbstständiges Absetzen nach der Überführung in die Slides provoziert. Die Zellen können somit für 24 Stunden im Inkubator ruhen, setzen und am Slideboden adhären. Die Inkubationszeit im Fixierungsprozess wird um 5 Minuten auf 15 Minuten in 4 % PFA verlängert. Zudem wird die pan-Cytokeratin-PE-Konzentration verdünnt (auf 1:200) und verlängert (über Nacht).

Diese Anpassungen wurden mit einer Patientenprobe (P15102018) mit einem Zungengrundkarzinom mit LK Filiae mit präoperativer Blutentnahme durchgeführt. Insgesamt konnten bis zu 3 CTC-ähnliche Zellen gefunden werden, die bei dieser Patientenprobe allerdings mit ca. 3-4 µm deutlich kleiner ausgefallen sind (Abbildung 21 E). Die verminderte Größe konnte bei den Leukozyten nicht bestätigt werden (Abbildung 21 F).

Um die Färbung optimal zu finalisieren, wird ein Blocking mit 0,5 % BSA in PBS für 30 Minuten zwischen den Permeabilisierungs- und Färbeschritt mit pan-Cytokeratin eingefügt. Dieser Schritt führt zu einer intensiveren Zellfärbung, wie in der Patientenprobe (P15112018) mit einem Zungengrundkarzinom im Stadium T4 mit LK ohne Fernmetastasen zu sehen ist. Es konnten 3 CTCs eindeutig identifiziert werden (Abbildung 21 G). Die Unterscheidung zwischen CTCs und Leukozyten fällt ebenfalls eindeutig aus (Abbildung 21 H).

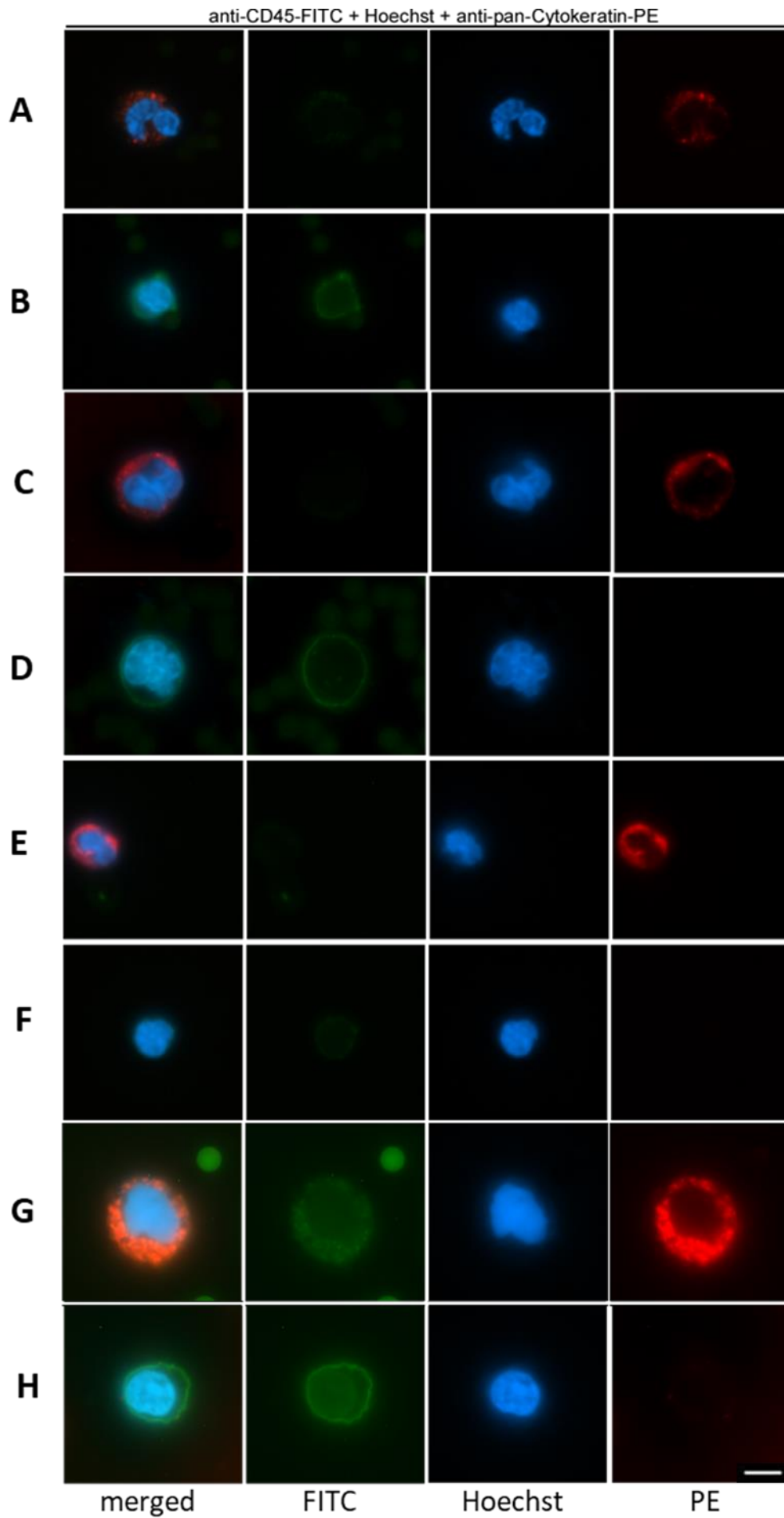


Abbildung 21: Zusammenfassende Darstellung von positiv detektierten Zellen aus Patientenblutproben

Isolierte Tumorzellen und Leukozyten aus Patientenblutproben (Auswahl) zur Etablierung des Färbeprotokolls mit CD45-FITC, Hoechst und pan-Cytokeratin-PE. Maßstabsbalken 10 µm.

4.13 Tumorassoziierte Mikrovesikel als weiterer Faktor der „liquid biopsy“

Exosomen sind kleine extrazelluläre Vesikel mit einem Durchmesser von 30-150 nm, die in den meisten Zelltypen nachgewiesen werden können, was dazu führt, dass Exosomen in verschiedenen Körperflüssigkeiten in großer Zahl vorkommen. Diese Nanobehälter werden durch Knospung der Zellmembran gebildet. Dabei spielen Exosomen eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation, indem sie als Transportmittel für verschiedene intrazelluläre Komponenten dienen. Je nach Ursprungszelle enthalten Exosomen Proteine, Lipide, Metaboliten und verschiedene Nukleinsäuren. Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Mikroumgebung von Tumoren zu verändern, indem sie die Immunität, Angiogenese und Metastasierung regulieren, ist das Interesse an der Definition der klinischen Relevanz von Exosomen bei Krebserkrankungen gestiegen. Da der exosomale Inhalt die Ursprungszelle repräsentiert, besteht ein großes klinisches Potenzial für den Nachweis und die Charakterisierung von tumorassoziierten Exosomen als *"liquid biopsy"*. In klinischen Anwendungen können Exosomen potenziell als Biomarker eingesetzt werden, die eine Frühdiagnose von Tumoren ermöglichen.

Zur Isolierung von Exosomen, die in Zellkulturmedien vorhanden sind, wurden die Leistung der differentiellen Ultrazentrifugation, der Isolierung durch Ausfällung und der Größenausschlusschromatographie verglichen. Die Exosomen wurden aus In-vitro-Zellkulturüberständen einer Brustkrebszelllinie und einer menschlichen embryonalen Nierenzelllinie gereinigt. Zur Überprüfung der isolierten Exosomen wurden die Zellen mit CD63 emGFP transfiziert, einem mit den Membranen intrazellulärer Vesikel assoziierten Protein. Das Vorhandensein von Exosomen wurde durch dynamische Lichtstreuung und fluoreszenzbasierte Detektion (Tecan Spark) gemessen. Proben mit einem hohen Gehalt an Exosomen wurden für weitere Interaktionsanalysen und kinetische Bindungsexperimente mit Sporen, Bakterien, Nanopartikeln, Pollen, Algen und Zellen verwendet. Die Interaktion von Exosomen mit *A. fumigatus*-Sporen konnte nach 30 Minuten bestätigt werden. In weiteren Analysen wurde die definierte zelluläre Aufnahme von Exosomen durch Makrophagen bestätigt. Um die endozytischen Mechanismen zu überwinden und Transportmechanismen innerhalb von Zellen zu untersuchen, wurden Exosomen zur genau definierten Mikroinjektion in den Zellkern und auch in das Zytoplasma von Epithelzellen der Affeniere verwendet. Durch die Anwendung der Mikroinjektion ist es möglich, den Transport von

fluoreszenzmarkierten Exosomen innerhalb der Zellen direkt nach der zellulären Aufnahme zu beobachten und weitere Informationen über Transportmechanismen zu erhalten.

Weitere Analysen der Exosomen und ihrer einzigartigen biologischen Eigenschaften eröffnen die Möglichkeit, Exosomen als diagnostische Biomarker, therapeutische Ziele oder als Nanosystem zur Verabreichung von Krebsmedikamenten zu nutzen.

Exosomen entstehen durch Einstülpung der Zellmembran und werden durch Exozytose in den extrazellulären Raum freigesetzt. Diese Vesikel sind die kleinsten der zirkulierenden Mikrovesikel, die Zelloberflächen- und Zytoplasmaproteine, Boten-RNA und Mikro-RNA enthalten, die ihre Ursprungszelle repräsentieren. Folglich können Exosomen ihren Inhalt auf andere Zellen übertragen.

CD63 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, von dem bekannt ist, dass es mit Integrinen einen Komplex bildet und mit den Membranen intrazellulärer Vesikel assoziiert ist. Außerdem gibt es drei Exosomenmarker: CD9, CD63 (üblicherweise verwendet) und CD81. Die Transfektion des pC3 CD63 emGFP/mCherry-Plasmids zeigt eine primär zytoplasmatische und membranöse Lokalisierung von CD63.

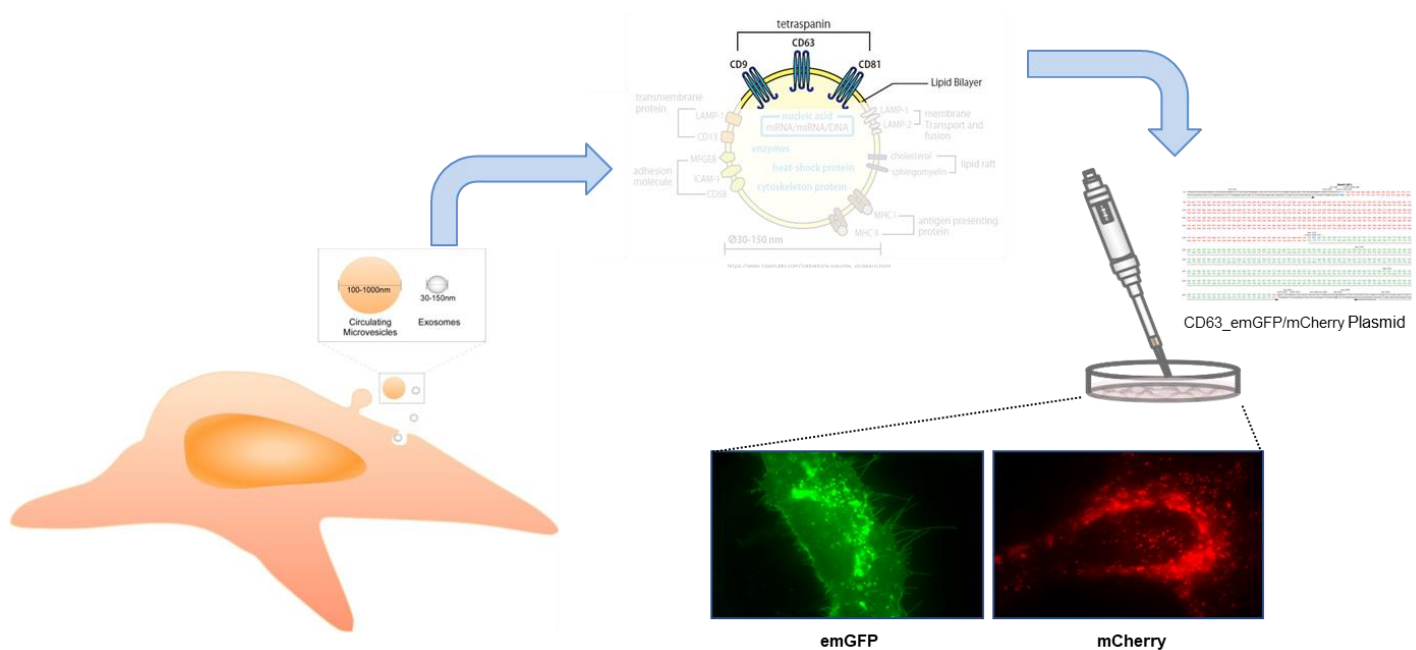


Abbildung 22: Schematische Darstellung der benutzten Interspanine

Darstellung eines schematischen Untersuchungsablaufs mit dem Tetraspanin CD63.

4.14. Isolation von Mikrovesikeln im Vergleich

4.14.1 Ausfällung

Das Prinzip der Fällung besteht darin, dass das Reagenz durch die Bindung von Wassermolekülen die weniger löslichen Komponenten (Exosomen) aus der Lösung drückt, so dass sie nach der Zentrifugation gesammelt werden können. Demonstration der Isolierung von Exosomen mit Hilfe eines Total Exosome Isolation Kits für Zellkulturmedien (Abbildung 23 A). Die isolierten Exosomen wurden durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (Abbildung 23 B). Ihr durchschnittlicher Durchmesser wurde mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (Abbildung 23 C) zwischen 100 und 110 nm gemessen.

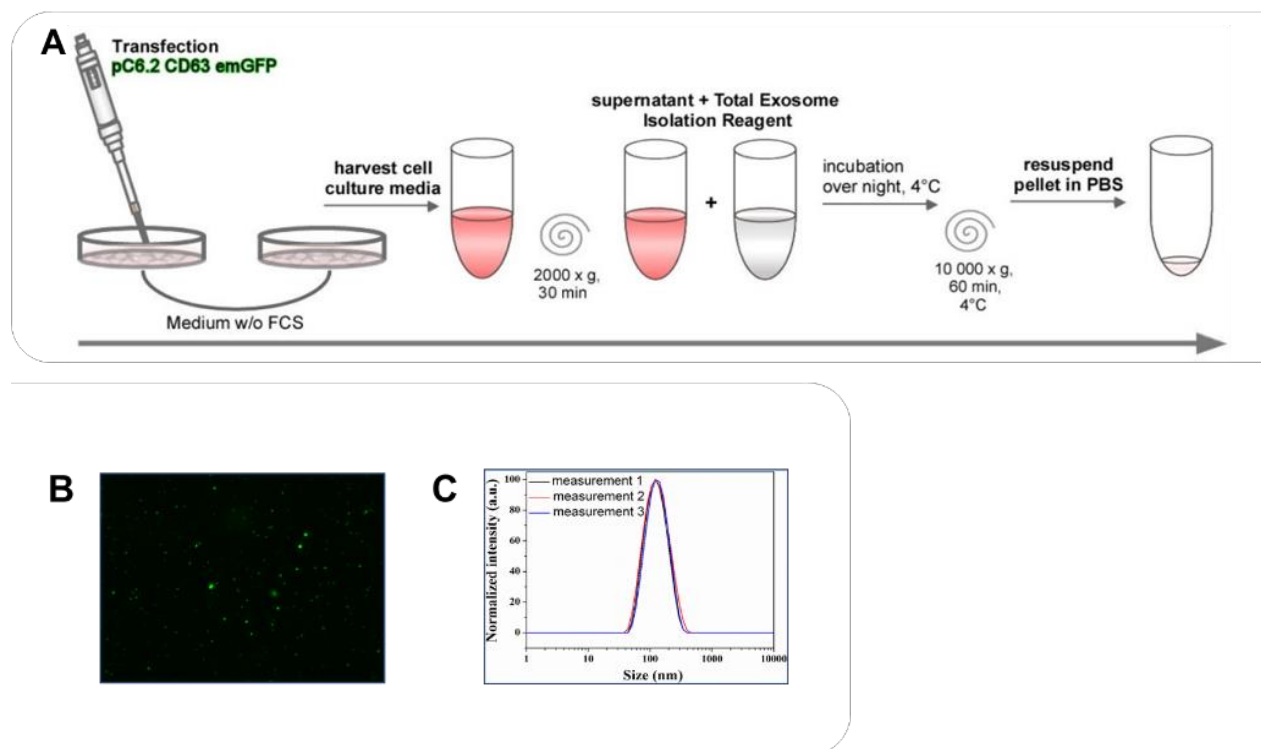


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Prinzips von Mikrovesikelextraktion mittels Fällung

A Schematischer Ablauf der Isolierung von Exosomen mit Hilfe eines Total Exosome Isolation Kits für Zellkulturmedien inkl. der nachgewiesenen isolierten Exosomen; sichtbar gemacht durch Fluoreszenzmikroskopie (**B**) und Messung des durchschnittlichen Exosomen-Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung (**C**).

4.14.2 Größenausschlusschromatographie

Bei dieser Technik wird ein Gemisch getrennt, indem die einzelnen Komponenten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase durch die Säule verteilt werden. Kleine Partikel diffundieren in die Perlen der Matrix und passieren die Säule langsamer als größere Partikel, die nicht in die Perlen eindringen können und mit der mobilen Phase schnell durch die Säule wandern. Drei gesammelte Fraktionen enthalten isolierte Exosomen (Abbildung 24 A), die mittels Fluoreszenzmikroskopie weiter analysiert wurden, um die Konzentration (Abbildung 24 B) und die Größe mittels dynamischer Lichtstreuung (Abbildung 24 C) zu bestimmen.

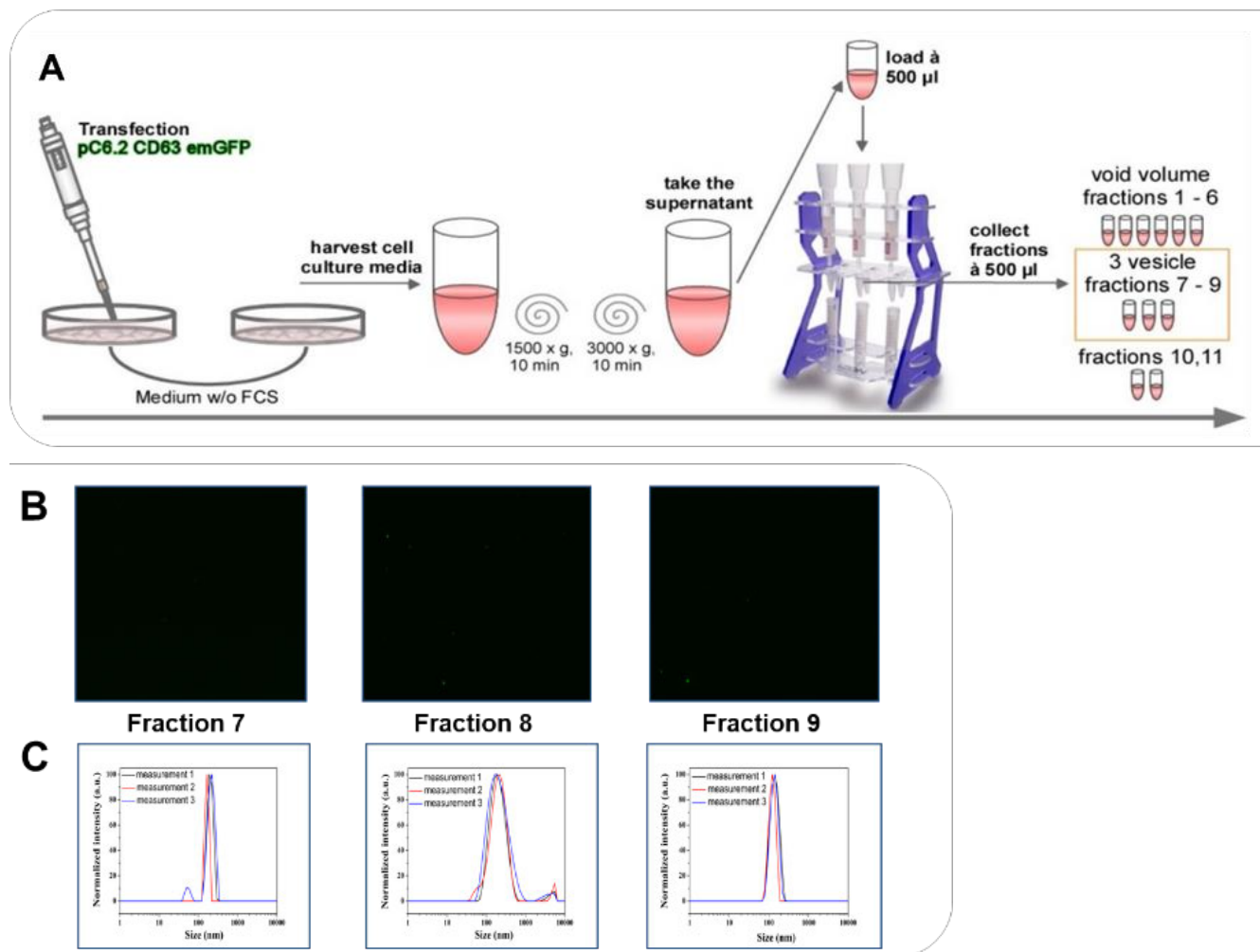


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Mikrovesikelextraktion mittels Größenausschlusschromatographie

A Schematischer Ablauf der Isolierung von Exosomen mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie inkl. der nachgewiesenen isolierten Exosomen in Fraktion 7-9; sichtbar gemacht durch Fluoreszenzmikroskopie (**B**) und Messung des durchschnittlichen Exosomen-Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung (**C**).

4.14.3 Ultrazentrifugation

Mehrere Zentrifugationsschritte bis zu 100 000 x g für 70 min in speziellen Zentrifugationsröhrchen für einen Schwingemerrotor (Abbildung 25 A). Diese Methode führt zu einer Probe mit einer ausreichenden Exosomenkonzentration, wie mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 25 B) und fluoreszenzbasierter Detektion mittels Tecan Spark (Abbildung 25 C) gezeigt wird. Die isolierten Exosomen weisen einen Größenbereich von 90-110 nm auf.

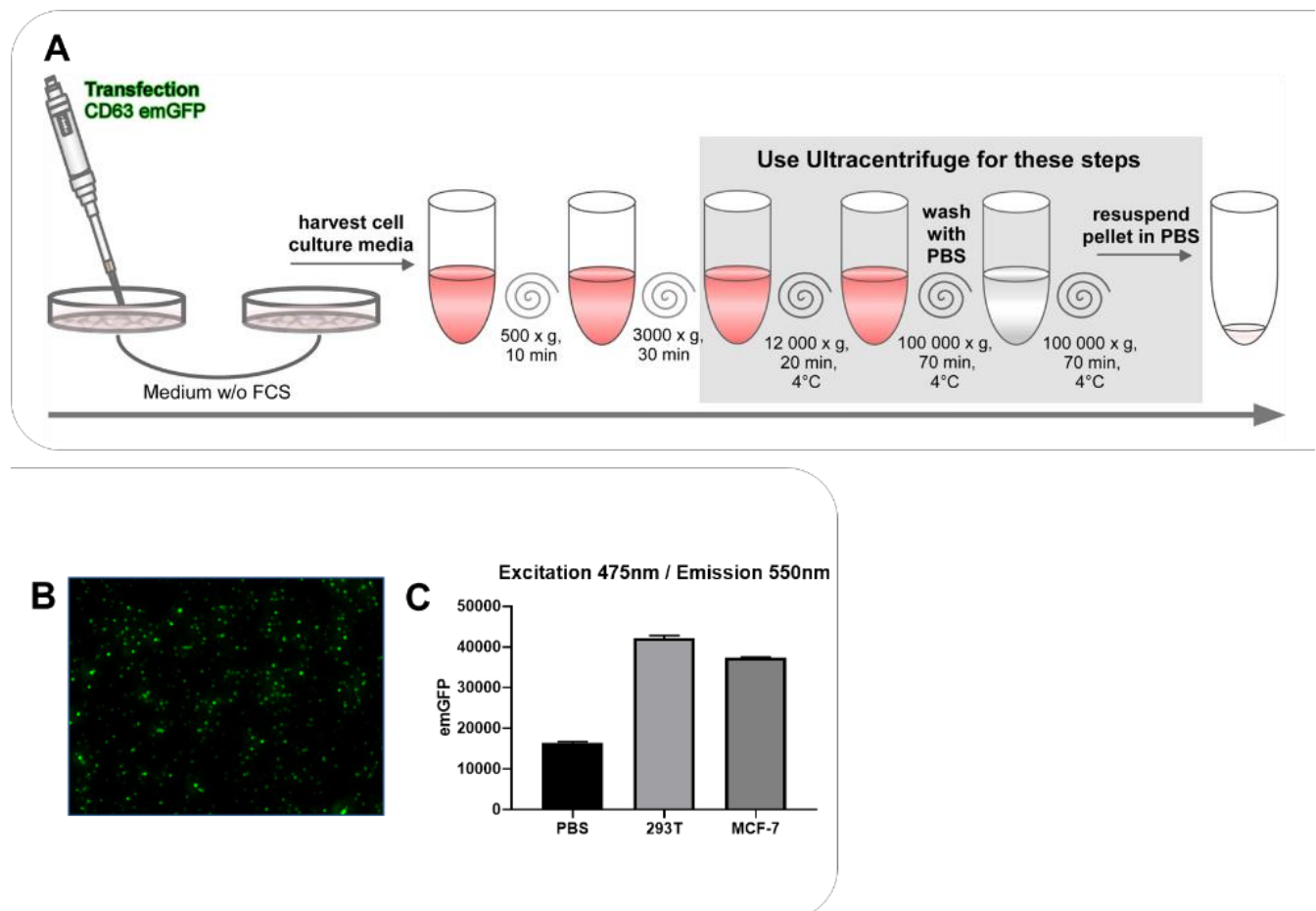


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Mikrovesikelextraktion mittels Ultrazentrifugation

A Schematischer Ablauf der Isolierung von Exosomen mit Hilfe der Ultrazentrifugation inkl. der nachgewiesenen isolierten Exosomen; sichtbar gemacht durch Fluoreszenzmikroskopie (**B**) und Messung des durchschnittlichen Exosomen-Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung (**C**).

4.14.4 Exosomenisolation mittels IsoMAG IMS Einheit

Testweise werden 100 µl Exosomenlysat (CD63emGFP) aus 293T in 7,5 ml Medium gespiked und durch Zugabe von an CD63 Biotin Antikörper (#19) gekoppelten Streptavidin Dynabeads MyOne mittels IsoMAG IMS Einheit isoliert. Als Negativkontrolle werden EpCAM-gekoppelte Beads verwendet.

In der Negativkontrolle sowie der Probe ist keine Fluoreszenz der Exosomen erkennbar.

4.15 Exosomeninteraktion mit Mikrobiota

Isolierte Exosomen (aus humanen embryonalen Nierenzellen 293 (HEK293T) und einer Brustkrebszelllinie (MCF-7) wurden für Interaktionsanalysen mit Sporen (*Aspergillus fumigatus*, einem saprophytischen Pilz, der durch die Luft übertragen wird), Bakterien (*Escherichia coli*), Birkenpollen, Algen und Zellen verwendet (nicht alle Ergebnisse dargestellt). Bislang wurden positive Ergebnisse bei der Interaktion von Exosomen mit *Aspergillus fumigatus* erzielt. Die Sporen (rot) sind bereits nach 30 Minuten von Exosomen (grün) umgeben und zeigen somit eine Interaktion.

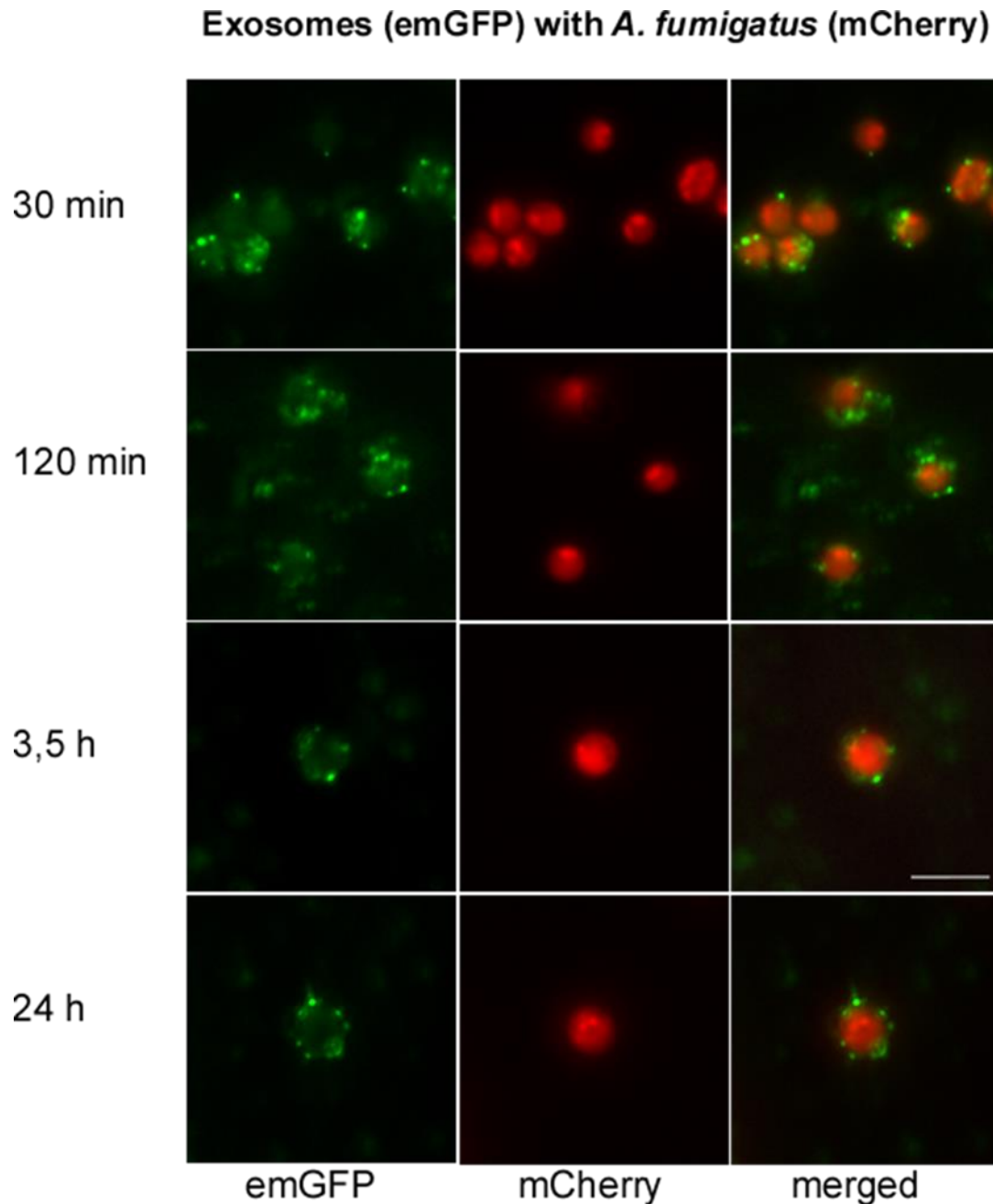


Abbildung 26: Kinetik der Interaktion von extrahierten Exosomen und Sporen von *A. fumigatus*

Zuvor isolierte Exosomen (emGFP) aus der Ultrazentrifugation werden zu Interaktionsanalysen zusammen mit den Sporen des *A. fumigatus* (mCherry) inkubiert und eine fluoreszenzmikroskopische Kinetik erstellt. Maßstabsbalken 5µm.

Weitere Interaktionsanalysen zeigen eine zelluläre Aufnahme von isolierten Exosomen. Differenzierte THP-1-Zellen (Makrophagen) wurden 1 Stunde lang mit isolierten Exosomen (emGFP) inkubiert (Abbildung

27 A). Als Kontrolle wurde eine Kombination aus Exosomen und Sporen (mCherry) mit den Zellen inkubiert. Zu Analyse Zwecken folgte eine Behandlung von Makrophagen mit vorinkubierten Exosomen mit Sporen (Abbildung 27 B) und eine direkte Behandlung von Zellen mit Exosomen und Sporen (Abbildung 27 C).

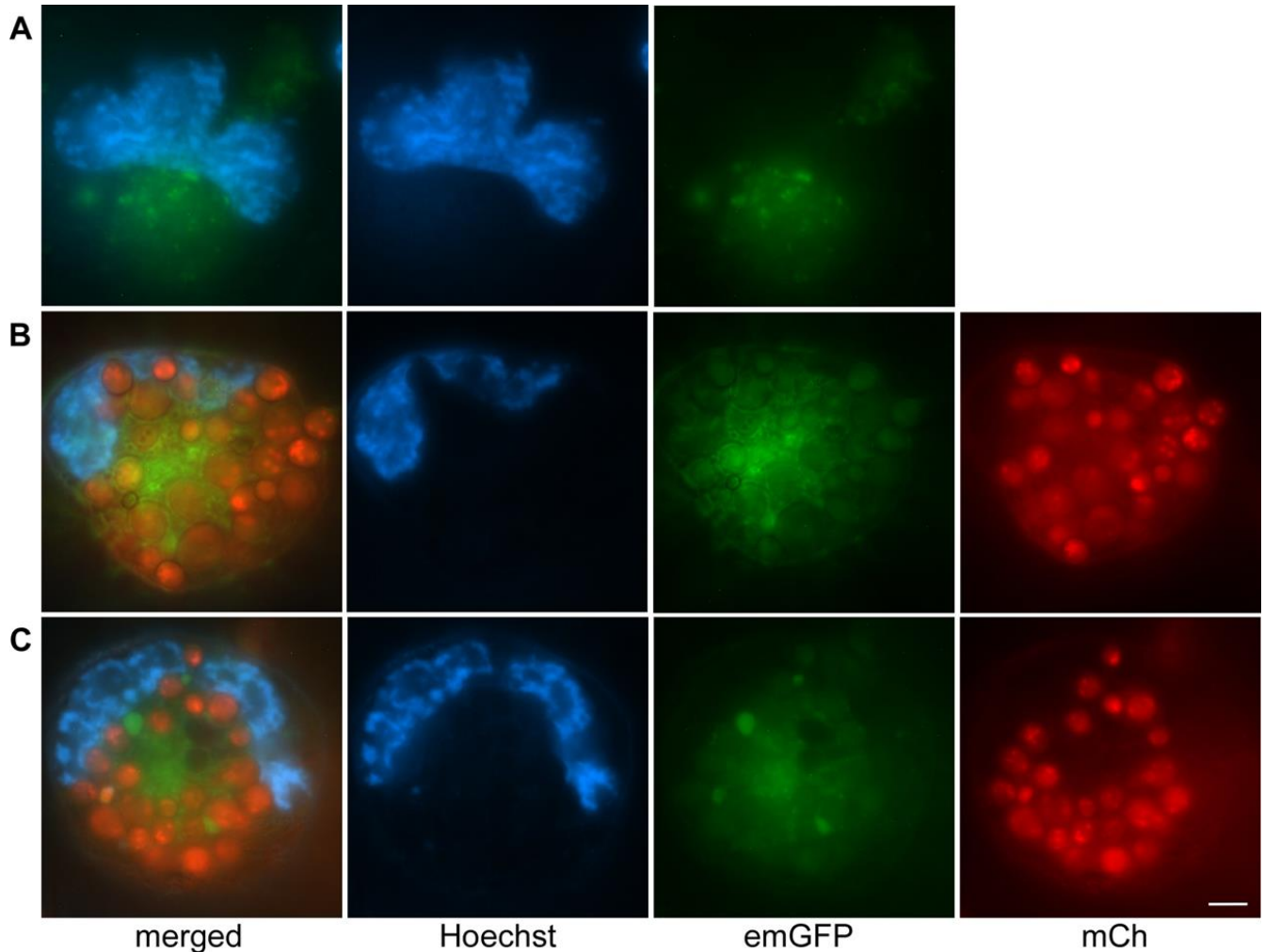


Abbildung 27: Interaktionstestung von extrahierten Exosomen und Zellen

Inkubation von ausdifferenzierten THP-1 Makrophagen mit zuvor isolierten Exosomen (emGFP) aus der Ultrazentrifugation für 1h (A). Die Interaktionsanalyse wird entweder mit vorinkubierten Zellen und Exosomen durchgeführt, die nachträglich mit Sporen in Kontakt treten (B) oder mit Zellen, die gleichzeitig Exosomen und Sporen ausgesetzt werden (C). Maßstabsbalken 5 μm .

5. Diskussion

5.1 Gestörte nukleoläre Struktur der trans-dominanten NPM1-Mutanten

Die durch transdominante NPM1-Mutanten (CN-terminal) induzierte Störung der abgerundeten Nukleolarstruktur, die anhand der Marker Fibrillarin und H3K9me3 nachgewiesen werden konnte, deutet eindeutig auf eine gestörte Ribosomenbiogenese sowie eine beeinträchtigte rDNA-Transkription hin. Die Ergebnisse in NPM1-Knockdown-Zellen zeigen, dass das perinukleäre Heterochromatin umgeben ist und als Fragmente im Nukleoplasma vorliegt, so dass wir von einer transkriptionsinaktiven Chromatinregion ausgehen. In Eukaryoten werden repetitive DNA-Sequenzen durch H3K9me3 transkriptionell stillgelegt. Ein Verlust dieser Stilllegung der Wiederholungselemente führt zu einer Genominstabilität und Krankheiten, wie beispielsweise Krebs und Alterung. [159-161] Die Färbung mit H3K9me3 zeigte den Verlust der Kernintegrität innerhalb der Kernchromatinstruktur. Diese Tatsache deutet auf eine gestörte ribosomale Aktivität hin. Die gestörte rRNA-Transkription, die durch die Färbung mit Fibrillarin nachgewiesen wurde, wurde durch die Actinomycin-D-induzierte Auflösung der Nukleoli bestätigt. Actinomycin-D in gebrauchter Konzentration wirkt auf die RNA-Polymerase I und hemmt so die rDNA-Transkription und aktiviert eine nukleolare Stressreaktion.

Die verzeichnete gestörte Nukleolarstruktur einiger NPM-Mutanten deutet auf einen zukünftig interessanten Therapieansatz hin, da der Einsatz von Chemotherapeutika in diesem Gebiet in aktuellen klinischen Studien untersucht wird, wie das Beispiel von Dactinomycin zeigt [162]. Dactinomycin stellt ein kostengünstiges Chemotherapeutikum dar, das bei Patienten mit NPM1-Mutationen Berichten zufolge Remissionen bewirken kann, obwohl die genauen Wirkmechanismen bisher nicht vollständig geklärt sind. In einer monozentrischen Phase-2-Pilotstudie wurde die Anwendung von Dactinomycin als Monotherapie bei erwachsenen Patienten mit rezidivierender oder refraktärer NPM1-mutierter akuter myeloischer Leukämie (AML) untersucht [163]. Die Ergebnisse zeigten, dass Dactinomycin in der Lage ist, vollständige Remissionen auszulösen und dabei eine akzeptable Verträglichkeit aufweist.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Wirksamkeit von Dactinomycin sowohl in vitro als auch in vivo mit der Induktion nukleolaren Stresses in Verbindung steht. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass niedrig dosiertes Dactinomycin in Zellen mit NPM1-Mutationen eine stärkere Stressreaktion hervorruft als in Zellen mit Wildtyp-NPM1, was auf eine erhöhte Sensitivität NPM1-mutierter AML gegenüber nukleolärem Stress hinweist [164, 165].

Die Auflösung der nukleolaren Struktur durch NPM1-Knockdown führte zwar zu einer Delokalisierung von Taspase1 aus den Nukleoli, hatte aber keine Auswirkungen auf seine proteolytische Aktivität.

5.2 Veränderungen innerhalb des N-Terminus in NPM1 können dessen Interaktion mit Taspase1 beeinflussen

Die Tatsache, dass alle Veränderungen innerhalb der N-terminalen ± 100 aa die effiziente nukleolare Lokalisierung von NPM1 beeinträchtigten, unterstützt unsere Hypothese, dass die nukleolare Ausrichtung über die N-terminale Oligomerisierungs-/Chaperonfunktionsdomäne vermittelt wird. Darüber hinaus konnten wir bestätigen, dass das Fehlen dieser essentiellen Domäne zu einer fehlenden Pentamerbildung führt, so dass NPM-Mutanten, denen die Oligomerisierungs-/Chaperon-Domäne fehlt, als Monomere vorliegen. Diese Tatsache führt zu der Vermutung, dass eine Oligomerbildung bei endogenem NPM1 die Chaperonfunktion und auch die Bindung mit seinem Interaktionspartner Taspase1 beeinträchtigt.

Als Ergebnis der vermuteten Proteinfaltung mit struktureller Versammlung wurde die Interaktionsdomäne von NPM1 mit Taspase1 als N-terminale ~ 100 aa und C-terminale aa187-260 bestimmt. Darüber hinaus stellt die Oligomerisierungs-/Chaperon-Domäne, die die NES enthält, eine unverzichtbare Fraktion für die Interaktion mit Taspase1 und auch für dessen proteolytische Aktivität dar.

Wie bereits früher gezeigt wurde, erfordert die molekulare Chaperonaktivität unpolare und saure Segmente im N-Terminus von NPM1, und daher ist die Chaperonaktivität in Mutanten mit N-Terminus-Deletion deutlich reduziert [70]. Es gibt immer mehr Beweise für einen Zusammenhang zwischen Oligomerisierungszustand und Chaperonaktivität: In monomeren Mutanten blieb keine Chaperonaktivität erhalten; Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diesen Mutanten einfach eine Substratbindungsstelle fehlte, da diese im N-terminalen Drittel des Moleküls zu liegen scheint [70].

Durch die Bestimmung wichtiger Domänen von Taspase1 für die Interaktion mit NPM1 haben wir innerhalb der vorgeschlagenen β -Sandwich-Struktur festgestellt, dass F43 eine Rolle als "Hauptregulator" der NPM1-Interaktion zu spielen scheint, da eine Mutation nur dieser Stelle dramatische Auswirkungen auf die Taspase1-NPM1-Interaktion und die proteolytische Aktivität hat. Die Kristallstruktur von Taspase1 zeigt, dass F43 durch drei C-terminale Reste L346, F368 und Y381 stabilisiert wird. Eine Veränderung der Stabilisierungsreste führt zur Unfähigkeit, mit NPM1 zu interagieren, zur Beeinträchtigung der zellulären Lokalisierung und zu einer verringerten cis- und trans-Aktivität von Taspase1.

Darüber hinaus führen neue Erkenntnisse über die Organisation der Taspase1-Domäne zu der Schlussfolgerung, dass die Lokalisierung von Taspase1 von der α -Untereinheit abhängig ist, im Gegensatz zur proteolytischen Aktivität, die von der β -Untereinheit abhängt.

5.3 Therapieeffektivität bei kombinierter Behandlung mit Chemo- und Radiotherapie bei aktiver Taspase1

Die essentielle Rolle von Taspase1 als Hauptakteur bei der Aktivierung von MLL-Fusionsproteinen und damit für die Entwicklung aggressiver Kinderleukämien wurde in früheren Arbeiten nachgewiesen [24]. Darüber hinaus ist Taspase1 maßgeblich an der Sensibilisierung von konstruierten NPM-Mutanten gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses beteiligt. Die Interaktion von Taspase1 mit NPM1 ist entscheidend für den Therapieerfolg und zeigt die Feinabstimmung von Taspase1 auf die Behandlung mit dem chemotherapeutischen Goldstandard Cisplatin. Tatsächlich führt eine direkte Inaktivierung von Taspase1 zu einer höheren Empfindlichkeit von HNSCC-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin, was unsere Hypothese einer besseren chemotherapeutischen Prognose unterstützt.

Eine kombinierte Behandlung von HNSCC-Zellen mit Cisplatin und Strahlentherapie führt bei Vorhandensein von aktivem Taspase1 zu einem synergistischen Effekt, so dass die Empfindlichkeit gegenüber der Behandlungstherapie zunimmt und die wichtige Rolle von Taspase1 bei Kopf- und Halskrebserkrankungen hervorgehoben wird.

Die Behandlung von HNSCC-Patienten orientiert sich im Allgemeinen an der Tumorausdehnung und dem Allgemeinzustand der Patienten. Cisplatin bleibt der Standardwirkstoff in der Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenem HNSCC. In der definitiven Radiochemotherapie wird Cisplatin meist als Monotherapie eingesetzt, wobei eine Gesamtdosis von $\geq 200 \text{ mg/m}^2$ erreicht werden sollte. Die wöchentliche Gabe von 40 mg/m^2 zeigte in Studien eine vergleichbare Wirksamkeit und geringere Toxizität im Vergleich zur 3-wöchentlichen Dosierung von 100 mg/m^2 [166]. Die simultane Radiochemotherapie zeigt in Metaanalysen eine überlegene Wirksamkeit gegenüber der Induktionschemotherapie. Cisplatin als Monotherapie in einer wöchentlichen Dosierung von 40 mg/m^2 wird in der RCT zunehmend favorisiert, da sie eine vergleichbare Wirksamkeit mit besserem Nebenwirkungsprofil gegenüber der 3-wöchentlichen Dosierung aufweist [166, 167].

Die primäre Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenem HNSCC zeigte in historischen Studien Remissionsraten von $\geq 80\%$, jedoch keinen eindeutigen Vorteil bei den Langzeitergebnissen gegenüber der simultanen Radiochemotherapie. Eine Metaanalyse von 31 Studien mit 5 311 Patienten ergab eine geringe Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von 30 % auf 32,4 % durch Induktionschemotherapie [168]. Zudem senkte die Induktionschemotherapie die Fernmetastasierungsrate um 8 %, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die lokale Tumorkontrolle oder das Gesamtüberleben [169, 170].

In der palliativen Behandlung wird Cisplatin häufig mit 5-FU und Pembrolizumab oder Cetuximab kombiniert. Diese Kombinationen erreichen Remissionsraten von 36 % bis 59 % und ein medianes Gesamtüberleben von 13–14 Monaten. Die Therapie wird jedoch durch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Hämatotoxizität und Ototoxizität limitiert.

Es wurden wichtige Erkenntnisse in Bezug auf eine vielversprechende Therapie zur Erhöhung der Überlebensrate von HNSCC-Patienten nachgewiesen, da Cisplatin ein zentraler Bestandteil der HNSCC-Behandlung, sowohl in der kurativen als auch in der palliativen Therapie, bleibt.

5.4 Therapiemaßnahmen durch die Inhibition eines Interaktionspartners

Die Verwendung des NPM-Oligomerinhibitors NSC348884 führte in der Zellkultur vermehrt zu einer erhöhten Zelltodrate. Diese Tatsache wurde zunächst auf die Blockade der Oligomerausbildung und die damit einhergehenden Folgen zurückgeführt. Es ist aber bekannt, dass NPM1 mit dem Tumor-Suppressor p14ARF interagiert und dieses in den Nukleoli bindet. Bei der Translokation in das Nukleoplasma interagiert p14ARF mit HDM2, der E3-Ubiquitin-Ligase für p53, und sorgt für einen p53-Anstieg [171]. NPM1 soll ebenfalls direkt mit p53 interagieren können und somit dessen Phosphorylierung an Ser15 unterbinden [92]. Beide dieser anti-apoptotischen Aktivitäten werden durch die Behandlung mit NSC348884 hervorgerufen, sodass der apoptotische Effekt bei einer Überexpression von NPM1 erklärt werden kann.

Die nachgewiesenen nicht mehr oligomerisierungsfähigen NPM-Mutanten (aa106-294 und aa118-294), denen die Oligomerisationsdomäne aufgrund von Deletionen in der N-terminalen Domäne fehlt, konnten durch die Behandlung mit NSC348884 bestätigt werden. Eine Studie von Sasinkova et al. konnte zwar keine messbare Wirkung auf die Bildung von NPM-Oligomeren in Leukämiezellen zeigen [172]. Zudem wurde die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Behandlung mit NSC348884 nicht durch AML-assoziierte NPM-Mutationen beeinflusst. Jedoch deuteten die Forschungsergebnisse darauf hin, dass die fehlende

Oligomerisierungsfähigkeit der Deletionsmutanten spezifische Veränderungen in der Zellreaktion auf NSC348884 auslöste. Interessanterweise blieben diese Mutanten zwar unfähig zur Bildung von Oligomeren, interagierten jedoch weiterhin teilweise mit NPMwt, vermutlich durch verstärkte Bindung an andere nukleoläre Proteine innerhalb von NPMwt-Komplexen. Zudem gibt es Nachweise, dass eine Punktmutation in Cystein 21 die Oligomer-Dissoziation leicht verstärken kann, sodass das gesamte NPM-Interaktionspotenzial mit anderen NPM-Molekülen in lebenden Zellen dennoch erhalten bleibt. Deletionsmutanten, denen ein Teil der N-terminalen Domäne von NPM fehlt, verlieren ihre Oligomerisierungsfähigkeit vollständig, behalten jedoch teilweise die Interaktion mit NPMwt bei, möglicherweise durch verstärkte Interaktion mit anderen nukleolären Proteinen in Komplexen mit NPMwt [172].

5.5 Einsatz zirkulierender Tumorzellen in zielgerichteten

Therapiemaßnahmen

In den letzten sechs Jahren haben nanotechnologische Anwendungen zur Anreicherung, Erfassung, Erkennung und Beseitigung von CTCs erhebliches wissenschaftliches Interesse geweckt. Künstlich hergestellte Nanomaterialien (NMs) spielen dabei eine zentrale Rolle bei der Krebsfrüherkennung und der effizienten Behandlung von Krebserkrankungen. Die Analyse gefangener CTCs aus peripheren Blutproben von Patienten liefert wertvolle Informationen über die Biologie von Mikrometastasen und kann in der klinischen Behandlung von Krebspatienten eingesetzt werden. Insbesondere der Wert der CTC-Analyse wird durch Flüssigbiopsien bei Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung verdeutlicht. Diese Methodik kann aber auch als ergänzende Methodik zu der etablierten ctDNA-Charakterisierung bewertet werden. *Mouliere et al.* haben chromosomale Mutationen solider Tumoren im Blut durch eine Analyse der Kopienzahlvariation des gesamten Genoms nachgewiesen [173]. Es wurden umfassende Studien zu ctDNA- und CTC-Charakterisierungen durchgeführt [174], aber insbesondere bei Kopf- und Halskrebs ist die entsprechende Literaturlandschaft nur spärlich besetzt.

Seit über einem Jahrzehnt wird das von der FDA zugelassene CellSearch-System erfolgreich für die CTC-Analyse eingesetzt. Vorläufige Ergebnisse der CTC-Zählung und -Analyse ermöglichen die Überwachung der Medikamenteneffizienz und der Antitumoraktivität laufender Therapien. Mittlerweile wurden zahlreiche Assays zum Auffangen und Nachweis von CTCs entwickelt, um verschiedene Tumorarten in unterschiedlichen Krankheitsstadien zu screenen. Aufgrund des extrem seltenen Vorkommens von CTCs

im Blut stellt deren Isolierung und Nachweis eine erhebliche Herausforderung dar. Hierbei sind Spezifität und Empfindlichkeit entscheidende Faktoren, die neue Technologien berücksichtigen müssen. NMs scheinen diese Kriterien zu erfüllen und die Probleme der unzureichenden Reinheit und der geringen Fangeffizienz von CTCs aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften zu lösen.

Die Integration von NMs in mikrofluidische Geräte kombiniert die Vorteile der Nanotechnologie und der Mikrochip-Technologie und optimiert so die CTC-Fangmethoden für weitergehende Analysen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Vorhandensein von CTCs im Blut einen wichtigen prognostischen Wert für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Kopf- und Halskrebs hat [175]. Darüber hinaus zeichnet sich HNSCC durch mikrometastatische Ausbreitungen im Frühstadium sowie eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität aus – beides Faktoren, die eng mit einer ungünstigen Prognose verknüpft sind. Ein wesentlicher Vorteil der Isolierung von CTCs oder disseminierten Tumorzellen (DTCs) gegenüber bildgebenden Verfahren besteht darin, dass minimale Resterkrankungen (MRD), wie beispielsweise DTC-Mikrometastasen, mit herkömmlicher Bildgebung nicht nachgewiesen werden können. Besonders das Knochenmark wird als potenzielles Reservoir für ruhende DTCs intensiv untersucht. Diese Zellen können erneut in den Blutkreislauf eintreten und zur Entstehung von MRD in entfernten Geweben beitragen [176]. CTCs stellen ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Nanomedizin dar. Die Erkennung und Analyse von Blutproben von Patienten ermöglicht eine gezielte CTC-Therapie, um CTCs im peripheren Blut zu eliminieren. Somit kann die Wirksamkeit der Krebstherapie durch den Nachweis von CTCs kontinuierlich überwacht und zur Steuerung der Behandlung genutzt werden. Eine frühzeitige Erkennung der Erkrankung ermöglicht entsprechend ein frühzeitiges Eingreifen und eine optimierte Behandlungsoption mit weniger aggressiven Behandlungsmöglichkeiten. Leider werden mit rund 60 % die Mehrheit der HNSCC-Patienten [177] heute noch immer erst in einem fortgeschrittenen Stadium (Stadium III-IV) diagnostiziert, wodurch die Heilungschancen durch eine Radiochemotherapie bei lediglich ca. 50 % liegen [177]. Zudem haben die Patienten auch die Nebenwirkungen der Therapie zu bewältigen, die vor allem Emesis, Fatigue und akute Dermatitis einschließen. Hinzu kommen funktionelle und ästhetische Veränderungen des Kopf-Hals-Bereiches nach einem operativen Eingriff. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose ist ebenfalls für den operativen Eingriff von Belangen, da der Zeitpunkt abhängig ist von der Ausdehnung des Eingriffs (betrachte man den einzuhaltenden Sicherheitsabstand zwischen malignem und gesundem Gewebe).

5.6 Limitierungen in der Anwendung von CTC-Techniken

Immunbiochemische Verfahren, die auf spezifische Antigene wie EpCAM abzielen, sind nicht uneingeschränkt für alle Tumorarten oder heterogenen CTC-Populationen geeignet. Dies gilt insbesondere für CTCs, die eine Epithelial-Mesenchymale-Transition durchlaufen haben. Alternativ können Antikörpermischungen, die gegen Integrin-Subtypen, Vimentin auf der Zelloberfläche oder Stammzellmarker gerichtet sind, die Anreicherung von mesenchym-ähnlichen CTCs vor und nach der Epithel-Mesenchym-Transition verbessern. Vor allem die Zellen, die sich innerhalb der Epithelial-Mesenchymalen- oder Mesenchymal-Epithelialen-Transition befinden, könnten durch die Wahl von nur einem spezifischen Antikörper unerkant bleiben, sodass die Wahl einer Kombination aus EpCAM und CSV als vielversprechend deklariert werden kann. Für die Etablierung des markerabhängigen Systems wurden demnach EpCAM- und CSV-Biomarker gewählt, die epitheliale wie auch mesenchymale Eigenschaften abdecken, um die maximale Erfolgsquote bei der Selektion der CTCs zu erzielen. Zellen, die sich im fortgeschrittenen Stadium der EMT befinden und damit geringe epitheliale und vermehrte mesenchymale Eigenschaften aufweisen, können mit diesem Biomarker-Mix identifiziert werden.

Die erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von *Payne* et al. beschreibt die Nutzung von Multiplex-Phänotypisierungsdaten, um intermediäre mesenchymale Übergangszustände in CTCs zu verdeutlichen [178]. So zeigten sich Unterschiede in der Expression klassischer Epithelial-Mesenchymale-Transitions-Transkriptionsfaktoren wie Twist und Snail zwischen „frühen“ und „fortgeschrittenen“ Epithelial-Mesenchymale-Transition-CTCs, ebenso wie in den phänotypischen Markern, die mit Proliferation oder Stammzellcharakter assoziiert sind. Obwohl die phänotypische Plastizität der Epithelial-Mesenchymale-Transition in Tumoren gut dokumentiert und mit Progression sowie Metastasierung in Verbindung gebracht wurde [179, 180], bleibt ihre dynamische Natur in CTCs eine Herausforderung für die Analyse.

Neben diesen affinitätsbasierten Ansätzen zur Anreicherung und Isolation von CTCs bieten physikalische Methoden eine weitere Möglichkeit, indem sie Unterschiede in Zellgröße, -dichte oder -plastizität nutzen. Allerdings stellt die Heterogenität der CTCs im Blut eine Herausforderung dar, da diese Zellen in einigen Eigenschaften mit gesunden mononukleären Blutzellen übereinstimmen. Daher sind Verfahren wie Filtration, Zentrifugation oder Größenausschluss allein nicht geeignet, um als standardisierte klinische Testmethoden zu dienen. Der limitierende Faktor der Heterogenität der CTC-Population stellt ein prominentes Hindernis dar. Studien, wie die von *Semaan* et al. bei Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs, zeigen, dass CTCs mit „partieller Epithelial-Mesenchymale-Transition“ – also Zellen, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker tragen – mit einem schlechteren

progressionsfreien und Gesamtüberleben korrelieren. Diese Subpopulation stellte zudem die Mehrheit der identifizierten CTCs in ihren Proben dar, was auch in unseren und anderen Untersuchungen bestätigt wurde [181].

Ein weiterer limitierender Faktor ist das Fehlen von Langzeitdaten in großen Kohorten, obwohl EMT-CTCs in früheren Studien als mögliche prognostische Marker für das Therapieansprechen bei rezidivierenden oder metastasierten HNSCC identifiziert wurden [182]. Da die Entwicklung eines mesenchymalen Phänotyps eng mit Metastasenbildung und schlechter Prognose verbunden ist, ist ein tiefgreifendes Verständnis der zugrunde liegenden EMT-Signalwege entscheidend. In diesem Zusammenhang untersuchten *Buglione et al.* 73 Patienten mit verschiedenen Kopf-Hals-Tumoren mithilfe des CD45-CellSearch-Ansatzes und berichteten eine CTC-Erkennungsrate von 15,1 %. Während Stadium-IV-Patienten häufiger CTCs aufwiesen als diejenigen in früheren Stadien, deutete ein Rückgang oder Verschwinden von CTCs während der Behandlung auf ein gestopptes Fortschreiten der Krankheit hin. Die Ergebnisse zeigten, dass eine stabile oder reduzierte CTC-Anzahl nach der Behandlung mit einer guten Prognose assoziiert war. Ein Zusammenhang zwischen Erkennungsrate und klinischem Stadium wurde jedoch nicht beobachtet, möglicherweise aufgrund der Fokussierung auf Stadien III und IV [183].

Liu et al. demonstrierten in ihrer Studie bereits, dass ein Anstieg der CTC-Zahl nach der Behandlung mit einer schlechten Prognose assoziiert werden konnte, was häufig auf eine Arzneimittelresistenz oder unwirksame Therapien hinweist. Im Gegensatz dazu korrelierte eine stabile oder abnehmende CTC-Zahl mit einer besseren Prognose, was auf die Wirksamkeit der eingesetzten Behandlung hindeutet [184]. Bemerkenswert ist auch, dass es Patienten mit erhöhten CTCs oder Patienten, deren CTCs sich nach der Behandlung von negativ zu positiv änderten, ohne Krankheitsprogression oder Erliegen an der Krankheit gibt.

5.7 Ausblick und Nutzung von neuartigen Techniken in der Patienten-Screening-Routine

Eine verlässliche Detektion zirkulierender Zellen ist von äußerster Wichtigkeit für die Einordnung der Patientenblutprobe in das gesundheitliche Gesamtbild des Patienten, da ein mengenmäßiges Ergebnis der CTC-Auswertung prognostische Aussagen treffen kann. Das hier etablierte Färbeprotokoll, bestehend aus einem Ausschluss von Leukozyten in der Probe mittels CD45-Färbung, einem Nachweis für einen bestehenden Zellkern mit der Hoechst-Färbung und dem Positivnachweis für die Cytokeratine 8,18,19 mittels pan-Cytokeratin-Färbung, hat eine eindeutige Identifikation der isolierten Zellen mit tumorösem

Ursprung ergeben. Die Färbeergebnisse der Zellen aus den Patientenblutproben werden mittels der immunfluoreszenzbasierten Mikroskopie bewertet und die identifizierten Zellen ausgezählt. Diese Schritte können selbstverständlich automatisiert erfolgen, wie es im Ansatz bereits in der publizierten Arbeit von Gribko et al. erfolgte [157]. In diesem Fall erfolgte der halbautomatische Nachweis von CTCs mittels der IsoMAG Einheit und zeigt ein Potential auf, als standardisierter Teil der Flüssigbiopsie mit den Vorteilen einer personalisierten Echtzeitanalyse in Kombination mit Nichtinvasivität und individueller prognostischer Therapie in Verbindung gebracht zu werden [185]. Im Hinblick auf eine Einzelzellisolation wird als weiterführendes Experiment diese Methodik von den Kollegen des Fraunhofer Instituts untersucht. Die Zellen werden im Anschluss an die positive Selektion in die Zellsortier-Untereinheit des mikrofluidischen Chips zur Zellsortierung und zur Abgabe einzelner Zellen in Mikroliter-Tröpfchen überführt. Die singularisierten CTCs können anschließend für transkriptomische und zytobiologische Analysen verwendet werden.

Diese Art von Analysen ist besonders wichtig, um die Zellbiologie der Tumore zu verstehen und besondere Merkmale auszuweisen, um entsprechend individuelle Therapiemaßnahmen ergreifen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Verwendung der ablösbaren Beads und der Einzelzellkultivierung ein weiterer Ansatz getestet, dieses Ziel zu erreichen. In wenigen Fällen konnten einzelne Zellen unter Bedingungen des konditionierten Mediums und mit kollagenbeschichteten Slides zu einem Anwachsen der Zellen führen. Ein geringer Teil der Zellen schaffte es sogar, die Zellteilung zu reaktivieren und so die Kultivierung isolierter Patienten-Tumorzellen voranzutreiben. Dennoch bedarf es an dieser Stelle einer fortführenden intensiven Forschung der Einzel-Zellkultivierung zur Optimierung unter den bisher gewonnenen Erkenntnissen. Es stellt sich allerdings die Frage, wie lange eine Kultivierung einer einzelnen Zelle nach der Gesamtprozedur der Selektion andauern würde, bis eine erforderliche Menge hinsichtlich molekularbiologischer Analysen erreicht werden kann, inklusive des gesicherten Fortbestandes der Kultivierungspopulation. Im Hinblick auf die Patienten, die auf eine personalisierte Therapie warten, bedarf es einer schnellen, präzisen und verlässlichen Methodik, sodass die Einzelzellkultivierung diesen Anforderungen noch nicht gerecht werden kann. Allerdings wäre diese Methodik möglicherweise als zweite, spezialisiertere Behandlungsoption zukünftig denkbar, um kostensparend an die Ergebnisse zu kommen, die eine Gesamtzellanalyse bietet. Die Kosten für das sogenannte „*whole genom sequencing*“ konnten in den letzten 15 Jahren zwar stark reduziert werden, jedoch können diese Kosten weiterhin nicht für die Menge an Krebspatienten von den Krankenkassen übernommen werden.

Tumorassoziierte Mikrovesikel als eine untersuchte Alternative zu den zirkulierenden Tumorzellen in der „*liquid biopsy*“ wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls in Betracht gezogen. Hierzu hat sich zunächst

der Vergleich der verschiedenen Isolationsoptionen als sehr nützlich erwiesen, um die Methodik mit dem größten Output identifizieren zu können. Die Ultrazentrifugation hat sich in diesem Fall als die Methodik der Wahl erwiesen, um eine ausreichende Menge an fluoreszierenden Exosomen für weitere Analysen und Experimente zu gewinnen.

Die isolierten Exosomen zeigten eine Interaktion mit *Aspergillus fumigatus* bereits nach 30-minütiger Ko-Inkubation, was auf intakte und aktive Exosomen hindeutet. Zudem ist diese Interaktion auch im Hinblick auf die Zell-Zell-Interaktionen interessant, die bisher noch nicht vollständig erforscht ist. Im Forschungsbereich gibt es ein großes Interesse, diese „zellulären Kommunikationen“ zu verstehen und als mögliche neuartige Therapieoptionen nutzen zu können. Exosomen könnten intra- oder extraexosomal mit Therapeutika beladen werden und möglicherweise besser vertragen werden als beladene Nanopartikel. Als Ausblick auf die Transportmechanismen solcher Exosomen wurden zunächst „leere“ Exosomen genutzt und mittels Mikroinjektion entweder in den Zellkern (Abbildung 28 A) oder in das Zytoplasma (Abbildung 28 B) injiziert und anschließend beobachtet. Eine genaue Sichtung des Beginns der Endo- bzw. Exozytose und der weiteren Verarbeitung der intra-exosomal Information innerhalb der Zellen würde die Forschung und die möglichen Therapieoptionen, nicht nur in der Krebstherapie, vorantreiben können und möglicherweise Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten lindern können.

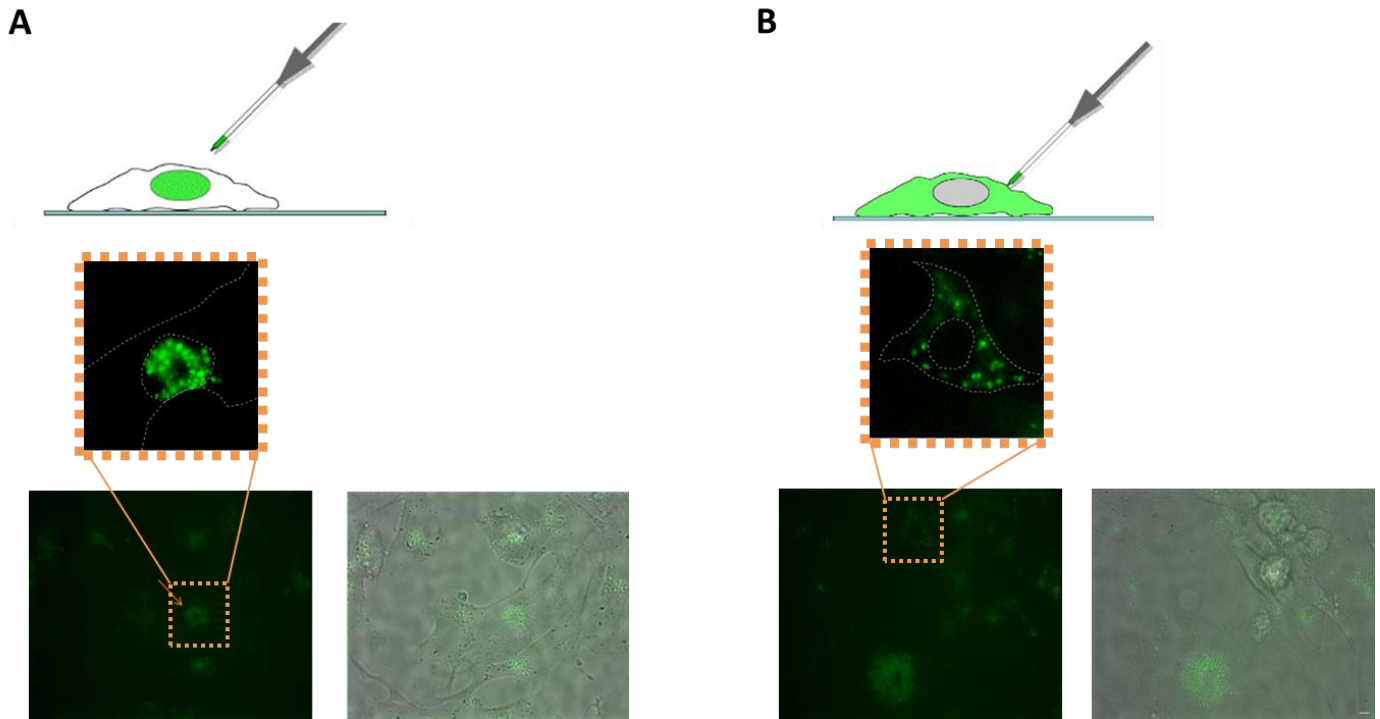


Abbildung 28: Schematische Darstellung verknüpft mit mikroskopischen Live-Zell-Bildern nach einer Mikroinjektion

Mikroinjektion von aus Zellkulturen gewonnenen und isolierten fluoreszierenden Exosomen in Nierenepithelzellen des Afrikanischen Grünen Affen (Vero-Zellen). Präzise definierte nukleolare (A) und zytoplasmatische (B) Injektion. Maßstabsbalken 5 µM.

6. Referenzen

1. Kommission, E. *Public Health*. 2023; Available from: https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/cancer_de.
2. Ames, B.N., L.S. Gold, and W.C. Willett, *The causes and prevention of cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(12): p. 5258-65.
3. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. Virology, 2009. 384(2): p. 260-5.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
6. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. 12(1): p. 31-46.
7. Lopez-Otin, C. and C.M. Overall, *Protease degradomics: a new challenge for proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(7): p. 509-19.
8. Ehrmann, M. and T. Clausen, *Proteolysis as a regulatory mechanism*. Annu Rev Genet, 2004. 38: p. 709-24.
9. Rawlings, N.D., et al., *The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database*. Nucleic Acids Res, 2018. 46(D1): p. D624-D632.
10. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and R. Finn, *Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res, 2016. 44(D1): p. D343-50.
11. Barrett, A.J., *Proteases*. Curr Protoc Protein Sci, 2001. Chapter 21: p. Unit 21 1.
12. Lopez-Otin, C. and J.S. Bond, *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. J Biol Chem, 2008. 283(45): p. 30433-7.
13. Puente, X.S., et al., *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nat Rev Genet, 2003. 4(7): p. 544-58.
14. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. 27(2): p. 157-62.
15. Vandooren, J., et al., *Proteases in cancer drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. 97: p. 144-55.
16. Jin, M., et al., *Endogenous tissue renin-angiotensin systems. From molecular biology to therapy*. Am J Med, 1988. 84(3A): p. 28-36.
17. Moreau, P., et al., *Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study*. Lancet Oncol, 2011. 12(5): p. 431-40.
18. Richardson, P.G., et al., *Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy*. Annu Rev Med, 2006. 57: p. 33-47.
19. Hsieh, J.J., E.H. Cheng, and S.J. Korsmeyer, *Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression*. Cell, 2003. 115(3): p. 293-303.
20. Bier, C., et al., *Overexpression of the catalytically impaired Taspase1 T234V or Taspase1 D233A variants does not have a dominant negative effect in T(4;11) leukemia cells*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e34142.
21. Wunsch, D., et al., *Fly versus man: evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of Drosophila's Taspase1*. FASEB J, 2015. 29(5): p. 1973-85.
22. Bier, C., et al., *Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization in vivo*. FASEB J, 2012. 26(8): p. 3421-9.
23. Khan, J.A., B.M. Dunn, and L. Tong, *Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL*. Structure, 2005. 13(10): p. 1443-52.

24. Wunsch, D., et al., *Taspase1: a 'misunderstood' protease with translational cancer relevance*. *Oncogene*, 2016. 35(26): p. 3351-64.
25. Bier, C., et al., *Cell-based analysis of structure-function activity of threonine aspartase 1*. *J Biol Chem*, 2011. 286(4): p. 3007-17.
26. Knauer, S.K., et al., *Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors*. *PLoS One*, 2011. 6(5): p. e18253.
27. van den Boom, J., et al., *Structural Characterization of the Loop at the Alpha-Subunit C-Terminus of the Mixed Lineage Leukemia Protein Activating Protease Taspase1*. *PLoS One*, 2016. 11(3): p. e0151431.
28. Nagaratnam, N., et al., *Structural insights into the function of the catalytically active human Taspase1*. *Structure*, 2021.
29. Bier, C., et al., *The importin-alpha/nucleophosmin switch controls taspase1 protease function*. *Traffic*, 2011. 12(6): p. 703-14.
30. Hahlbrock, A., et al., *Threonine Aspartase1: An unexplored protease with relevance for oral oncology?* *Oral Oncol*, 2016. 54: p. e10-2.
31. Chen, D.Y., et al., *Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis*. *Cancer Res*, 2010. 70(13): p. 5358-67.
32. Weinstein, I.B. and A. Joe, *Oncogene addiction*. *Cancer Res*, 2008. 68(9): p. 3077-80; discussion 3080.
33. Takeda, S., et al., *Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression*. *Genes Dev*, 2006. 20(17): p. 2397-409.
34. Gribko, A., et al., *Disease-relevant signalling-pathways in head and neck cancer: Taspase1's proteolytic activity fine-tunes TFIIA function*. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 14937.
35. Chen, D.Y., et al., *A pharmacologic inhibitor of the protease Taspase1 effectively inhibits breast and brain tumor growth*. *Cancer Res*, 2012. 72(3): p. 736-46.
36. Dong, Y., et al., *Taspase1 cleaves MLL1 to activate cyclin E for HER2/neu breast tumorigenesis*. *Cell Res*, 2014. 24(11): p. 1354-66.
37. Liu, H., E.H. Cheng, and J.J. Hsieh, *MLL fusions: pathways to leukemia*. *Cancer Biol Ther*, 2009. 8(13): p. 1204-11.
38. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong, *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development*. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(11): p. 823-33.
39. Yokoyama, A., et al., *Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties*. *Blood*, 2002. 100(10): p. 3710-8.
40. Armstrong, S.A., et al., *MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia*. *Nat Genet*, 2002. 30(1): p. 41-7.
41. Bursen, A., et al., *Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology?* *Oncogene*, 2004. 23(37): p. 6237-49.
42. Bursen, A., et al., *The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4*. *Blood*, 2010. 115(17): p. 3570-9.
43. Van den Berghe, H., et al., *A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. *Hum Genet*, 1979. 46(2): p. 173-80.
44. Hoiby, T., et al., *A facelift for the general transcription factor TFIIA*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1769(7-8): p. 429-36.
45. Yokomori, K., et al., *Drosophila TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation*. *Genes Dev*, 1994. 8(19): p. 2313-23.
46. Ranish, J.A., N. Yudkovsky, and S. Hahn, *Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIIB*. *Genes Dev*, 1999. 13(1): p. 49-63.

47. Mitsiou, D.J. and H.G. Stunnenberg, *TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIA α precursor and the TFIIA γ subunit*. Mol Cell, 2000. 6(3): p. 527-37.
48. Mitsiou, D.J. and H.G. Stunnenberg, *p300 is involved in formation of the TBP-TFIIA-containing basal transcription complex, TAC*. EMBO J, 2003. 22(17): p. 4501-11.
49. Hoiby, T., et al., *Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA*. EMBO J, 2004. 23(15): p. 3083-91.
50. Sun, X., et al., *Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription*. Genes Dev, 1994. 8(19): p. 2336-48.
51. Takeda, S., et al., *Taspase1-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting Cdkn2a locus transcription*. J Clin Invest, 2015. 125(3): p. 1203-14.
52. Lange, A., et al., *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α* . J Biol Chem, 2007. 282(8): p. 5101-5.
53. Freitas, N. and C. Cunha, *Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins*. Curr Genomics, 2009. 10(8): p. 550-7.
54. Fried, H. and U. Kutay, *Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory*. Cell Mol Life Sci, 2003. 60(8): p. 1659-88.
55. Nguyen, K.T., M.P. Holloway, and R.A. Altura, *The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. 3(2): p. 137-51.
56. Grisendi, S., et al., *Nucleophosmin and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(7): p. 493-505.
57. Lindstrom, M.S., *NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling*. Biochem Res Int, 2011. 2011: p. 195209.
58. Ulanet, D.B., et al., *Unique conformation of cancer autoantigen B23 in hepatoma: a mechanism for specificity in the autoimmune response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(21): p. 12361-6.
59. Lee, H.H., et al., *Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface*. Proteins, 2007. 69(3): p. 672-8.
60. Mitrea, D.M., et al., *Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(12): p. 4466-71.
61. Marasco, D., et al., *Role of mutual interactions in the chemical and thermal stability of nucleophosmin NPM1 domains*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(2): p. 523-8.
62. Di Matteo, A., et al., *Molecules that target nucleophosmin for cancer treatment: an update*. Oncotarget, 2016. 7(28): p. 44821-44840.
63. Okuda, M., *The role of nucleophosmin in centrosome duplication*. Oncogene, 2002. 21(40): p. 6170-4.
64. Wang, W., et al., *Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication*. Nat Cell Biol, 2005. 7(8): p. 823-30.
65. Koike, A., et al., *Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates*. Cancer Res, 2010. 70(17): p. 6746-56.
66. Chan, P.K. and F.Y. Chan, *Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells*. Biochim Biophys Acta, 1995. 1262(1): p. 37-42.
67. Enomoto, T., et al., *Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability*. J Biol Chem, 2006. 281(27): p. 18463-72.
68. Mitrea, D.M., et al., *Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA*. Elife, 2016. 5.
69. Okuwaki, M., et al., *Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone*. FEBS Lett, 2001. 506(3): p. 272-6.
70. Hingorani, K., A. Szebeni, and M.O. Olson, *Mapping the functional domains of nucleolar protein B23*. J Biol Chem, 2000. 275(32): p. 24451-7.
71. Colombo, E., et al., *Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53*. Nat Cell Biol, 2002. 4(7): p. 529-33.

72. Itahana, K., et al., *Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation*. Mol Cell, 2003. 12(5): p. 1151-64.
73. Kurki, S., et al., *Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation*. Cancer Cell, 2004. 5(5): p. 465-75.
74. Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C.J. Sherr, *Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23*. Mol Cell Biol, 2004. 24(3): p. 985-96.
75. Kuo, M.L., et al., *N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor*. Genes Dev, 2004. 18(15): p. 1862-74.
76. Li, Z. and S.R. Hann, *Nucleophosmin is essential for c-Myc nucleolar localization and c-Myc-mediated rDNA transcription*. Oncogene, 2013. 32(15): p. 1988-94.
77. Li, Z., D. Boone, and S.R. Hann, *Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(48): p. 18794-9.
78. Dumbar, T.S., G.A. Gentry, and M.O. Olson, *Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids*. Biochemistry, 1989. 28(24): p. 9495-501.
79. Wang, D., et al., *The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end*. J Biol Chem, 1994. 269(49): p. 30994-8.
80. Peculis, B.A. and J.G. Gall, *Localization of the nucleolar protein NO38 in amphibian oocytes*. J Cell Biol, 1992. 116(1): p. 1-14.
81. Zirwes, R.F., et al., *Topogenesis of a nucleolar protein: determination of molecular segments directing nucleolar association*. Mol Biol Cell, 1997. 8(2): p. 231-48.
82. Feric, M., et al., *Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments*. Cell, 2016. 165(7): p. 1686-1697.
83. Mitrea, D.M., et al., *Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid-liquid phase separation*. Nat Commun, 2018. 9(1): p. 842.
84. Yu, Y., et al., *Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export*. Mol Cell Biol, 2006. 26(10): p. 3798-809.
85. Nishimura, Y., et al., *Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. 66(10): p. 2239-42.
86. Cela, I., A. Di Matteo, and L. Federici, *Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands*. Int J Mol Sci, 2020. 21(14).
87. Federici, L. and B. Falini, *Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization*. Protein Sci, 2013. 22(5): p. 545-56.
88. Yun, J.P., et al., *Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix*. J Cell Biochem, 2003. 90(6): p. 1140-8.
89. Chiarella, S., et al., *Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA*. Nucleic Acids Res, 2013. 41(5): p. 3228-39.
90. Falini, B., et al., *Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML*. Blood, 2006. 107(11): p. 4514-23.
91. Grummitt, C.G., et al., *Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia*. J Biol Chem, 2008. 283(34): p. 23326-32.
92. Qi, W., et al., *NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells*. Oncogene, 2008. 27(30): p. 4210-20.
93. Zhang, J., et al., *[Inhibitory effect of NSC348884, a small molecular inhibitor of nucleophosmin, on the growth of hepatocellular carcinoma cell line hepG2]*. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2012. 34(1): p. 58-61.
94. Ranieri, R., et al., *Current status and future perspectives in targeted therapy of NPM1-mutated AML*. Leukemia, 2022. 36(10): p. 2351-2367.

95. Ahn, J.Y., et al., *Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD*. Mol Cell, 2005. 18(4): p. 435-45.
96. Wu, M.H., et al., *Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation*. Int J Cancer, 2002. 97(3): p. 297-305.
97. Wu, M.H., J.H. Chang, and B.Y. Yung, *Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression*. Carcinogenesis, 2002. 23(1): p. 93-100.
98. Li, J., et al., *Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53*. J Biol Chem, 2004. 279(40): p. 41275-9.
99. Box, J.K., et al., *Nucleophosmin: from structure and function to disease development*. BMC Mol Biol, 2016. 17(1): p. 19.
100. Holmberg Olausson, K., et al., *NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape*. Sci Rep, 2015. 5: p. 16495.
101. Yun, J.P., et al., *Increased expression of nucleophosmin/B23 in hepatocellular carcinoma and correlation with clinicopathological parameters*. Br J Cancer, 2007. 96(3): p. 477-84.
102. Nozawa, Y., et al., *Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa*. J Pathol, 1996. 178(1): p. 48-52.
103. Zeller, K.I., et al., *Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation*. J Biol Chem, 2001. 276(51): p. 48285-91.
104. Colombo, E., M. Alcalay, and P.G. Pelicci, *Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases*. Oncogene, 2011. 30(23): p. 2595-609.
105. Poletto, M., et al., *Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins*. Mol Biol Cell, 2014. 25(10): p. 1641-52.
106. Chiarle, R., et al., *NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors*. Blood, 2003. 101(5): p. 1919-27.
107. Yoneda-Kato, N., et al., *The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1*. Oncogene, 1996. 12(2): p. 265-75.
108. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. 352(3): p. 254-66.
109. Shandilya, J., et al., *Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation*. Mol Cell Biol, 2009. 29(18): p. 5115-27.
110. Haddad, R.I. and D.M. Shin, *Recent advances in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2008. 359(11): p. 1143-54.
111. Benson, E., et al., *The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol, 2014. 50(6): p. 565-74.
112. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment*. Mayo Clin Proc, 2008. 83(4): p. 489-501.
113. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010. 363(1): p. 24-35.
114. Huang, W.B., J.Y.W. Chan, and D.L. Liu, *Human papillomavirus and World Health Organization type III nasopharyngeal carcinoma: Multicenter study from an endemic area in Southern China*. Cancer, 2018. 124(3): p. 530-536.
115. Kulasinghe, A., et al., *Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers*. Int J Cancer, 2015. 136(11): p. 2515-23.
116. Inhestern, J., et al., *Prognostic Role of Circulating Tumor Cells during Induction Chemotherapy Followed by Curative Surgery Combined with Postoperative Radiotherapy in Patients with Locally Advanced Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Cancer*. PLoS One, 2015. 10(7): p. e0132901.
117. Wittekindt, C., *TNM, 7. Auflage 2010, 4. Korrigierter Nachdruck 2012*. 2012.

118. Wittekindt, C., *TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage Januar 2017*. 2017.
119. Beltz, A., et al., *[Staging of oropharyngeal carcinomas : New TNM classification as a challenge for head and neck cancer centers]*. HNO, 2018. 66(5): p. 375-382.
120. Fury, M.G. and D.G. Pfister, *Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer*. J Natl Compr Canc Netw, 2011. 9(6): p. 681-9.
121. Visacri, M.B., et al., *Quality of Life of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Receiving High-Dose Cisplatin Chemotherapy and Radiotherapy*. South Med J, 2015. 108(6): p. 343-9.
122. Ferlito, A., et al., *Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2001. 63(4): p. 202-7.
123. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. 58(2): p. 71-96.
124. Wikner, J., et al., *Squamous cell carcinoma of the oral cavity and circulating tumour cells*. World J Clin Oncol, 2014. 5(2): p. 114-24.
125. Muhanna, N., et al., *Nanoparticle-based sorting of circulating tumor cells by epithelial antigen expression during disease progression in an animal model*. Nanomedicine, 2015. 11(7): p. 1613-20.
126. Broglie, M.A., et al., *Occult metastases detected by sentinel node biopsy in patients with early oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: impact on survival*. Head Neck, 2013. 35(5): p. 660-6.
127. Xu, Y., et al., *Clinical significance of micrometastases in lymph nodes from laryngeal squamous cell carcinoma*. Am J Otolaryngol, 2012. 33(4): p. 402-7.
128. Garzia, L., et al., *Phosphorylation of nm23-H1 by CKI induces its complex formation with h-prune and promotes cell motility*. Oncogene, 2008. 27(13): p. 1853-64.
129. Mocellin, S., et al., *The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis*. Clin Cancer Res, 2006. 12(15): p. 4605-13.
130. Pantel, K. and C. Alix-Panabieres, *Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives*. Trends Mol Med, 2010. 16(9): p. 398-406.
131. Wagener C., a.M.O., *Molekulare Onkologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010.
132. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer*. Clin Chem, 2013. 59(1): p. 110-8.
133. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(6): p. 448-56.
134. Hong, Y., F. Fang, and Q. Zhang, *Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review)*. Int J Oncol, 2016. 49(6): p. 2206-2216.
135. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. Cell, 2017. 168(4): p. 670-691.
136. Whiteside, T.L., *The effect of tumor-derived exosomes on immune regulation and cancer immunotherapy*. Future Oncol, 2017. 13(28): p. 2583-2592.
137. Whiteside, T.L., *Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer*. Clin Exp Immunol, 2017. 189(3): p. 259-267.
138. Ludwig, S., et al., *Suppression of Lymphocyte Functions by Plasma Exosomes Correlates with Disease Activity in Patients with Head and Neck Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. 23(16): p. 4843-4854.
139. Harden, M.E. and K. Munger, *Human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoprotein expression alters microRNA expression in extracellular vesicles*. Virology, 2017. 508: p. 63-69.
140. Honegger, A., et al., *Silencing of human papillomavirus (HPV) E6/E7 oncogene expression affects both the contents and the amounts of extracellular microvesicles released from HPV-positive cancer cells*. Int J Cancer, 2013. 133(7): p. 1631-42.
141. Ludwig, S., et al., *Molecular and Functional Profiles of Exosomes From HPV(+) and HPV(-) Head and Neck Cancer Cell Lines*. Front Oncol, 2018. 8: p. 445.

142. Bhana, S., Y. Wang, and X. Huang, *Nanotechnology for enrichment and detection of circulating tumor cells*. Nanomedicine (Lond), 2015. 10(12): p. 1973-90.
143. Zhang, Z. and M.R. King, *Nanomaterials for the Capture and Therapeutic Targeting of Circulating Tumor Cells*. Cell Mol Bioeng, 2017. 10(4): p. 275-294.
144. Satelli, A., et al., *Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression*. Clin Cancer Res, 2015. 21(4): p. 899-906.
145. Wollenberg, B., *Implication of stem cells in the biology and therapy of head and neck cancer*. GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2011. 10: p. Doc01.
146. Massague, J. and A.C. Obenauf, *Metastatic colonization by circulating tumour cells*. Nature, 2016. 529(7586): p. 298-306.
147. Nieto, M.A., *Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells*. Science, 2013. 342(6159): p. 1234850.
148. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. 133(4): p. 704-15.
149. Gribko, A., et al., *Is small smarter? Nanomaterial-based detection and elimination of circulating tumor cells: current knowledge and perspectives*. Int J Nanomedicine, 2019. 14: p. 4187-4209.
150. Siemer, S., et al., *Nano Meets Micro-Translational Nanotechnology in Medicine: Nano-Based Applications for Early Tumor Detection and Therapy*. Nanomaterials (Basel), 2020. 10(2).
151. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
152. Capotosti, F., J.J. Hsieh, and W. Herr, *Species selectivity of mixed-lineage leukemia/trithorax and HCF proteolytic maturation pathways*. Mol Cell Biol, 2007. 27(20): p. 7063-72.
153. Dong, Y., et al., *Taspase1 cleaves MLL1 to activate cyclin E for HER2/neu breast tumorigenesis*. Cell Res, 2014.
154. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. 11(1): p. 9-22.
155. Stauber, R.H., C. Bier, and S.K. Knauer, *Targeting Taspase1 for cancer therapy--letter*. Cancer Res, 2012. 72(11): p. 2912; author reply 2913.
156. Blanchard, P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site*. Radiother Oncol, 2011. 100(1): p. 33-40.
157. Gribko, A., et al., *IsoMAG-An Automated System for the Immunomagnetic Isolation of Squamous Cell Carcinoma-Derived Circulating Tumor Cells*. Diagnostics (Basel), 2021. 11(11).
158. Li, H., et al., *Exploring new frontiers: cell surface vimentin as an emerging marker for circulating tumor cells and a promising therapeutic target in advanced gastric Cancer*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2024. 43(1): p. 129.
159. Gorbunova, V., et al., *The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases*. Nature, 2021. 596(7870): p. 43-53.
160. Li, Z., et al., *Asymmetric distribution of parental H3K9me3 in S phase silences L1 elements*. Nature, 2023. 623(7987): p. 643-651.
161. Burns, K.H., *Repetitive DNA in disease*. Science, 2022. 376(6591): p. 353-354.
162. Bensaude, O., *Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?* Transcription, 2011. 2(3): p. 103-108.
163. Falini, B., L. Brunetti, and M.P. Martelli, *Dactinomycin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015. 373(12): p. 1180-2.
164. Boulon, S., et al., *The nucleolus under stress*. Mol Cell, 2010. 40(2): p. 216-27.
165. Gionfriddo, I., et al., *Dactinomycin induces complete remission associated with nucleolar stress response in relapsed/refractory NPM1-mutated AML*. Leukemia, 2021. 35(9): p. 2552-2562.

166. Mohamed, A., et al., *Concurrent chemoradiotherapy with weekly versus triweekly cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Comparative analysis*. Head Neck, 2019. 41(5): p. 1490-1498.
167. Kiyota, N., et al., *Weekly Cisplatin Plus Radiation for Postoperative Head and Neck Cancer (JCOG1008): A Multicenter, Noninferiority, Phase II/III Randomized Controlled Trial*. J Clin Oncol, 2022. 40(18): p. 1980-1990.
168. Pignon, J.P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. Radiother Oncol, 2009. 92(1): p. 4-14.
169. Ma, J., et al., *Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis*. Oral Oncol, 2012. 48(11): p. 1076-84.
170. Budach, W., et al., *Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials*. Radiother Oncol, 2016. 118(2): p. 238-43.
171. Lindström, M.S. and Y. Zhang, *B23 and ARF: friends or foes?* Cell Biochem Biophys, 2006. 46(1): p. 79-90.
172. Sasinkova, M., et al., *NSC348884 cytotoxicity is not mediated by inhibition of nucleophosmin oligomerization*. Sci Rep, 2021. 11(1): p. 1084.
173. Mouliere, F., et al., *Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis*. Sci Transl Med, 2018. 10(466).
174. Shaw, J.A., et al., *Mutation Analysis of Cell-Free DNA and Single Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with High Circulating Tumor Cell Counts*. Clin Cancer Res, 2017. 23(1): p. 88-96.
175. Cho, J.K., et al., *Differential impact of circulating tumor cells on disease recurrence and survivals in patients with head and neck squamous cell carcinomas: An updated meta-analysis*. PLoS One, 2018. 13(9): p. e0203758.
176. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy*. Cancer Discov, 2016. 6(5): p. 479-91.
177. Grisanti, S., et al., *Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance*. PLoS One, 2014. 9(8): p. e103918.
178. Payne, K., et al., *Feasibility of mass cytometry proteomic characterisation of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma for deep phenotyping*. Br J Cancer, 2023. 129(10): p. 1590-1598.
179. Bhatia, S., et al., *New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression*. Front Mol Biosci, 2020. 7: p. 71.
180. Pastushenko, I. and C. Blanpain, *EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis*. Trends Cell Biol, 2019. 29(3): p. 212-226.
181. Semaan, A., et al., *Characterisation of circulating tumour cell phenotypes identifies a partial-EMT sub-population for clinical stratification of pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2021. 124(12): p. 1970-1977.
182. Tada, H., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition Status of Circulating Tumor Cells Is Associated With Tumor Relapse in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Anticancer Res, 2020. 40(6): p. 3559-3564.
183. Buglione, M., et al., *Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival*. Eur J Cancer, 2012. 48(16): p. 3019-26.
184. Liu, K., et al., *Clinical significance of circulating tumor cells in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. Oncol Rep, 2020. 43(5): p. 1525-1535.

185. Zhou, S., et al., *Circulating Tumor Cells Correlate With Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Technology in Cancer Research & Treatment, 2021. 20: p. 1533033821990037.

7. Anhang

7.1 Anhang I

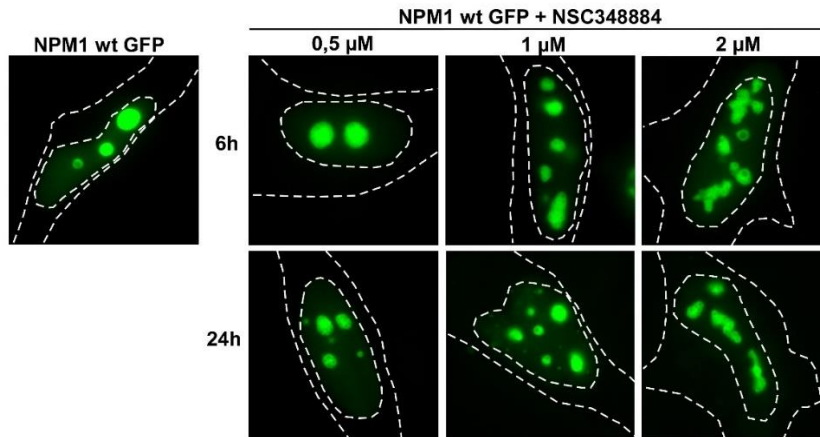


Figure 1 - Anhang: Degradation der Nukleoli bei Verwendung von NSC348884

Die Degradation der Nukleoli dargestellt als qualitative immunfluoreszenzbasierte Zellaufnahme nach 6 und 24 Stunden von HeLa-Zellen, die mit NPM1 wt transfiziert und mit 3 verschiedenen Konzentrationen von NSC348884 (0,5 μm, 1 μm und 2 μm) behandelt wurden.

7.1 Anhang II

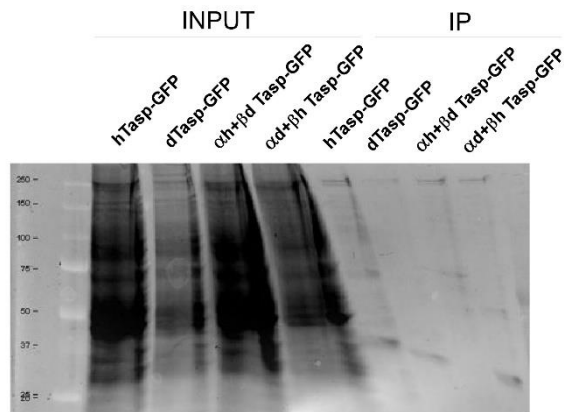


Figure 2 - Anhang: Nachweis transfizierten Chimäre in die Zellkultur

Alle zuvor transfizierten Konstrukte konnten mittels Protein-Nachweis auf Gel mit Hilfe des GFP-Antikörpers bestätigt werden.

7.3 Anhang III: Publikation Review 1

Is small smarter? Nanomaterial-based detection and elimination of circulating tumor cells: current knowledge and perspectives

This article was published in the following Dove Medical Press journal:
International Journal of Nanomedicine

Alena Gribko¹
Julian Künzel¹
Désirée Wünsch¹
Qiang Lu¹
Sophie Madeleine Nagel¹
Shirley K Knauer²
Roland H Stauber¹
Guo-Bin Ding^{1,3}

¹Nanobiomedicine Department/
ENT, University Medical Center
Mainz, Mainz 55131, Germany;

²Department of Molecular Biology II,
Center for Medical Biotechnology
(ZMB)/Center for Nanointegration
(CENIDE), University Duisburg-Essen,
Essen 45117, Germany; ³Institute
of Biotechnology, Key Laboratory
of Chemical Biology and Molecular
Engineering of Ministry of Education,
Shanxi University, Taiyuan 030006,
People's Republic of China

Correspondence: Roland H Stauber;
Guo-Bin Ding
Nanobiomedicine Department/ENT,
University Medical Center Mainz,
I Langenbeckstrasse, Mainz 55131,
Germany
Tel +49 613 117 7002; +49 613 117 6030
Email roland.stauber@unimedizin-mainz.de;
dinggb2012@sxu.edu.cn

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) are disseminated cancer cells. The occurrence and circulation of CTCs seem key for metastasis, still the major cause of cancer-associated deaths. As such, CTCs are investigated as predictive biomarkers. However, due to their rarity and heterogeneous biology, CTCs' practical use has not made it into the clinical routine. Clearly, methods for the effective isolation and reliable detection of CTCs are urgently needed. With the development of nanotechnology, various nanosystems for CTC isolation and enrichment and CTC-targeted cancer therapy have been designed. Here, we summarize the relationship between CTCs and tumor metastasis, and describe CTCs' unique properties hampering their effective enrichment. We comment on nanotechnology-based systems for CTC isolation and recent achievements in microfluidics and lab-on-a-chip technologies. We discuss recent advances in CTC-targeted cancer therapy exploiting the unique properties of nanomaterials. We conclude by introducing developments in CTC-directed nanosystems and other advanced technologies currently in (pre)clinical research.

Keywords: liquid biopsy, cancer biomarker, metastasis, nanomedicine, nanotherapy, therapy resistance

Introduction

The relevance and currency of a scientific topic can be judged by examination of available databases. Searching PubMed using the search criteria “nanotechnology” AND “CTCs”, “nano” AND “CTCs”, and “nano” AND “circulating tumor cells” reveals 131 reports published between 2009 and 2018 (current status May 2018). As illustrated in Figure 1, the number of published reports has increased nearly fivefold over the last 6 years. These results are almost expected, because of the steadily growing application of engineered nanomaterials (NMs) in biotechnology and biomedicine.¹ One of the preferential areas in which nanomedicine will play a vital role is the early diagnosis and efficient treatment of cancer.

The majority of cancer-related deaths are caused by cancer metastasis, accounting for about 90% of cancer mortality.^{2–5} Metastasis is a multistep process comprising the dissemination of cancer cells from primary tumors to distant tissue, which is also known as the invasion–metastasis cascade. Unfortunately, the detailed molecular mechanisms underlying tumor metastasis remain unclear, but it is known that one necessary step in distant metastasis is the transport of tumor cells through the blood system.^{6,7} Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells of solid-tumor origin that have detached into peripheral blood from a primary tumor and circulate in the body. CTCs are able to

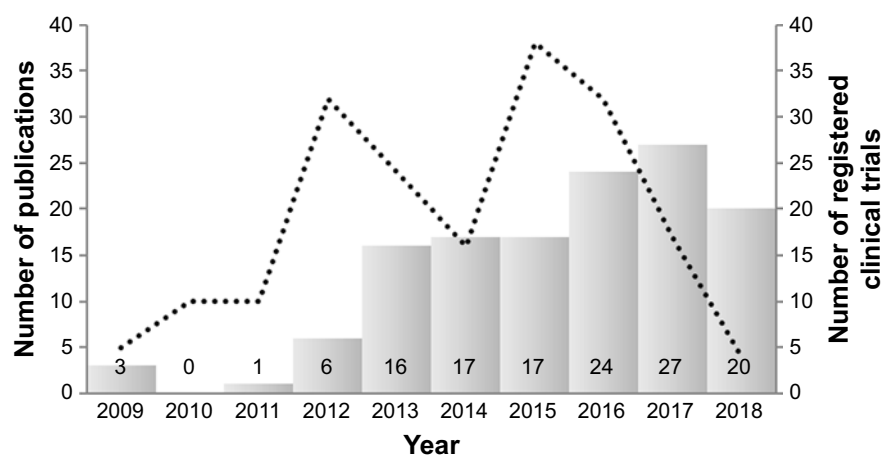


Figure 1 Timeline of PubMed entries.

Notes: Search criteria included “nanotechnology” AND “CTCs”, “nano” AND “CTCs”, and “nano” AND “circulating tumor cells” to determine number of publications (columns). Timeline of World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform entries to display the number of registered clinical trials using search criteria “circulating tumor cells” AND “nano”.

move as individual cells or as multicell clumps. During circulation, only a small number of CTCs extravagate and seed the growth of a secondary tumor.⁸ Therefore, detection and characterization of CTCs with liquid biopsy offer important information on prediction of cancer progression and survival after specific treatment.⁹ The number of detected CTCs usually correlates with the progression of cancer disease,

so that a high number of CTCs give some indication of tumor burden and recurrence.^{10–12} Furthermore, enumeration of CTCs represents an attractive biomarker for monitoring therapeutic response and predicting the possibility of tumor recurrence.³ Cultures of patient-derived CTCs can be most helpful for drug-resistance detection, and make it possible for personalized anticancer-agent screening (Figure 2).^{10,13}

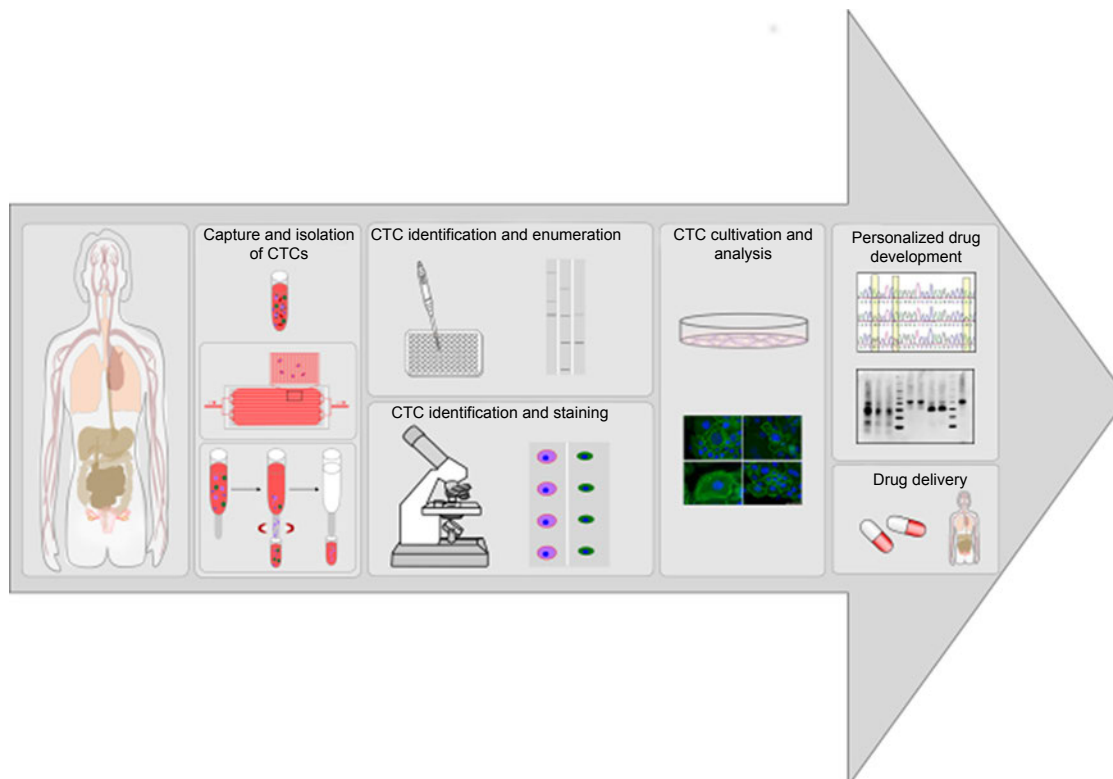


Figure 2 Workflow of patient-derived CTCs for CTC analysis, drug-resistance detection, and personalized drug-delivery systems.

Notes: Patients' blood samples are screened and potential CTCs captured and isolated. Potential CTCs can be enumerated, determined, and stained or cultivated for further analysis. CTC culture can be used for drug-resistance detection and personalized drug development, thereby increasing patient-survival rates.

Abbreviation: CTCs, circulating tumor cells.

The detection of CTCs has been clinically recognized in many cancer types, including breast,¹⁴ colon,¹⁵ lung,¹⁶ melanoma,² ovarian,¹⁷ and prostate cancers.¹⁸ Determination of the existence of CTCs in blood samples of patients during early stages of tumorigenesis is a significant biomarker for early cancer detection.¹⁹ However, because CTCs are very rare, their capture and detection are extremely challenging. Early-stage cancer patients have as few as one CTC in 1 mL blood, including approximately 5 billion red blood cells and 10 million white blood cells.^{20,21} A further challenge is the heterogeneity of the circulating-cell population and their biological and molecular changes during the epithelial–mesenchymal transition (EMT).²² Therefore, efficient isolation of CTCs also requires the ability to handle a very small number of cells.

Since the discovery of CTCs in 1869 by the Australian researcher Thomas Ashworth, a variety of important advancements in this area have been made only during the last two decades.²³ A large number of isolation and detection techniques have been developed, and more than 100 companies are providing CTC-related products and services.²⁴ As also illustrated in Figure 1, querying the WHO International Clinical Trials Registry Platform using the search criteria “circulating tumor cells” AND “*nano*” reveals that about 200 clinical trials have been registered over the last 13 years. The increase in the number of clinical trials mirrors the rising number of CTC/nanorelated publications and thus the growing scientific interest in this research area.

During the past several decades, a variety of advanced nanoscale materials, including metal, metal oxide, semiconductor, and polymeric NMs, have been developed and used in a wide range of areas, such as medicine, electronics, catalysis, and energy conversion and storage.²⁰ NMs have made excellent contributions to clinical medicine, since they possess attractive properties related to their size, shape, and surface characteristics.²⁵ Due to nanoscale effects, these exceptional structural and functional properties of NMs are typically different from either bulk materials or discrete molecules. In recent years, NMs have played an increasingly important role in CTC enrichment and detection. NMs offer a fundamental advantage for early CTC detection, obvious diagnosis, and personalized treatment of malignant tumors.²⁶ Conjugation of NMs with targeting ligands could significantly improve the specificity in CTC recognition. NMs can also be used as drug-delivery systems for CTC-targeted drugs and cancer treatment.²⁷ Furthermore, the large surface:volume ratio of NMs endows them with high cellular binding affinity in the complex blood matrix. Manipulation of NMs gives them the ability of multiplexed detection and

targeting, which are crucial to approach the heterogeneous problem of CTCs.²⁰

In this review, we elucidate the relationship between CTCs and tumor metastasis. An overview of current CTC-enrichment strategies is also provided. We discuss the interactions of nanoparticles (NPs) with such biomolecules as proteins in biological media, and what consequences this may have on detection and isolation strategies. Literature on in vitro NP-based CTC-enrichment systems that has drawn extensive attention due to their clinical potential is also elaborated in this review. We also lay emphasis on microfluidic and lab-on-a-chip technologies for simultaneous CTC enrichment and analysis. Some CTC-detection and -analysis methods are briefly discussed as a guide for the development of potential clinical diagnostic platforms. Last but not least, we summarize research progress in the development of robust nanosystems for CTC-targeted cancer therapy.

CTCs and metastasis

As mentioned, cancer cells that detach from primary tumors followed by intravasation into the circulating system are often called circulating tumor stem cells, due to their stem-like properties.²⁸ During early steps of the metastatic cascade, CTCs are involved in the process of EMT.²⁹ This process is responsible for weakening cell–cell adhesion by downregulation of various cell adhesion molecules (eg, E-cadherin) or epithelial antigens (eg, epithelial cell adhesion molecule [EpCAM]). Due to specific signaling molecules (Wnt/ β -catenin, FGF, or TGF β 1/BMP), EMT initiates the migration for transfer of epithelial-like cells into mesenchymal-like cells.³⁰ These characteristics of EMT lead to the detachment of CTCs from primary tumors, infiltration of the blood circulation, and arrival at distant sites of future metastasis (Figure 3).^{7,31} At distant sites, metastatic colonization is regulated by interactions of CTCs with the local microenvironment. The new microenvironment leads to adaptation processes of the CTCs via a large number of developmental and self-renewal signaling pathways, such as Hh, Wnt, and Notch, initiating proliferation and finally seeding to form metastases.³² To resettle in the target organ, CTCs need to recover their epithelial characteristic, a process known as mesenchymal-to-epithelial transition, the reverse process of EMT.³³ The EMT process is necessary for the initiation of a stem-cell phenotype that exhibits such characteristics as self-renewal ability, high invasiveness, and resistance to apoptosis and therapy.^{34,35} Some of these characteristics developed during the metastasizing process are used as biomarkers for detection and isolation of CTCs, as discussed in the following section.

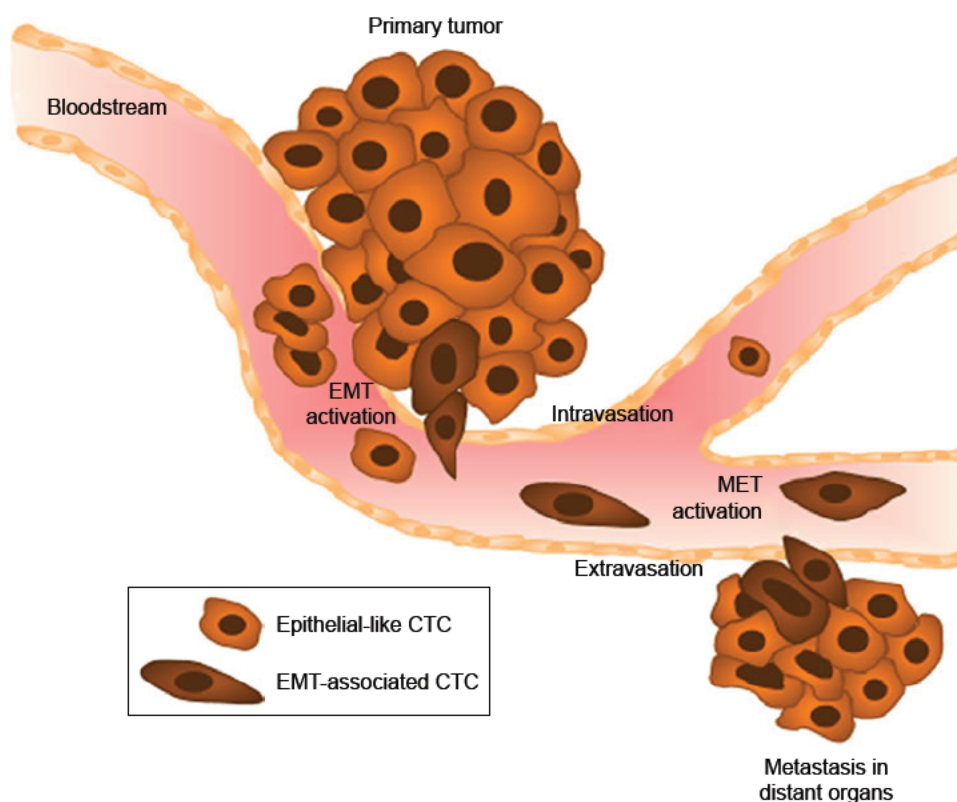


Figure 3 Characteristic stages of tumor-cell dissemination during metastasis.

Notes: Cells from primary tumors undergo epithelial–mesenchymal transition (EMT), leading to the loss of cell–cell adhesion and promoting local invasion into the blood vessels (intravasation). The CTCs produced are able to escape from blood vessels into distant organs of future metastasis (extravasation) after the reverse process (MET), induced by interaction with the local microenvironment.

Abbreviations: CTCs, circulating tumor cells; MET, mesenchymal-to-epithelial transition.

Biological characteristics of CTCs as biomarkers for detection and isolation

Effective capture and accurate identification of CTCs require a high level of sensitivity, as well as specificity, due to the extreme rarity and heterogeneous phenotypes of CTCs in the blood system. Some unique properties of CTCs can be employed to distinguish CTCs from surrounding normal hematologic cells and also for their enrichment and detection.²⁷ Current CTC-enrichment methods are based on either physical properties (size, density, deformability, and electrical charge) or biological features (cell-surface protein expression, invasive capacity, and viability).³⁶ Commonly used isolation methods based on physical properties include density-gradient centrifugation, membrane filtration, and microchip-based capture platforms. These methods are less specific, although they are fast, simple, and label-free. Therefore, “physical methods” are usually used in combination with the antibody-labeled biological method. Examples of biological characteristic-dependent isolation methods

include immunomagnetic separation and substrate- and microchip-based capture platforms.²⁰

For most biological detection methods, specific cancer biomarkers are indispensable. Cancer biomarkers are the measurable molecular changes between normal and cancerous tissue of patients. Each cancer type has specific molecular characteristics and pathological evolution. As such, the identification of these biomarkers is important for further applications in CTC capture and isolation.^{37,38} For example, CTCs are commonly described to express EpCAM, cytokeratins, and to be nucleated (identified by staining with a nuclear dye, such as DAPI), but do not express the white blood-cell surface marker CD45. The use of HER2, vimentin, ALDH1, and CD44 is also common for CTC-specific detection.^{39–42} To sum up, it can be stated that a variety of epithelial-, mesenchymal-, and stem-cell markers can be applied for positive results in CTC-specific detection. Some examples of these key biomarkers are listed in Table 1. In addition, “negative markers” can be used for CTC detection in order to determine and eliminate debatable cells. These markers

Table I Summary of key biomarkers used for CTC detection

Epithelial markers	Mesenchymal markers	Stem-cell markers	Lymphocyte, platelet, and apoptosis markers
EpCAM	N-cadherin	ALDH1	CD45 (lymphocytes)
CK8, CK18, CK19	Cell-surface vimentin	CD44	CD61 (megakaryocytes, platelets)
E-cadherin	Twist1	Gangliosides (GD2, GD3, GD1a)	M30 (apoptosis)
ZO1	Akt and PI3K	ABC proteins	
ESPR1	Zeb1		
HER2	Alternative splicing proteins (FGFR2IIIc, Mena, p120 catenin)		
	Pls3		

Abbreviation: CTC, circulating tumor cell.

include, eg, white blood-cell marker CD45, platelet marker CD61, and apoptosis marker M30.^{39–42}

Detection and isolation methods with nanomaterials

NMs can largely improve the efficiency and sensitivity of CTC enrichment, isolation, and detection. The unique properties of NMs can be used to accelerate detection and overcome some limitations in CTC detection.²⁷ For safe application of NMs as a diagnostic device in cancer therapy, it is necessary to have a detailed understanding of interactions of NPs with cells, tissue, and organisms.⁴³

Nanoparticle-based CTC-detection and -isolation systems

Extensive information about the behavioral and physico-chemical properties of NMs that are engineered in technically stable environments, such as technical products, is needed to understand their changes in complex physiological or natural environments.¹ Due to a high surface:volume ratio, NPs are quite likely to interact with (bio)molecules upon contact with biological and abiotic environments. This interaction leads to the formation of the so-called (bio) molecular corona. This (bio)molecular corona is formed spontaneously like an adsorption layer on the NP surface in complex biological environments, including simple and higher organisms. The interaction of NPs with organisms and control of their physiological responses are mediated by the adsorption layer, rather than the NP surface. Also, biomolecular adsorption can be affected by different properties of NPs, including shape, size, composition, surface charge, and surface functionalization.^{44–47}

Protein absorption to NP surfaces was postulated in the pioneering work by Vroman, and thus is known as the “Vroman effect”.⁴⁸ This effect describes a dynamic change

in protein-corona composition by adsorption and desorption. Consequently, in a complex biofluid like blood, which contains thousands of different proteins, abundant proteins are expected to desorb from the NP surface and be replaced by rare ones with higher affinity, leading to a relatively constant level of adsorbed proteins.^{47,49,50} The term “protein corona” was introduced to the NP community in 2007 by Cedervall et al.⁴⁹ Subsequently, the loosely defined term “hard protein corona” was described as a strongly bound layer of biomolecules, representing an analytically approachable protein/biomolecule signature of NPs in a determined environment.^{1,44,50} Some models further indicate the presence of a “soft protein corona” around the “hard protein corona”, consisting of loosely associated, rapidly exchanging, and highly complex biomolecule layers without direct contact with the NPs.^{1,44,49,51,52} Nevertheless, since it is determined that this “soft protein corona” (also called “soft corona cloud”) desorbs during purification processes, its presence, analytical dissection, and important effects at the nano–bio interface are fully affirmed. These terms do not describe all types of coronas. Furthermore, unspecific ligand–receptor interactions have hardly been discussed in the context of biology or medicine, and no differences between “soft” and “hard” ligand–receptor interactions have been made. Current literature reveals that the term “soft” versus “hard” corona does not discriminate the corona types well enough to resolve the scientific questions. This is the reason it is recommended to term analytically approachable NP–protein complexes as “protein coronas”.¹

Magnetic nanoparticles and nanoclusters

One of the leading methods for CTC isolation is magnetic separation using magnetic NPs (MNPs; Figure 4). These MNPs bind to cells *in vitro* or *in vivo* and can be separated in the presence of an external magnetic field. Magnetic

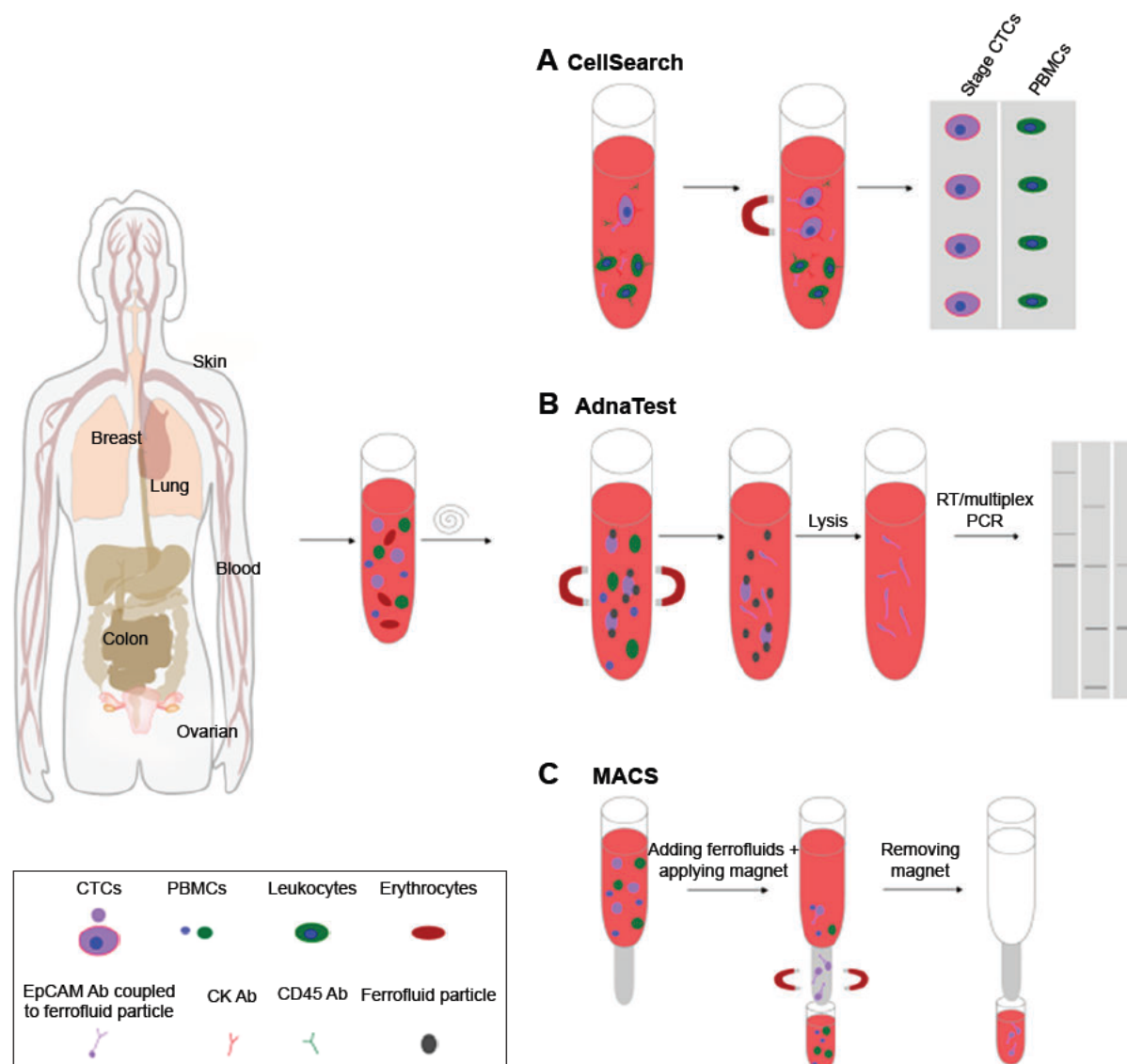


Figure 4 Illustration of methods for CTC isolation by magnetic separation using magnetic nanoparticles (NPs).

Notes: (A) The CellSearch system enriches CTCs using iron NPs linked with anti-EpCAM antibodies (Abs). Labeled cells are magnetically separated, and can be evaluated by immunofluorescence staining. (B) AdnaTest allows the immunomagnetic enrichment of CTCs via epithelial and tumor-specific antigens. After separation of potential CTCs from PBMCs, labeled cells are lysed, in order to analyze CTC gene expression via multiplex PCR. (C) Process of MACS using superparamagnetic Fe NPs within a magnetized steel-wool column.

Abbreviations: CTCs, circulating tumor cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; MACS, magnetically activated cell sorting; RT, real time.

NMs are related to dispersed MNPs or MNP clusters that are assembled in an organic or inorganic matrix.^{20,21} The most commonly used MNPs include iron, cobalt, chromium, and their oxides exhibiting a magnetic moment after application of an external magnetic field.⁵³ Iron oxide MNPs, such as magnetite (Fe_3O_4) NPs, are chemically stable and biocompatible.⁵⁴ Depending on the particle shape and size, the magnetic response of iron oxide MNPs can be ferromagnetic or superparamagnetic. Whereas ferromagnetic NPs have remnant magnetization after removal of the external magnetic field, superparamagnetic NPs lack this characteristic, because of thermal fluctuations.²⁰ Moreover, ferromagnetic NPs

cannot be used for cell isolation, due to their poor stability, leading to aggregation in aqueous media. Consequently, only superparamagnetic NPs (SMNPs) or clusters thereof are suitable for cell isolation. SMNPs usually need suitable surface functionalization, because they also tend to get agglomerated in aqueous media.^{21,55} The surface of SMNPs is often modified by coating or grafting with surfactants, polymers, polyethylene glycol (PEG), polypeptides, or hydrophilic inorganic materials (silica and gold).²¹

Ding et al described an efficient magnetic capture and sensitive fluorescent labeling of CTCs based on near-infrared fluorescence Ag_2S nanodot-based signal amplification

combing with immunomagnetic spheres.⁵⁶ In addition, anti-EpCAM antibody labeling with magnetic nanospheres allows high capture efficiency of rare CTCs in whole-blood samples.⁵⁶

Another method for CTC enrichment and isolation, so-called micro-nuclear magnetic resonance, allows fast and highly sensitive biomarker detection. Cells labeled with immunospecific SMNPs are detected with the help of magnetic resonance technology. The immunospecific SMNPs used are generally a few nanometers smaller than the beads, which are typically used for immunoseparation. The signal detection is based on magnetic interactions such that micro-nuclear magnetic resonance can be conducted with minimal sample-purification steps. This results in a simple assay procedure and reduced cell loss.^{57,58}

The gold standard in CTC isolation is the US Food and Drug Administration (FDA)-approved CellSearch system, which enriches CTCs using 120–200 nm iron NPs (ferrofluid) linked with anti-EpCAM antibodies⁵⁹ (Figure 4A). It is a fact that the magnetic force is proportional to the number of bound NPs.⁶⁰ For this reason, cells bound to NPs are isolated more quickly than free NPs in a solution under the same external permanent magnet field, and thus cells can be selectively enriched. However, the CellSearch system is primarily designed for enumeration of CTCs with an epithelial origin expressing EpCAM and keratin. The workflow includes two instruments performing separate steps. While AutoPrep is executing CTC capture and immunostaining, the CellTracks analyzer evaluates the immunofluorescence-stained cells with semiautomated fluorescence microscopy. The specificity of sensitively captured and selected cells can be further increased by immunofluorescence staining with antikeratin and anti-CD45 antibodies. CD45-positive immunostaining determines captured cells as leukocytes.^{53,61}

On one hand, CellSearch represents a thorough, clinically validated method for CTC isolation, but on the other hand it has several limitations, due to its dependence on EpCAM expression. As such, only a very small proportion of CTCs in the blood sample of a patient can be detected in a limited interval. The process of EMT and accompanying downregulation of epithelial markers like EpCAM have already been discussed.⁵³

A comparable method for CTC isolation making use of magnetic enrichment is the AdnaTest (AdnaGen, Langenhagen, Germany). By using a mixture of magnetic microbeads, such as the superparamagnetic Dynabeads, AdnaTest allows the immunomagnetic enrichment of CTCs via epithelial and tumor-specific antigens (Figure 4B). Here, antibodies

against EpCAM and tumor-associated antigens are simultaneously conjugated to magnetic beads for labeling of CTCs in peripheral blood. Afterward, labeled cells are lysed and mRNA extracted from captured cells and transcribed into cDNA. Subsequently, multiplex PCR is employed to analyze CTC gene expression.^{62,63} Compared to CellSearch, AdnaTest exhibits improved enrichment efficiency, due to the usage of two antibodies and the size of magnetic particles.

Another variation of the described magnetic isolation method is magnetically activated cell sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). This differs from CellSearch and AdnaTest in using superparamagnetic Fe NPs combined with a magnetized steel-wool column. By removing the column from the external magnetic field, cells can be eluted from the column (Figure 4C). The advantage of this technique is the combined usage of magnetic beads coupled with various antibodies and the possibility to label cells with fluorescent antibodies. Thereby, it is possible to achieve direct enrichment and evaluation of captured cells without further detaching or staining procedures.⁶⁴

All the aforementioned methods represent positive selection strategies for the specific isolation of CTCs from a bulk of other cells. The major limitation of positive CTC selection is that cells that do not express the targeted markers will not be captured. The use of negative-depletion strategies with magnetic beads is a possible solution to overcome this hurdle. For negative depletion, a two-step procedure has been suggested comprising lysis of red blood cells and removing white blood cells by labeling with CD45-specific MNPs. Yang et al demonstrated that this method reduced the number of blood cells in a blood sample by two orders of magnitude.⁶⁵ In fact, for blood samples spiked with cancer cells, a recovery rate of about 83% was accomplished. In summary, it remains a great challenge to capture CTCs efficiently, reduce the great number of normal blood cells in a sample, and protect rare CTCs from damage during lysis and different washing steps.²¹

Gold nanoparticles

Another extensively used NP type for improving the efficiency of CTC enrichment and capture is gold NPs (Au NPs) with enhanced light-absorption and -scattering properties. Binding between Au NPs and CTCs can be monitored quantitatively via photoacoustic signals or surface plasmon resonance (SPR) shifts.^{53,66,67} Researchers have synthesized a variety of different Au NPs, including gold nanospheres, nanorods, and nanoshells, that can be incorporated with targeting moieties, imaging or therapeutic agents, and other functionalities.^{53,68}

Over the last two decades, the advances in synthetic techniques of NP production have enabled the preparation of Au NPs with a well-controlled size distribution from 2 nm to >100 nm. Au NPs display an SPR peak in the visible range of 510–550 nm, depending on particle size. An increase in particle size of Au NPs leads to a red shift in the SPR peak, and the width of the absorption band correlates closely with the size distribution of NPs.^{66,69} The SPR band of gold nanorods splits into two modes: one longitudinal at 520–550 nm and the other transverse vertical to the long axis at 720–750 nm.⁵³ Due to this unique SPR splitting, gold nanorods have been widely employed for CTC detection using techniques like photoacoustic imaging.⁷⁰ The SPR peak of gold nanoshells can be tuned in the range from visible to the near-infrared region by changing the ratio of the core size to its shell thickness. Generally, they have an SPR band of 850–900 nm.^{53,66}

Au NPs can be utilized for *in vivo* imaging and *ex vivo* diagnostic sensors, due to their sensitivity, throughput, and flexibility. One example of *in vivo* application is CTC targeting by injection of Au NPs in the bloodstream. This allows real-time *in situ* monitoring of CTCs without blood sampling, sample preparation, or the following CTC-isolation steps. Furthermore, this application enables the phagocytic clearance of CTCs upon binding.^{21,53} The efficiency of these CTC-targeted Au NPs depends on their ability to overcome the high shear stress of blood circulation, escape the immune response, and avoid unfavorable accumulation in organs. Due to the existence of target antigens/markers on normal cells, aspecific binding of NPs, and a high signal:background ratio, this method will produce some false-positive results.⁷¹ PEGylation of Au NPs is a commonly used strategy to overcome some of these issues, resulting in extended circulation time and decrease in aspecific binding.^{72,73}

Photoacoustic imaging using Au NPs as contrast agent is an applicable *in vivo* technique for the detection of CTCs. This method utilizes acoustic waves generated by a laser, and detects acoustic vibrations resulting from the NP absorption of laser energy in blood vessels.^{70,74,75} At SPR wavelength, Au NPs show a higher extinction coefficient compared to conventional organic dyes. Furthermore, the absorbed energy of Au NPs can be released rapidly by efficient heat conversion. Afterward, the efficient photothermal conversion can also be translated into highly efficient acoustic waves via the thermoelastic mechanism.⁷⁵ In view of all these properties, this technique is quite suitable for monitoring physiological reactions of tumors, as well as enumeration and circulation of CTCs.

Zhang et al demonstrated research on spectra of blood cells, several tumor cells, immortalized cells, and clinical

sample cells using silver film–substrate surface-enhanced Raman scattering (SERS).⁷⁶ Raman spectroscopy is a commonly used unique vibrational spectroscopic technique that is able to measure inelastic light-scattering processes to provide fingerprint molecular identification information of cancer patients' blood cells and tissue. These cells display great differences in characteristic nucleic acid peaks. Clinical cancer-cell results display characteristic nucleic acid peaks with greater enhancement in comparison to red or white blood cells, which have almost none or only a slightly increased SERS signal. This study demonstrated a method for detection of CTCs with label-free SERS spectra by identifying blood cells and some kinds of tumor cells. These cells need a defined amount of DNA to be differentiated from white blood cells, which represents a disadvantage of this method.⁷⁶

An *ex vivo* application of Au NPs for direct binding and separation of CTCs from patient blood is modification of Au NPs with CTC-specific ligands.⁷⁷ This *ex vivo* CTC-detection method exhibits two advantages: first, it protects patients from the potential toxicity of labeled NMs for CTC capture, and second, it enables cultivation and analysis of the isolated cells. Au NPs can also be immobilized on a nanostructured surface (eg, an Au NP–modified chip) to allow binding of CTCs and label-free enumeration. Park et al described a strategy to isolate and release cancer cells from whole blood using a thiolated ligand-exchange reaction with Au NPs on a herringbone chip (NP–HBCTC chip). In comparison to antibodies coupled on flat silicon oxide surfaces, antibody-coated NPs that were chemically and directly assembled onto the HBCTC chip have several advantages: improvement of specific interaction of cancer cells with antibodies by increasing the available surface area, possibility for disruption of the metal–thiol interaction, resulting in the release of cancer cells from the surface, released cancer cells can be used for *ex vivo* cell culture and further molecular analysis, and the chemically self-assembled monolayers allow optimization of this method for application in complex surface topography without additional changes in the process.^{21,78}

Fluorescence detection with quantum dots

Besides enrichment and capture of CTCs, there are some methods specialized for the detection and analysis of these rare cells by cytometry or nucleic acid–based approaches. Cytometry allows an analysis of cells based on protein expression. Examples of this type of method are immunohistochemical staining, flow cytometry, and spectroscopic detection. The advantage of cytometry methods

is the possibility to analyze detected cells further if cell lysis is not necessary for former procedures and to examine cell morphology if cells are reported microscopically. Nucleic acid-based methods assess tumor-specific genetic alterations by analyzing whole cells or extracted RNA or DNA by PCR, reverse-transcription PCR, and whole-genome amplification. Due to interference caused by the expression of normal cell markers, nucleic acid-based methods usually have low specificity, but high sensitivity.^{20,79}

One of the leading techniques for CTC detection and analysis is the fluorescence-detection method. Organic dyes are usually used as imaging agents, although their use is limited by photobleaching (allows continuous dynamic imaging over minutes to hours), spectral overlap, low signal intensity, and the necessity of multiple light sources to excite different fluorophores in multiplex detection.^{20,80}

Quantum dots (QDs) are an example of NPs with inherent fluorescence that have been widely used for CTC detection with high quantum profit and tunable emission wavelengths. QDs display longer fluorescence lifetimes compared with organic fluorophores, which is important to enhance the sensitivity of surface marker-dependent CTC capture.⁵⁴ Emission wavelengths of QDs can be tuned for a range of imaging applications, particularly in multicolor labeling, for simultaneous detection of multiple targets. QDs with different emission wavelengths but the same excitation wavelengths are applied for capture of heterogeneous CTCs.⁸¹ Additionally, QDs can be used for CTC detection through monitoring of extracted nucleic acids. Zhang et al developed a microfluidic bead-based nucleic acid sensor that depended on multienzyme-NP amplification and QD labeling. The simple concept of this sensor quantified targeted DNA by measuring fluorescence-signal intensity from QDs.⁸² Moreover, the solubility of QDs can be improved by surface functionalization with polymeric ligands or a layer of hydrophilic inorganic materials. Both QD functionalizations can be accomplished by ligand exchange or additional coating.⁸³ Surface-functionalized QDs have been employed in various analysis methods, such as fluorescence resonance energy transfer-based cellular labeling⁸⁴ and CTC detection.²¹ Due to their strong and stable fluorescence, QD-based ex vivo CTC detection is highly relevant for clinical applications. However, the use of QDs for in vivo CTC detection provokes heavy-metal toxicity.⁷⁷

Magnetic-optical bifunctional nanoparticles

Magnetic-optical bifunctional NPs are composed of MNPs and optical components, such as fluorescence dyes, QDs, or

X-ray contrast agents. Fluorescent-magnetic bifunctional NPs have been used especially for multimodal imaging. It has been shown that fluorescent MNPs can be used for isolation and detection of multiple types of tumors simultaneously.^{53,85–87}

Song et al demonstrated the targeting of leukemia Jurkat T cells and prostate LNCaP cells by labeling anti-CD3- and anti-PSMA-conjugated MNPs with red- and yellow-fluorescence dyes.⁸⁷ The Jurkat and LNCaP cells were detected and distinguished using a magnet and fluorescence microscopy. This MNP-based system has the potential to be used as an ex vivo CTC-capture platform for CTC enrichment by exposure to magnetic force (eg, CellSearch). The combination of other materials with MNPs can lead to increased capture efficiency and more obvious CTC identification and differentiation using multimodal imaging.⁵³

Kim et al developed a one-step detection method of CTCs in ovarian cancer by using a combination of silica (SiO₂) MNPs with incorporated organic dyes (rhodamine B isothiocyanate [RITC]) in the silica shell and conjugated cell surface-associated MUC1 on its surface. An MUC1-positive human ovarian cancer cell line and a negative human embryonic kidney cell line were used to study the specific targeting efficiency of MUC1-SiO₂ MNPs (RITC). Based on flow cytometry, this detection technology was capable of detecting 100 cells of ovarian cancer origin in 50 μ L whole blood.⁸⁸ Fluorescent SiO₂ NPs can also be conjugated to an aptamer for CTC detection. One detection method of leukemia cells using aptamer-modified fluorescent SiO₂ NPs was presented by Tan et al.⁸⁹ Due to selection of specific aptamers, this method could be adaptable to other types of cancer. Additionally, aptamer-NP conjugation can be advanced for drug-delivery applications.⁸⁹

Graphene and graphene oxides

Graphene is an atomically thick, two-dimensional sheet of sp²-hybridized carbon that is ordered in a honeycomb structure. Additionally, it is the basic building block for graphitic materials of other dimensionalities, such as graphite and carbon nanotubes (CNTs). Graphene has specific chemical and physical properties, such as high surface area, good mechanical strength, high intrinsic mobility, and great thermal conductivity with optical transmittance and electrical conductivity.^{53,90,91} Charge transfer between adsorbed molecules and graphene induces their chemical response. Due to the excellent electromagnetic detection of small biomolecules, graphene and graphene oxide (GO) have been applied for electrical CTC detection.⁹² GO can be

functionalized through PEG-based chemistry, and GO size is controllable by sonication time and filtration.^{93,94} Moreover, one of the most important properties of GO for biological and medical research is improvement in imaging by taking advantage of optical transparency.⁹⁵

Wu et al presented GO as a starting point for the electrical capture, detection, and fluorescence imaging of CTCs.⁹⁶ After treatment of a glassy carbon electrode with chitosan, GO was deposited and reduced. Anti-EpCAM was conjugated to the surface by a cross-linker glutaraldehyde for cell capture. The combination of anti-EpCAM and a marker for hepatocellular carcinoma, anti-GPC3, was conjugated to SiO₂ NPs modified with ZnSe and incubated with the captured cells. Enumeration of captured cells was performed by square-wave voltammetry measurements, as well as fluorescence imaging. For proof of principle, cells were detected at concentrations as low as five cells/mL using spiked hepatocellular carcinoma cells. Further experiments with spiked cells in blood and clinical samples were not performed.

Furthermore, a novel biosensor with GO NPs for detection of breast cancer biomarkers was developed by Myung et al.⁹⁷ As shown by transmission electron microscopy, amine-terminated SiO₂ NPs were coated with negatively charged GO. These GO-coated NPs were self-organized on the surface of functionalized oxide substrate with a metal electrode. Reduction of GO to graphene induced electrical conductivity enabling the detection of HER2, a marker for breast cancer, by measuring the relative conductance change.

Further research by Yoon et al led to the application of GO chips for sensitive CTC capture.⁹² GO nanosheets were self-assembled on a gold-patterned silicon surface via a positively charged intercalating agent and functionalized with PEG.⁹⁸ Anti-EpCAM antibody was used to functionalize the substrate by utilizing cross-linker and biotin-avidin linker chemistry. Different cancer cell lines (MCF7, Hs578T, PC3) were spiked into buffer or blood and flowed through the GO chip. Subsequently, captured cells were cultivated on the gold-patterned surface with GO sheets, which was highly beneficial, due to the virtually two-dimensional capture surface. Blood samples from patients with breast, pancreatic, and early lung cancer were processed using these devices with a capture result of two to 23 CTCs/mL. The cultivation of captured CTCs opens the possibility for further applications and analysis.⁹²

Tian et al developed an ultrasensitive electrochemical detection method based on a composition of reduced GO–Au NPs as a support material with copper(II) oxide (CuO) nanozymes.⁹⁹ CTCs of a breast cancer cell line (MCF7) were

detected by recognition between MUC1 on the cancer-cell membrane and MUC1 aptamer on an electrochemical cytosensor. CuO nanozymes functioned as a catalyst and were used as a signal-amplifying nanoprobe. Due to the specific composition of MUC1 and MUC1 aptamer, the cytosensor detected CTCs easily in a wide range of 50–7,000 cells/mL with a very low detection limit.⁹⁹

Dual enrichment and detection

As mentioned, the efficiency of CTC capture can be effectively improved by using combinations of isolation materials or conjugated multiple antibodies. The exact analysis of in situ expression of different surface biomarkers may be limited by using multiple antibodies for CTC capture, because a lot of biomarkers used for CTC capture are also important for CTC characterization. For each cancer subtype, only a limited number of surface proteins applicable as biomarkers are known. Additionally, the extremely rare nature of CTCs is another limitation factor.

Lee et al developed hybrid NPs to offer the possibility to perform in situ expression analysis and positive selection of biomarker-expressing cells by targeting the same marker using a single compound.¹⁰⁰ The hybrid NPs consisted of three parts: antibodies that bound to specific proteins on CTCs, QDs that emitted fluorescence signals, and biotinylated DNA, which allowed capture of the CTC–hybrid NP complex to a chip. The DNA linker was cleaved off by restriction enzymes after cell capture to recover CTCs from the chip.^{100,101}

In this study, the authors used three breast cancer cell lines (MCF7, SKBR3, and MDA-MB-231) for the evaluation of hybrid NPs. Each hybrid NP exhibited an exposed biotin arm binding to streptavidin-coated pillars in the “capture-and-recovery chip”. Thereby, capture efficiency depended on the density of biotin in hybrid NP–bound cells. To determine capture efficiency, breast cancer cells were spiked into blood samples that were incubated with hybrid NPs. Afterward, the cell suspension was flowed through the capture-and-recovery chip, and captured cells were screened based on cell morphology and immunofluorescence staining. Captured cells were released from the chip by treatment with restriction enzymes and transported to the recovery chamber by microfluidic flow. To increase CTC-capture efficiency, different antibodies – EpCAM, EGFR, and HER2 – were used simultaneously. This allowed the isolation of CTCs that had undergone EMT and thus lacked or only weakly expressed EpCAM. With three different hybrid NPs, one for each of three proteins, CTC-capture efficiency of about 88%

was achieved. This result included about 90% of isolated breast cancer cells (MDA-MB-231), which are EpCAM-negative cells, that were captured. Additionally, the captured cells were simultaneously identified by their *in situ* protein expression, with an identification accuracy of about 92%. To sum up, this method succeeded in simultaneous capture, enumeration, and identification of CTCs based on *in situ* protein expression.¹⁰⁰

Carbon nanotubes

CNTs have been used in advanced research applications because of their remarkable electrical, mechanical, and physicochemical properties. CNTs are graphitic hollow filaments of alterable lengths that can reach several hundred micrometers. Two types of CNT are known: single-walled (SWCNTs) and multiwalled (MWCNTs). SWCNTs comprise a single cylindrical sheet of graphene, and MWCNTs comprise several concentric, coaxial, rolled-up graphene sheets. The size of CNTs differs, with a diameter typically ranging 0.4–3 nm for SWCNTs and 2–200 nm for MWCNTs.¹⁰² CNTs also include carbon nanofibers, which defend a less perfect graphene-sheet arrangement featuring layers of graphene nanocones. These nanocones are also called “cups” and usually denote stacked-cup CNTs, which consist of strong flexible filaments of 70–200 nm in diameter and 10–100 μm in length.¹⁰³ Chemical vapor deposition is the most used method for CNT synthesis.^{102,104} CNTs behave as a metal or semiconductor, depending on their diameter and helicity. Possible variants of the conductance of CNTs can be induced by mechanical deformations or chemical binding, which can be detected by electron-current signals. All properties of CNTs mentioned make them suitable chemical and biological sensors.²⁰

Shao et al developed an application of CNTs for electric detection of cancer cells in blood with an SWCNT field-effect transistor array device.¹⁰⁵ This device comprised 20 pairs of electrodes with a single CNT between each pair. Additionally, the CNTs were functionalized with antibodies to recognize breast cancer cells. The binding of cancer cells to the CNTs resulted in a 60% decrease in conductivity. This assay contains a sensing area that was able to detect potential CTCs with low protein expression. Another advantage of this system is that enrichment steps are no longer needed, with the result that cancer cells can be directly tested. Nevertheless, this assay also has some challenges, like a very small volume of analyzed patient blood (<10 μL), bearing the risk of missing CTCs. There is also the possibility of CTC-counting difficulties, because the signal is determined by a single cell reaching the space between the electrodes.

Another example of using the electrical properties of CNTs for detection of CTCs from whole-blood samples was demonstrated in a recent study by Liu et al.¹⁰⁶ The researchers developed a sensitive CNT-based biosensor for direct detection of CTCs in whole blood using the good conductivity of MWCNTs. This biosensing method is based on binding of anti-EpCAM antibodies to cancer cells, resulting in increased electron-transfer resistance. The detection of cells was limited to five cells per mL of blood, and an electrical response was observed that was proportional to the concentration of liver cancer cells.^{54,106}

Microfabricated filters

Since the majority of blood cells are smaller than CTCs, membrane-microfilter devices are a suitable tool for separation of CTCs from whole-blood samples by cell-size exclusion.^{12,42,107,108} Whereas CTCs can vary in size and shape, typical dimensions of blood cells are 5–9 μm for erythrocytes, 10–15 μm for granulocytes, 7–18 μm for lymphocytes, and 12–20 μm for monocytes.¹⁰⁸ The size-exclusion approach makes use of a parylene-based membrane-microfilter device comprised two parylene-membrane layers and a photolithography-defined gap to minimize stress. Cells isolated with this microfilter device are viable and can be used for further molecular analysis.^{107,108}

Zheng et al developed a parylene-based membrane-microfilter device with integrated electrodes containing 11 μm -diameter circular pores.¹⁰⁸ The smallest distance between the pair of electrodes for each pore was 8 μm . For the experiments, a defined number of LNCaP cells (metastatic prostatic adenocarcinoma cells) were stained with hematoxylin and spiked into blood samples. This cell suspension was loaded into a syringe and dispensed to pass through the filter. The flow through was collected by the bottom syringe. Immunostaining was used to distinguish potential CTCs from other cells on the filter. The recovery rate of the membrane filters was evaluated by hemocytometry using the hematoxylin staining of LNCaP cells. To sum up, the filter design resulted in 89.0% $\pm$ 9.5% recovery from blood. The advantage of this technology is the possibility of label-free isolation of CTCs and sensitivity to cell-size in a blood sample. However, the size and shape of CTCs is rather heterogeneous, leading to the risk of losing CTCs that are smaller than the filter pores.⁴²

Microfluidics and “lab-on-a-chip” technology

In comparison to conventional methods, microfluidic lab-on-a-chip devices provide unique platforms to perform isolation

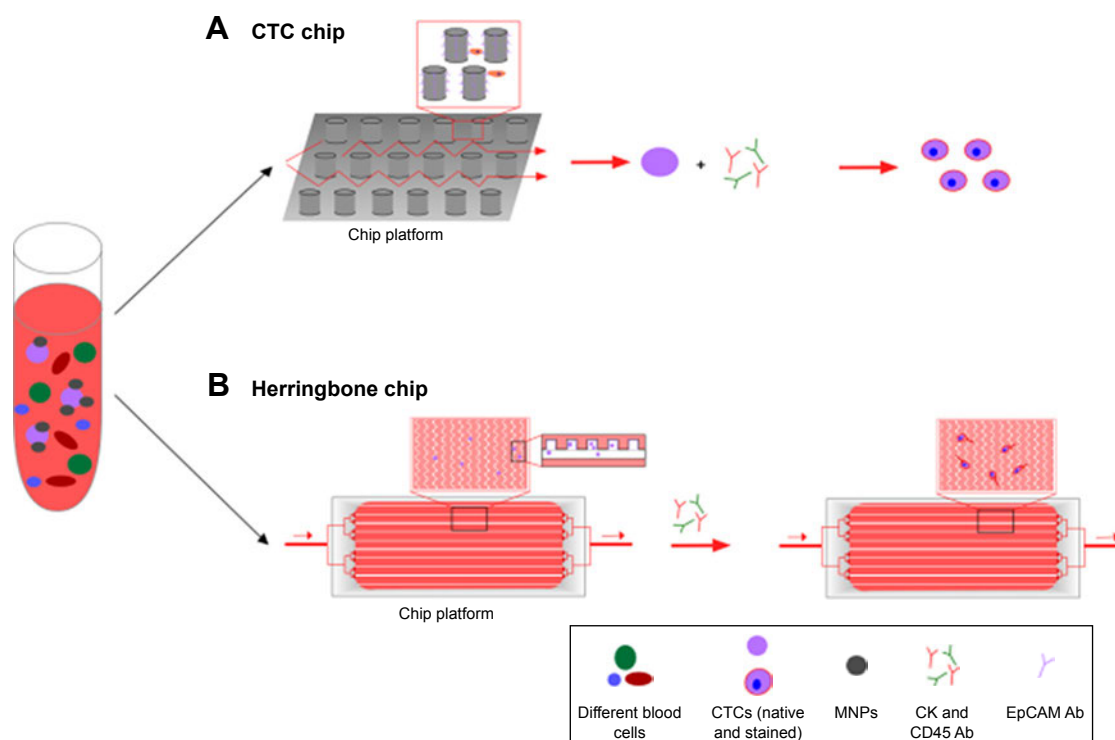


Figure 5 Microfluidic chip design of CTC chip (A) and herringbone chip (B).

Notes: Whole-blood sample is pushed through the surface of the chip, which is coated with a CTC-specific antibody, such as EpCAM. Chips differ in their architecture, containing either Ab-coated microposts (A) or herringbone-etched microchannels (B). Captured cells are stained for CK, CD45, and DAPI. Identified CTCs can be enumerated.

Abbreviations: CTC, circulating tumor cell; Ab, antibody; MNPs, magnetic nanoparticles.

and analysis of CTCs with only one chip, avoiding the imminent loss of these rare cells during the experimental steps of sorting, enumeration, and analysis.¹²⁶ This technology has become mainstream in CTC enrichment and detection, due to its cost-effectiveness, miniaturization, and improvement in efficiency, since it can be integrated into other techniques.^{13,127} The development of the majority of current microchip platforms is based on magnetic force, affinity, size, or other physical properties.¹²⁸ Two types of microfluidic devices are used for CTC detection: the immunomagnetic-based method for CTC detection (eg, CTC chip), and antibody labeling combined with physical isolation (Figure 5), which can consist of different materials like silicon, glass, or thermopolymer.

An example of microfluidic applications for CTC detection was presented by Ortega et al and based on a microfluidic immunosensor with synthesized silver NPs covered by chitosan.¹²⁹ Integrated silver NPs–chitosan in the microfluidic immunosensor were functionalized with anti-EpCAM antibodies to capture EpCAM biomarkers in peripheral blood samples. Subsequently, bound EpCAM biomarker was recognized by HRP enzyme–labeled secondary antibodies that reacted with its enzymatic substrate. This enzymatic process

generated a product through oxidation on the electrode surface, which resulted in a current magnitude proportional to the level of EpCAM. This microfluidic immunosensor method presents a low-cost and simple application for detection and reliable prognosis of epithelial-origin tumors in biological samples.¹²⁹

Immunomagnetic-based CTC chips

The opportunity to perform immunomagnetic separation on a microfluidic device that combines the advantages of two techniques, immunomagnetic separation and the microfluidic device, resulted in a new developmental stage in immunomagnetic separation. The capture efficiency depends on the magnetic strength and drag force under the flow condition. Cells bound to large numbers of NPs can be captured more efficiently by using both forces.²⁰ Typically, the cell isolation in microfluidic channels is performed in the presence of a permanent magnet located under the bottom of the chip.^{91,130} It has been shown that >85% of cancer cells spiked in blood can be recovered by EpCAM antibody–functionalized Fe_3O_4 NPs at a speed of 10 mL/h using NdFeB block magnets.^{20,130} Separation efficiency can be improved by inverting the microchannel so that the magnet is placed on top of the

channel, which results in gravity direction opposite to the magnetic field.¹³¹

Miniaturized microfluidic technology, called micro-Hall detection, allows fast screening of CTCs in a blood sample. Using this system, MNP-immunolabeled cells can be detected via monitoring the magnetic moments of cells in flow on a single microfluidic chip. Micro-Hall detection can selectively and sensitively detect a wide range of cellular biomarkers and can be employed for screening of multiple biomarkers on individual cells. A panel of MNPs with different magnetization properties can be utilized to label different cellular markers. By using the particles' classifiable magnetization properties, the quantity of each MNP type representing the expression level of a distinct target biomarker in a single cell can be obtained.¹²⁵

Silicon-based CTC chips

Nagrath et al described a microfluidic device called a CTC chip, which is able to isolate CTCs efficiently and reproducibly from the blood of patients with common epithelial tumors.¹³² This microfluidic system is composed of a CTC chip etched in silicon, a manifold to enclose the chip, and a pump producing the flow through the capture module (Figure 5A). The CTC chip contains an array of microposts that are chemically functionalized with EpCAM antibodies. There are two essential parameters that influence cell-capture efficiency: flow speed and shear force. Flow speed is important, due to its influence on the duration of cell–micropost contact, whereas shear force has to be minimized to guarantee a high cell–micropost attachment. The chip is very small (about 25×66 mm) and contains repeated patterns of equilateral triangular arrays to maximize the interactive surface for cell–micropost contact. In total, this array integrates about 78,000 microposts within a surface area of 970 mm².¹³²

Glass/PDMS-based CTC chips

After the development of the CTC chip, Stott et al reported a modified herringbone CTC-capture chip¹³³ (Figure 5B). This technique increases the interaction of flowing cells and anti-EpCAM-functionalized polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels through passive mixing. PDMS, also called dimethicone, is a polymer that can be used for microfluidic chips. To disrupt streamlines and increase capture efficiency, microvortices were created and integrated with the herringbone-chip through chevron patterns on a PDMS ceiling. Due to the antibody–antigen interaction, cells tether to the chip and can be stained afterward. The transparency of these glass chips also allows clear imaging using different types of light microscopy–based techniques.⁹¹

Shi et al engineered nanotopography of various dimensions and geometry on an elastomeric PDMS substrate to capture CTCs. It was suggested that cell adhesion using nanotopography could be a valuable application to isolate CTC antibody- and size-based independence. Cancer cell lines of different types, metastatic status, and surface-marker expression were used to analyze the capture performance, with efficiency up to 52%. As mentioned by Shi et al, the influence of nanotopography was less significant. However, this study contains useful information on nanotopography optimization for further improvement of CTC-capture efficiency.¹³⁴

Thermopolymer-based CTC chips

As an alternative to silicone, polymethylmethacrylate (PMMA) is also used as a substrate for microfluidic CTC capture and analysis, with the advantages of low cost and magnificent optical transparency. PMMA is suitable for fabrication techniques, such as injection molding and hot embossing. On the surface of PMMA, carboxylic acid groups can be generated by ultraviolet exposure to explore the concentration of proteins, electroless deposition, and cancer-cell capture.¹³⁵ The roughness of the surface area can be increased by high-intensity light, due to the enhanced surface area for functionalization. Furthermore, at low temperatures, the thermal bonding passes through to preserve these microfeatures.¹³⁶ Consequently, a high-throughput microsampling unit functionalized with anti-EpCAM antibodies was developed for capture and enumeration of CTCs with an included conductivity sensor.⁹¹

In vivo enrichment and detection with nanomaterials

Due to the limitation of blood-sample volume that can be obtained from patients and also handled by detection systems, ex vivo CTC-isolation techniques show relatively low sensitivity. To overcome these limitations, Saucedo-Zena et al developed a medical device for screening large blood volume in vivo. This device allows the capture of CTCs directly from the circulating bloodstream of patients. During incubation in the vein, the device is exposed to nearly 1 L of blood, leading to an enormous increase in capture efficiency. Based on the Seldinger technique,¹³⁷ this device is composed of a structured and functionalized structured medical wire (FSMW). The usage of FSMW for capturing rare cells is similar to ex vivo CTC-detection technologies, and requires CTC-specific antibodies like epithelial cell markers and/or cytokeratin.^{138,139}

The FSMW is composed of a stainless-steel medical wire of 0.5 mm diameter and 160 mm length. The tip of the wire

is functionalized and covered with a 2 μm -thick gold layer, which is fixed on the device by galvanization and covered by a 1–5 μm linear synthetic polycarboxylate layer. The hydrogel is covalently coupled with antibodies against the EpCAM protein, and can be stored in distilled water at 4°C until use.^{138–141}

Before use of the device, a 20 G peripheral venous catheter has to be placed into the cubital vein of a patient to enable the insertion of the FSMW through the catheter. After incubation for 30 minutes, the FSMW is removed from the vein, and bound cells can be recovered via washing. Captured CTCs are characterized by immunocytochemical staining for cytokeratin or EpCAM. The results include the identification via staining and enumeration of the captured cells.^{138,140}

CTC-targeted nanomedicine

There is still no FDA-approved antimetastatic agent that can directly target tumor metastasis.²¹ Given the pivotal role of CTCs in tumor metastasis, therapeutic targeting and specific depletion or destruction of CTCs from blood vessels may be an intriguing strategy for prevention of tumor metastasis. With the rapid development of nanoscale-material science and the wide application of nanobiotechnology in the biomedical field, researchers have designed and developed a variety of nanosystems for targeted delivery of therapeutic agents to CTCs to destroy them efficiently and thereby inhibit tumor metastasis.

DNA-based nanodevices

Nanosystems fabricated by DNA have been extensively employed for various biomedical applications, due to their

excellent biocompatibility, accurate interactions among base pairs, programmability, and automated synthesis.^{142,143} Wang et al developed a novel structure-switching aptamer for CTC-triggered photosensitizer (PS) release and specific CTC inhibition.¹⁴⁴ This nanosystem is composed of a PDMS–glass supporter and a PS-labeled hairpin switch aptamer (HAS) immobilized on the supporter. The presence of CTCs can induce the formation of a HAS structure, due to the specific interaction between the aptamer and CTCs leading to the detachment of the PS-labeled aptamer from the supporter. The PS-labeled aptamer is activated by light and produces singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) when flowing through blood vessels, resulting in the specific killing of CTCs. Subsequently, the authors established a “sense-and-treat” DNA nanostructure immobilized on a supporter, which consisted of a HAS and a DNA tetrahedron (Figure 6).¹⁴² Doxorubicin (Dox) and a PS were coencapsulated into the DNA-tetrahedron structure, due to the latter’s ability to enhance cellular internalization of anticancer agents and increase drug-loading content. The nanodevice can sense the existence of CTCs and interact with them, leading to the release of Dox and PS by the DNA tetrahedron. PS is activated after irradiation by an integrated household LED and generate toxic $^1\text{O}_2$, resulting in synergetic destruction of CTCs with Dox. This localized drug-delivery nanosystem combines chemotherapy and photodynamic therapy, and enables the specific destruction of CTCs without affecting normal cells. We have reason to believe that more DNA-based nanoscale drug-delivery systems based on the sense-and-treat strategy with higher CTC-destruction capability will be designed and developed in the future.

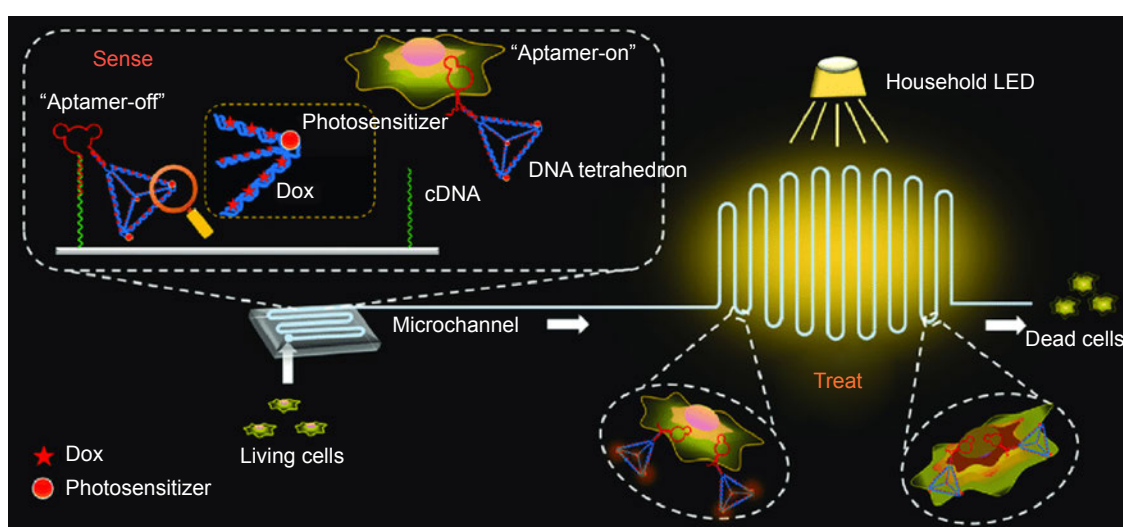


Figure 6 Synergetic detection and destruction of CTCs by a “sense-and-treat” DNA nanosystem.

Notes: Reproduced with permission from Chen N, Qin S, Yang X, Wang Q, Huang J, Wang K. “Sense-and-treat” DNA nanodevice for synergetic destruction of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(40):26552–26558. Copyright © 2016 American Chemical Society.¹⁴²

Abbreviations: CTCs, circulating tumor cells; Dox, doxorubicin.

Dendrimers

Dendrimers are particularly suitable for antitumor-agent delivery, due to their high solubility, uniform size and composition, and ease of functionalization because of a high number of surface functional groups.¹⁴⁵ Xie et al reported a novel polyamidoamine dendrimer-based nanopatform for capturing CTCs in blood vessels and disturbing their adhesion to the vascular endothelial layer to form new micro-metastatic foci.^{146–149} The surface-functionalized nanoscale dendrimers were coated with two antibodies (anti-EpCAM and -sLeX) to target surface biomarkers of human colorectal CTCs. Whereas it has been reported, that targeting of EpCAM can directly disturb the adhesion process of CTCs, the sLeX (sialyl Lewis X) antibody can indirectly interrupt the adhesion between CTCs and endothelial cells via sLeX–E-selectin (ES) interaction.¹⁴⁶ In comparison to their single antibody-coated counterparts, dual-antibody conjugates displayed remarkably enhanced efficiency and specificity in recognizing and capturing CTCs from a large population of leukocytes or red blood cells in vitro, as well as from the blood of patients and mice in vivo. Flow cytometry analysis demonstrated that the inhibitory effect of the dual-antibody conjugates on CTCs was attributed to dose-dependent S-phase arrest. Recently, this group developed dual aptamer rings conjugated on dendrimers and thus were able to simultaneously target EpCAM and Her2 biomarkers on CTCs in the presence of millions of normal cells with excellent stability and accuracy.¹⁵⁰ This study provides new ideas for the design of more powerful and intelligent nanomedicines allowing the prevention of tumor metastasis via suppressing CTCs and blocking their adhesion to blood vessels. Zheng et al presented a type of barcode particle consisted of spherical colloidal crystal clusters that are surrounded with dendrimer-amplified aptamer probes.¹⁵¹ A specific aptamer functionalization allows the particles to interact with specific CTC types, and the dendrimers used are able to amplify the effect of the aptamers. Particles with these capabilities are able to capture, detect, and release multiple types of CTCs from clinical samples.¹⁵¹

Mesoporous silica nanoparticles

During the past few years, mesoporous silica NPs (MSNs) with pore size of 2–50 nm have drawn considerable attention, especially for drug-delivery applications, due to their attractive properties, such as large surface area, mesoporous structure, controllable pore size, ease of surface functionalization, and good biocompatibility.¹⁵² Jia et al constructed an MSN-based nanopatform incorporated with the abortifacient

mifepristone (MIF) and functionalized with EpCAM antibody.¹⁵³ This combination can specifically recognize colorectal cancer cells in vitro through EpCAM targeting, and its high biostability enables effective MIF delivery, leading to lung-metastasis inhibition in mice. Jia et al also developed novel MSN-based nanomissiles that were synthesized by encapsulating Dox into MSN pores and covalently linking EpCAM and CD44 aptamers on the surface.¹⁵⁴ These nanomissiles can selectively and efficiently deliver Dox into CTCs and deactivate them, thereby preventing metastasis formation in vivo through the synergistic effects of Dox, EpCAM-antibody DNA aptamer, and CD44-antibody DNA aptamer by repressing cell proliferation and inhibiting cell migration. These studies expand the application of MSNs as nanoscale delivery systems from tumor-growth retardation to tumor-metastasis suppression.

Liposomes

Over the last five decades of research, liposomes have shown their solid benefits as most common and well-investigated nanocarrier for clinical applications in medical industry. Liposomes are responsible for delivery of several small-molecule drugs.¹⁵⁵ Liposomes are biomimetic NPs that are formed from a self-assembling concentric lipid bilayer and envelop an aqueous core domain.¹⁵⁶ Due to their amphiphilic nature, phospholipids arrange in polar shells in aqueous solutions. This is a thermodynamically favorable organization, further elevated by hydrogen bonding, van der Waals forces, and electrostatic interactions.^{155–158} Due to the aqueous core and lipid bilayer, liposomes are able to encapsulate hydrophilic and lipophilic molecules. There are many advantages of using liposomes in a wide range of medical applications, including their biocompatibility, atoxicity, and biodegradability. Because of the improved drug pharmacodynamics and pharmacokinetics, as well as the controllable release behavior of the loaded drugs, liposomes are used preferably in drug delivery. Rapid clearance of liposomes out of the blood by macrophages from the reticuloendothelial system can be prevented by coating the liposome surface with PEG.^{156,159} Subsequently, it is possible to conjugate the liposome surface with targeting molecules mediating active accumulation of liposomes in cancerous tissue. Liposomes can be loaded with NPs functioning as imaging agents, such as MNPs, QDs, and Au NPs. These NPs can be incorporated into the liposomal structure inside the aqueous core or within the lipid-bilayer membrane. Moreover, liposomes can also be functionalized by NPs conjugated on their theranostic surface. For example, liposomes containing iron oxide

NPs are usually used as theranostic agents for magnetic resonance–imaging applications. Liposomes with entrapped magnetic iron oxide NPs exhibit advantageous characteristics, such as reduced phagocytic elimination (opsonization) and aggregation. In addition, encapsulation of iron oxide NPs in liposomes improves their dispersibility and increases blood-circulation time. Again, these liposomes can be further functionalized with targeting ligands for specific delivery to disease sites.^{21,156}

Mitchell et al synthesized a CTC-targeted Dox-delivery system by modifying liposomal Dox (L-Dox) with ES and PEG.^{160,161} ES can recognize and bind with the sialylated carbohydrate ligands overexpressed on the surface of CTCs. ES-PEG L-Dox can specifically target, capture, and kill CTCs in both static and dynamic environments, without affecting red blood cells or leukocytes. By immobilizing ES-PEG L-Dox onto halloysite NT (HNT)-coated microtubes, obviously improved CTC-capturing and -killing ability was observed. It is noteworthy that HNT-liposome surfaces can enhance chemotherapeutic delivery to CTCs and thus greatly reduce the possibility of tumor metastasis. Moreover, this unique surface can significantly reduce undesired side effects to normal cells and the dosage needed for CTC-targeted chemotherapy. This work opens up new avenues for development of other powerful strategies for effective delivery of chemotherapeutics to CTCs.

Polymeric micelles

Polymer-based NPs represent polymeric colloidal particles in a size range of several nanometers allowing encapsulation, adsorption, or conjugation of therapeutic agents within their polymeric matrix or their surface.^{162,163} Due to their properties of biodegradability and biocompatibility, as well as the possibility of controlling their chemical and physical properties by molecular synthesis, polymeric materials are an important cancer drug–delivery system. Polymers can be linear, globular, or branched, and may differ in size.^{164–166} Linear amphiphilic block copolymers form core–shell particles, the so-called micelles. These micelles are composed of a hydrophobic core to minimize aqueous exposure and a hydrophilic shell to stabilize the core, built up in an aqueous ambience.¹⁶⁷ These properties not only allow loading of hydrophobic small-molecule drugs in the core but also provide steric protection of the shell. Additionally, hydrophilic drugs, including macromolecules like nucleic acids, can be incorporated into polymeric NPs by electrostatic attraction or chemical conjugation. Langer and Folkman demonstrated for the first time the feasibility of controlled release of macromolecules

via polymers, clearing the way for the development of anti-angiogenic drug-delivery systems and pioneering novel areas for the delivery of macromolecules.^{168,169}

During the development of different drug-loaded devices, a number of materials have been used like polyamides, poly(amino acids), polyesters, and polyacrylamides with thermoplastic aliphatic polyesters such as poly(glycolic acid), polylactic acid (PLA), and copolymer poly(lactic *co*-glycolic acid).^{170–173} The latter is one of the most successfully used biodegradable polymers for biomedical applications, because its hydrolysis leads to metabolite monomers, lactic acid, and glycolic acid.^{169,174} PLA- and chitosan-based polymers have also been used for the development of polymeric micelles. Furthermore, PLA shows low toxicity with an additional slightly negative surface charge,¹⁷⁵ and chitosan, a polysaccharide, is widely used as a carrier of hydrophilic drugs. A specific side effects of the antitumor agent Dox can be reduced by Dox encapsulation in chitosan NPs tested for the treatment of solid tumors *in vivo*.^{176,177}

Deng et al demonstrated the use of a Dox-loaded biodegradable polymeric micelles for killing of CTCs and finally suppressing tumor metastasis.¹²¹ In this study, the authors synthesized monomethyl PEG–poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymers for the preparation of Dox-loaded micelles via pH-induced self-assembly. Whereas unloaded micelles exhibited minimal cytotoxicity to 4T1 cells, even at very high concentrations, the functionalization of micelles loaded with Dox induced slightly higher cytotoxicity compared to free Dox. Dox micelles were able to inhibit tumor growth, suppress tumor metastasis by killing CTCs, and extend the survival rate in transgenic zebrafish. The improved activity against tumors and metastasis was also demonstrated in a mouse model. Furthermore, Dox micelles induced apoptosis and reduced the number of proliferation-positive cells in tumors.¹²¹

Yao et al developed a neovasculature and CTC dual-targeting nanoplatfrom (dTNP) by simultaneously conjugating K237 peptide and Ep23 aptamer to the surface of paclitaxel (Ptx)-loaded biodegradable PEG-PLA polymeric micelles.¹⁷⁸ K237 peptide is a 12-mer peptide isolated by phage display binding specifically and tightly to KDR/Flk1 tyrosine kinase (one of the two receptors for VEGF overexpressed on tumor neovasculature) and damages vasculogenic mimicry channels. Ep23 is an RNA aptamer with high affinity to EpCAM that is highly expressed on most carcinomas, and it has been reported that it is more sensitive than an antibody in clinical EpCAM detection. The robust CTC-capture and -neutralization capability of

dTNP was confirmed by cone-plate viscometry in vitro and 4T1-GFP cell-derived lung-metastasis mouse model via in vivo flow cytometry. The in vivo antitumor efficacy of Ptx-loaded dTNP was evaluated in orthotropic tumor-bearing mice, and the results indicated that dTNP-Ptx displayed optimal therapeutic efficacy. This tumor neovasculature and CTC dual-targeting nanoscale drug-delivery system provide a new modality for the treatment of metastatic cancers.

Biomimetic nanoplatforms

In recent years, an emerging new engineering strategy is the fabrication of nature-inspired biomimetic nanosystems that combine synthetic NPs with natural biomaterials.¹⁷⁹ These nanohybrids incorporate biomimetic characteristics (functionality and complexity) of natural materials into synthetic materials with tailorability and flexibility.¹⁸⁰ Different from currently used stealth strategies (usually PEG coating) of synthetic materials to escape immune systems, biomimetic nanoplatforms with immunoevasive properties can interact with biological systems without generating immunoresponses.¹⁸¹ Hu et al demonstrated the development of a platelet membrane (PM)-coated core-shell nanovehicle (PM-NV) for tumor targeting and sequential delivery of TRAIL and Dox.¹⁸² The PM-NV is composed of a nanogel-based inner core for Dox encapsulation and a platelet membrane-based outer shell for TRAIL decoration. TRAIL-Dox-PM-NV dramatically reduced metastatic nodules in MDA-MB-231 xenograft-tumor mouse model. These results suggest efficient CTC elimination via selective capture by P-selectin on PM and subsequent activation of apoptosis by TRAIL and Dox. In a similar example, synthetic silica particles were functionalized with activated platelet membrane along with surface conjugation of TRAIL, which made the best of CTC adhesion to activated platelets and the tumoricidal effect of immune cells to generate an enhanced therapeutic effect.¹⁸³ In a different case, poly(lactic-co-glycolic acid) NPs coated with an inflammatory neutrophil-derived membrane were loaded with carfilzomib and used for treatment of cancer metastasis.¹⁸⁴ These carfilzomib-loaded neutrophil-mimicking NPs hold great therapeutic potential for preventing early metastasis, as well as inhibiting the already-formed metastasis via specific elimination of CTCs in the blood. He et al established an inflammatory monocyte-based intelligent biomimetic drug-delivery system with SMNPs by incorporating legumain-responsive NPs into inflammatory monocytes.¹⁸⁵ Interestingly, the authors

noted that inflammatory monocyte MNPs could be delivered efficiently to metastatic sites in the lung, leading to obvious inhibition of lung metastases.

Conclusion

During the last 6 years, nanotechnological applications received great attention for enrichment, capture, detection, and elimination of CTCs. Applications of engineered NMs in nanomedicine play an important role in early cancer diagnosis and efficient treatment of cancer. The analysis of captured CTCs from patients' peripheral blood samples provides important information about the biology of cancer micrometastasis and shows acceptable application in the clinical management of carcinoma patients. The value of CTC analysis can be demonstrated by liquid biopsies from blood samples of patients with an advanced cancer disease.³

For over a decade, the FDA-approved CellSearch system has been successfully used for CTC enumeration. Preliminary results of CTC enumeration and analysis suggest monitoring the drug efficiency and the antitumor activity of an ongoing therapy. Today, numerous different CTC-capture and -detection assays have been developed for screening a range of distinct tumor types at different disease stages. The isolation and detection of CTCs can be very challenging, due to their extremely rare presence within the blood. Therefore, specificity and sensitivity remain the key issues that upcoming technologies need to address. NMs seem to meet these criteria and solve the challenges of insufficient purity and low capture efficiency of CTCs, due to their unique properties. The possibility of multiplexed targeting can be implemented by NMs, because they can be modified with different targeting ligands to capture, isolate, and detect CTC subpopulations.

In this review, different NM-based enrichment, capture, and detection methods have been discussed with respect to their advantages and disadvantages for CTC detection and therapeutic targeting (Table 2). The incorporation of NMs with microfluidic devices combines the benefits of nanotechnology and microchip technology to optimize CTC-capture methods for further analysis. CTCs represent a promising therapeutic target for nanomedicine. Therefore, it is important to detect and analyze patient blood samples and allow patients to undergo targeted CTC therapy to eliminate CTCs in peripheral blood. Conclusive anticancer-therapy efficacy can be monitored steadily via CTC detection and used in guiding anticancer treatment, implementing the idea of nanomedicine: "Small is smarter".

Table 2 Overview of NP-based CTC detection methods

Nanomaterial	Pros	Cons	References
MNPs/nanoclusters	Biocompatibility, magnetic separation, high sensitivity	Magnetic aggregation; dependence on binding capacity of MNPs (affinity-based)	42, 109–112
Fe-core MNPs	High magnetic moments, superparamagnetic	Rapid oxidation → protective shells needed	57
Magnetic–optical bifunctional NPs	Simultaneous detection and isolation of various tumor-cell types, killing by X-ray-based detection possible	Affinity-based	53
Micro-NMR	Rapid, highly sensitive biomarker detection, only minimal sample purification necessary	Variation in NMR frequency depending on temperature	57
Quantum dots	Quantitative detection with high sensitivity, various fluorescence types enable capture of heterogeneous CTCs	Toxicity affects viability (no further investigations possible), intermittence under continuous excitation	21, 53
Gold NPs	Microsurgical removal/laser-controlled detection and direct ablation of CTCs, postcapture analysis	Nonbiodegradability, complicated preparation	21, 53, 113, 114
Graphene/graphene oxides	High specificity, multiplex functionalization, label-free detection, high conductivity, no toxicity, easy functionalization	Aspecific cellular internalization, hybrid sensors not reproducible yet	21, 53, 92, 115–118
Liposomes	Biocompatibility, long blood-circulation time	Low stability	21, 119, 120
Polymeric nanomaterials	Biocompatibility and biodegradability, ease of chemical modification, drug encapsulation/conjugation, improves sensitivity/selectivity of surfaces for CTC detection	Low stability	53, 97, 121
Hybrid NPs	Recovery of viable cells, can proliferate in vitro	Different hybrid NPs for different types of CTCs necessary, all trials still in vitro	100
SWCNTs/MWCNTs	High stability, bioactivity, capable of cell capture, high sensitivity, even in whole blood	One type of aptamer binds only one specific target	122
Microfabricated filters	Label-free, unbiased	Sensitivity to size	12, 42
Microfluidic-enabled immunoseparation	High efficiency, sensitivity, throughput, automatic, further molecular analysis	Relied on microscopy imaging for CTC identification after isolation	12, 36, 42, 65, 123
Herringbone chip	Transparent device for better imaging		12, 36, 116
CTC chip	High throughput, combination of immunomagnetic sorting with micropost-based enrichment		12, 36, 116, 124
Micro–Hall detector	Rapid detection, high contrast against blood cells, detection of multiple biomarkers	Limited throughput (about 10^7 cells)	124, 125
Gilupi nanodetector	Large volume analyzed	Affinity-based, complex procedure	12, 36

Note: Data from Zhang and King.²¹

Abbreviations: MNPs, magnetic nanoparticles; CTC, circulating tumor cell; SWCNTs, single-walled carbon nanotubes; MWCNTs, multiwalled CNTs; NMR, nuclear magnetic resonance; NP, nanoparticle.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Research Center for Natural and Medical Sciences ([Naturwissenschaftlich-medizinisches Forschungszentrum]; NMFZ), Impulse Fund Rhineland Palatinate, Brigitte and Dr Konstanze Wegener Foundation, German Research Foundation ([Deutsche Forschungsgemeinschaft]; DFG) and NanoTransMed, which is co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) in the framework of the Interreg V Upper Rhine program, the Swiss Confederation, and the Swiss cantons of Aargau, Basel-Landschaft, and Basel-Stadt.

Author contributions

All authors contributed toward data analysis, drafting and critically revising the paper, gave final approval of the version

to be published, and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned – challenge accepted? *Chem Soc Rev*. 2015;44(17):6094–6121. doi:10.1039/c5cs00217f
2. Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A, Nitti D, Rossi CR. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2006;12(15):4605–4613. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0823
3. Pantel K, Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010;16(9):398–406. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.001

4. Kramer OH, Stauber RH, Bug G, Hartkamp J, Knauer SK. SIAH proteins: critical roles in leukemogenesis. *Leukemia*. 2013;27(4):792–802. doi:10.1038/leu.2012.284
5. Garzia L, D'Angelo A, Amoresano A, et al. Phosphorylation of nm23-H1 by CKI induces its complex formation with h-prune and promotes cell motility. *Oncogene*. 2008;27(13):1853–1864. doi:10.1038/sj.onc.1210822
6. Hong Y, Fang F, Zhang Q. Circulating tumor cell clusters: what we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*. 2016;49(6):2206–2216. doi:10.3892/ijo.2016.3747
7. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*. 2017;168(4):670–691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
8. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274–284. doi:10.1038/nrc2622
9. Austin RG, Huang TJ, Wu M, Armstrong AJ, Zhang T. Clinical utility of non-EpCAM based circulating tumor cell assays. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;125:132–142. doi:10.1016/j.addr.2018.01.013
10. Allard WJ, Matera J, Miller MC, 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):6897–6904. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0378
11. Kim S, Han SI, Park MJ, et al. Circulating tumor cell microseparator based on lateral magnetophoresis and immunomagnetic nanobeads. *Anal Chem*. 2013;85(5):2779–2786. doi:10.1021/ac303284u
12. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):329–340. doi:10.1038/nrc2375
13. Hao SJ, Wan Y, Xia YQ, Zou X, Zheng SY. Size-based separation methods of circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018. doi:10.1016/j.addr.2018.01.002
14. Jaeger BA, Jueckstock J, Andergassen U, et al. Evaluation of two different analytical methods for circulating tumor cell detection in peripheral blood of patients with primary breast cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:491459. doi:10.1155/2014/491459
15. Murray NP, Albarran V, Perez G, Villalon R, Ruiz A. Secondary circulating tumor cells (CTCs) but not primary CTCs are associated with the clinico-pathological parameters in Chilean patients with colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(11):4745–4749.
16. Wendel M, Bazhenova L, Boshuizen R, et al. Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early- and late-stage non-small cell lung cancer: a glimpse into lung cancer biology. *Phys Biol*. 2012;9(1):016005. doi:10.1088/1478-3967/9/1/016005
17. Engel H, Kleespies C, Friedrich J, et al. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer*. 1999;81(7):1165–1173. doi:10.1038/sj.bjc.6690825
18. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6302–6309. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0872
19. Ried K, Eng P, Sali A. Screening for circulating tumour cells allows early detection of cancer and monitoring of treatment effectiveness: an observational study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(8):2275–2285. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2275
20. Bhana S, Wang Y, Huang X. Nanotechnology for enrichment and detection of circulating tumor cells. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(12):1973–1990. doi:10.2217/nnm.15.32
21. Zhang Z, King MR. Nanomaterials for the capture and therapeutic targeting of circulating tumor cells. *Cell Mol Bioeng*. 2017;10(4):275–294. doi:10.1007/s12195-017-0497-4
22. Satelli A, Mitra A, Brownlee Z, et al. Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2015;21(4):899–906. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0894
23. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australas Med J*. 1869;14:146–149.
24. Arya SK, Lim B, Rahman AR. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells. *Lab Chip*. 2013;13(11):1995–2027. doi:10.1039/c3lc00009e
25. Rauscher H, Sokull-Kluttgen B, Stamm H. The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology*. 2013;7(7):1195–1197. doi:10.3109/17435390.2012.724724
26. Toss A, Mu Z, Fernandez S, Cristofanilli M. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med*. 2014;2(11):108.
27. Ming Y, Li Y, Xing H, et al. Circulating tumor cells: from theory to nanotechnology-based detection. *Front Pharmacol*. 2017;8:35.
28. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011;17(3):313–319. doi:10.1038/nm.2304
29. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110–1122. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013
30. Wollenberg B. Implication of stem cells in the biology and therapy of head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2011;10:Doc01.
31. Krawczyk N, Meier-Stiegen F, Banys M, Neubauer H, Ruckhaeberle E, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:415721. doi:10.1155/2014/415721
32. Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016;529(7586):298–306. doi:10.1038/nature17038
33. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*. 2013;342(6159):1234850. doi:10.1126/science.1234850
34. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
35. Lippert BM, Knauer SK, Fetz V, Mann W, Stauber RH. Dynamic survival in head and neck cancer: molecular mechanism and therapeutic potential. *Int J Cancer*. 2007;121(6):1169–1174. doi:10.1002/ijc.22941
36. Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*. 2014;14(1):57–62. doi:10.1039/c3lc50644d
37. Shen Z. Cancer biomarkers and targeted therapies. *Cell Biosci*. 2013;3(1):6. doi:10.1186/2045-3701-3-6
38. Knauer SK, Stauber RH. Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein–protein interactions in living cells. *Anal Chem*. 2005;77(15):4815–4820. doi:10.1021/ac050413o
39. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):623–631. doi:10.1038/nrc3820
40. Opoku-Damoah Y, Assanhou AG, Sooro MA, Baduweh CA, Sun C. Functional diagnostic and therapeutic nanoconstructs for efficient probing of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(17):14231–14247. doi:10.1021/acsami.7b17896
41. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Cortesi E, Gazzaniga P. Clinical utility of circulating tumor cell counting through CellSearch(R): the dilemma of a concept suspended in Limbo. *Onco Targets Ther*. 2014;7:619–625. doi:10.2147/OTT.S46200
42. Zhang J, Chen K, Fan ZH. Circulating tumor cell isolation and analysis. *Adv Clin Chem*. 2016;75:1–31. doi:10.1016/bs.acc.2016.03.003
43. Wang H, Lin Y, Nienhaus K, Nienhaus GU. The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2018;10(4):e1500.
44. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol*. 2012;7(12):779–786. doi:10.1038/nnano.2012.207
45. Monopoli MP, Bombelli FB, Dawson KA. Nanobiotechnology: nanoparticle coronas take shape. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(1):11–12. doi:10.1038/nnano.2011.267
46. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):772–781. doi:10.1038/nnano.2013.181

47. Treuel L, Docter D, Maskos M, Stauber RH. Protein corona – from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015;6:857–873. doi:10.3762/bjnano.6.88
48. Vroman L. Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature*. 1962;196:476–477.
49. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2050–2055. doi:10.1073/pnas.0608582104
50. Westmeier D, Stauber RH, Docter D. The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;299:53–57. doi:10.1016/j.taap.2015.11.008
51. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the cell “sees” in bionanoscience. *J Am Chem Soc*. 2010;132(16):5761–5768. doi:10.1021/ja910675v
52. Walkey CD, Olsen JB, Song F, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano*. 2014;8(3):2439–2455. doi:10.1021/nn406018q
53. Myung JH, Tam KA, Park SJ, Cha A, Hong S. Recent advances in nanotechnology-based detection and separation of circulating tumor cells. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016;8(2):223–239. doi:10.1002/wnan.1360
54. Huang Q, Wang Y, Chen X, et al. Nanotechnology-based strategies for early cancer diagnosis using circulating tumor cells as a liquid biopsy. *Nanotheranostics*. 2018;2(1):21–41. doi:10.7150/ntno.22091
55. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(1–2):24–46. doi:10.1016/j.addr.2010.05.006
56. Ding C, Zhang C, Yin X, Cao X, Cai M, Xian Y. Near-infrared fluorescent Ag₂S nanodot-based signal amplification for efficient detection of circulating tumor cells. *Anal Chem*. 2018;90(11):6702–6709. doi:10.1021/acs.analchem.8b00514
57. Castro CM, Ghazani AA, Chung J, et al. Miniaturized nuclear magnetic resonance platform for detection and profiling of circulating tumor cells. *Lab Chip*. 2014;14(1):14–23. doi:10.1039/c3lc50621e
58. Lee H, Sun E, Ham D, Weissleder R. Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells. *Nat Med*. 2008;14(8):869–874. doi:10.1038/nm.1711
59. Riethdorf S, O’Flaherty L, Hille C, Pantel K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;125:102–121. doi:10.1016/j.addr.2018.01.011
60. Pamme N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip*. 2006;6(1):24–38. doi:10.1039/b513005k
61. Rao CG, Chianese D, Doyle GV, 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.
62. Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: adnaGen adnatest breastcancer select/detect versus veridex cellsearch system. *Int J Cancer*. 2012;130(7):1590–1597. doi:10.1002/ijc.26111
63. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012;12:178. doi:10.1186/1471-2407-12-178
64. Jia Z, Liang Y, Xu X, et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid by magnetic-activated cell sorting (MACS). *Cell Biol Int*. 2018;42(3):262–271. doi:10.1002/cbin.10903
65. Yang L, Lang JC, Balasubramanian P, et al. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(2):521–534. doi:10.1002/bit.22066
66. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl*. 2008;1:17–32.
67. Wu X, Xia Y, Huang Y, et al. Improved SERS-active nanoparticles with various shapes for CTC detection without enrichment process with supersensitivity and high specificity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(31):19928–19938. doi:10.1021/acsami.6b07205
68. Hu M, Chen J, Li ZY, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2006;35(11):1084–1094. doi:10.1039/b517615h
69. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2007;2(5):681–693. doi:10.2217/17435889.2.5.681
70. Galanzha EI, Viegas MG, Malinsky TI, et al. In vivo acoustic and photoacoustic focusing of circulating cells. *Sci Rep*. 2016;6:21531. doi:10.1038/srep21531
71. He W, Wang H, Hartmann LC, Cheng JX, Low PS. In vivo quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11760–11765. doi:10.1073/pnas.0703875104
72. He B, Yang D, Qin M, et al. Increased cellular uptake of peptide-modified PEGylated gold nanoparticles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;494(1–2):339–345. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.026
73. Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*. 2002;23(7):1553–1561.
74. Li W, Chen X. Gold nanoparticles for photoacoustic imaging. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(2):299–320. doi:10.2217/nnm.14.169
75. Song J, Kim J, Hwang S, et al. “Smart” gold nanoparticles for photoacoustic imaging: an imaging contrast agent responsive to the cancer microenvironment and signal amplification via pH-induced aggregation. *Chem Commun (Camb)*. 2016;52(53):8287–8290. doi:10.1039/c6cc03100e
76. Zhang YJ, Zeng QY, Li LF, et al. Label-free rapid identification of tumor cells and blood cells with silver film SERS substrate. *Opt Express*. 2018;26(25):33044–33056. doi:10.1364/OE.26.033044
77. Galanzha EI, Zharov VP. Circulating tumor cell detection and capture by photoacoustic flow cytometry in vivo and ex vivo. *Cancers (Basel)*. 2013;5(4):1691–1738. doi:10.3390/cancers5041691
78. Park MH, Reategui E, Li W, et al. Enhanced isolation and release of circulating tumor cells using nanoparticle binding and ligand exchange in a microfluidic chip. *J Am Chem Soc*. 2017;139(7):2741–2749. doi:10.1021/jacs.6b12236
79. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*. 2011;192(3):373–382. doi:10.1083/jcb.201010021
80. Rosorius O, Heger P, Stelz G, Hirschmann N, Hauber J, Stauber RH. Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells. *Biotechniques*. 1999;27(2):350–355. doi:10.2144/99272rr02
81. Lee J, Kang HJ, Jang H, et al. Simultaneous imaging of two different cancer biomarkers using aptamer-conjugated quantum dots. *Sensors (Basel)*. 2015;15(4):8595–8604. doi:10.3390/s150408595
82. Zhang H, Fu X, Hu J, Zhu Z. Microfluidic bead-based multienzyme-nanoparticle amplification for detection of circulating tumor cells in the blood using quantum dots labels. *Anal Chim Acta*. 2013;779:64–71. doi:10.1016/j.aca.2013.03.060
83. Aboulaich A, Tilmaci CM, Merlin C, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly)aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots. *Nanotechnology*. 2012;23(33):335101. doi:10.1088/0957-4484/23/33/335101
84. Clapp AR, Medintz IL, Mauro JM, Fisher BR, Bawendi MG, Mattoussi H. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. *J Am Chem Soc*. 2004;126(1):301–310. doi:10.1021/ja037088b
85. Guo S, Chen YQ, Lu NN, Wang XY, Xie M, Sui WP. Ultrasonication-assisted one-step self-assembly preparation of biocompatible fluorescent-magnetic nanobeads for rare cancer cell detection. *Nanotechnology*. 2014;25(50):505603. doi:10.1088/0957-4484/25/50/505603
86. Hossain M, Luo Y, Sun Z, et al. X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2012;38(1):348–354. doi:10.1016/j.bios.2012.06.020

87. Song EQ, Hu J, Wen CY, et al. Fluorescent-magnetic-biotargeting multifunctional nanobioprobes for detecting and isolating multiple types of tumor cells. *ACS Nano*. 2011;5(2):761–770. doi:10.1021/nn1011336
88. Kim JH, Chung HH, Jeong MS, Song MR, Kang KW, Kim JS. One-step detection of circulating tumor cells in ovarian cancer using enhanced fluorescent silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2247–2257. doi:10.2147/IJN.S45059
89. Tan J, Yang N, Hu Z, et al. Aptamer-functionalized fluorescent silica nanoparticles for highly sensitive detection of leukemia cells. *Nanoscale Res Lett*. 2016;11(1):298. doi:10.1186/s11671-016-1512-8
90. Pramani KA, Jones S, Gao Y, et al. Multifunctional hybrid graphene oxide for circulating tumor cell isolation and analysis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;125:21–35. doi:10.1016/j.addr.2018.01.004
91. Yoon HJ, Kozminsky M, Nagrath S. Emerging role of nanomaterials in circulating tumor cell isolation and analysis. *ACS Nano*. 2014;8(3):1995–2017. doi:10.1021/nn5004277
92. Yoon HJ, Kim TH, Zhang Z, et al. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):735–741. doi:10.1038/nnano.2013.194
93. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*. 2010;39(1):228–240. doi:10.1039/b917103g
94. Sun X, Liu Z, Welscher K, et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res*. 2008;1(3):203–212. doi:10.1016/j.jelechem.2017.12.012
95. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat Chem*. 2010;2(12):1015–1024. doi:10.1038/nchem.907
96. Wu Y, Xue P, Kang Y, Hui KM. Highly specific and ultrasensitive graphene-enhanced electrochemical detection of low-abundance tumor cells using silica nanoparticles coated with antibody-conjugated quantum dots. *Anal Chem*. 2013;85(6):3166–3173. doi:10.1021/ac303398b
97. Myung JH, Gajjar KA, Saric J, Eddington DT, Hong S. Dendrimer-mediated multivalent binding for the enhanced capture of tumor cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(49):11769–11772. doi:10.1002/anie.201105508
98. Wei Z, Barlow DE, Sheehan PE. The assembly of single-layer graphene oxide and graphene using molecular templates. *Nano Lett*. 2008;8(10):3141–3145. doi:10.1021/nl801301a
99. Tian L, Qi JX, Qian K, et al. Copper (II) oxide nanozyme based electrochemical cytosensor for high sensitive detection of circulating tumor cells in breast cancer. *J Electroanal Chem*. 2018;812:1–9. doi:10.1016/j.jelechem.2017.12.012
100. Lee HJ, Cho HY, Oh JH, et al. Simultaneous capture and in situ analysis of circulating tumor cells using multiple hybrid nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2013;47:508–514. doi:10.1016/j.bios.2013.03.040
101. Zylstra J, Alam R, Han H, Doyle RP, Maye MM. Tailoring quantum dot interfaces for improved biofunctionality and energy transfer. *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine, and Bioelectronic Devices*. ACS Symposium Series. 1112: American Chemical Society. 2012;1:59–79.
102. Murray AR, Kisin ER, Tkach AV, et al. Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9:10. doi:10.1186/1743-8977-9-10
103. De Jong KP, Geus JW. Carbon nanofibers: catalytic synthesis and applications. *Catal Rev Sci Eng*. 2000;42(4):481–510. doi:10.1081/CR-100101954
104. Allegri M, Perivoliotis DK, Bianchi MG, et al. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: the relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol Rep*. 2016;3:230–243. doi:10.1016/j.toxrep.2016.01.011
105. Shao N, Wickstrom E, Panchapakesan B. Nanotube-antibody biosensor arrays for the detection of circulating breast cancer cells. *Nanotechnology*. 2008;19(46):465101. doi:10.1088/0957-4484/19/46/465101
106. Liu Y, Zhu F, Dan W, Fu Y, Liu S. Construction of carbon nanotube based nanoarchitectures for selective impedimetric detection of cancer cells in whole blood. *Analyst*. 2014;139(20):5086–5092. doi:10.1039/c4an00758a
107. Tan SJ, Yobas L, Lee GY, Ong CN, Lim CT. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed Micro-devices*. 2009;11(4):883–892. doi:10.1007/s10544-009-9305-9
108. Zheng S, Lin H, Liu JQ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J Chromatogr A*. 2007;1162(2):154–161. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.064
109. Balasubramanian P, Lang JC, Jatana KR, et al. Multiparameter analysis, including EMT markers, on negatively enriched blood samples from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One*. 2012;7(7):e42048. doi:10.1371/journal.pone.0042048
110. Grisanti S, Almici C, Consoli F, et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One*. 2014;9(8):e103918. doi:10.1371/journal.pone.0103918
111. Lin HC, Hsu HC, Hsieh CH, et al. A negative selection system PowerMag for effective leukocyte depletion and enhanced detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells. *Clin Chim Acta*. 2013;419:77–84. doi:10.1016/j.cca.2013.01.018
112. Lustberg M, Jatana KR, Zborowski M, Chalmers JJ. Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells. *Recent Results Cancer Res*. 2012;195:97–110. doi:10.1007/978-3-642-28160-0_9
113. Galanzha EI, Shashkov E, Sarimollaoglu M, et al. In vivo magnetic enrichment, photoacoustic diagnosis, and photothermal purging of infected blood using multifunctional gold and magnetic nanoparticles. *PLoS One*. 2012;7(9):e45557. doi:10.1371/journal.pone.0045557
114. Galanzha EI, Zharov VP. Photoacoustic flow cytometry. *Methods*. 2012;57(3):280–296. doi:10.1016/j.ymeth.2012.06.009
115. Cruz SM, Girao AF, Goncalves G, Marques PA. Graphene: the missing piece for cancer diagnosis? *Sensors (Basel)*. 2016;16(1):137. doi:10.3390/s16122100
116. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016;10(3):374–394. doi:10.1016/j.molonc.2016.01.007
117. Li Y, Lu Q, Liu H, et al. Antibody-modified reduced graphene oxide films with extreme sensitivity to circulating tumor cells. *Adv Mater*. 2015;27(43):6848–6854. doi:10.1002/adma.201502615
118. Yin PT, Kim TH, Choi JW, Lee KB. Prospects for graphene-nanoparticle-based hybrid sensors. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(31):12785–12799. doi:10.1039/c3cp51901e
119. Chandrasekaran S, Chan MF, Li J, King MR. Super natural killer cells that target metastases in the tumor draining lymph nodes. *Biomaterials*. 2016;77:66–76. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.001
120. Mitchell MJ, Wayne E, Rana K, Schaffer CB, King MR. TRAIL-coated leukocytes that kill cancer cells in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):930–935. doi:10.1073/pnas.1316312111
121. Deng S, Wu Q, Zhao Y, et al. Biodegradable polymeric micelle-encapsulated doxorubicin suppresses tumor metastasis by killing circulating tumor cells. *Nanoscale*. 2015;7(12):5270–5280. doi:10.1039/c4nr07641a
122. Liu H, Xu S, He Z, Deng A, Zhu JJ. Supersandwich cytosensor for selective and ultrasensitive detection of cancer cells using aptamer-DNA concatamer-quantum dots probes. *Anal Chem*. 2013;85(6):3385–3392. doi:10.1021/ac303789x
123. Casavant BP, Mosher R, Warrick JW, et al. A negative selection methodology using a microfluidic platform for the isolation and enumeration of circulating tumor cells. *Methods*. 2013;64(2):137–143. doi:10.1016/j.ymeth.2013.05.027
124. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):110–118. doi:10.1373/clinchem.2012.194258
125. Issadore D, Chung J, Shao H, et al. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector. *Sci Transl Med*. 2012;4(141):141ra92. doi:10.1126/scitranslmed.3003747

126. Jackson JM, Witek MA, Kamande JW, Soper SA. Materials and microfluidics: enabling the efficient isolation and analysis of circulating tumour cells. *Chem Soc Rev*. 2017;46(14):4245–4280. doi:10.1039/c7cs00016b
127. Qian W, Zhang Y, Chen W. Capturing Cancer: Emerging microfluidic technologies for the capture and characterization of circulating tumor cells. *Small*. 2015;11(32):3850–3872. doi:10.1002/smll.201403658
128. Li P, Stratton ZS, Dao M, Ritz J, Huang TJ. Probing circulating tumor cells in microfluidics. *Lab Chip*. 2013;13(4):602–609. doi:10.1039/c2lc90148j
129. Ortega FG, Fernandez-Baldo MA, Serrano MJ, Messina GA, Lorente JA, Raba J. Epithelial cancer biomarker EpCAM determination in peripheral blood samples using a microfluidic immunosensor based in silver nanoparticles as platform. *Sens Actuators B Chem*. 2015;221:248–256. doi:10.1016/j.snb.2015.06.066
130. Hoshino K, Huang YY, Lane N, et al. Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip*. 2011;11(20):3449–3457. doi:10.1039/c1lc20270g
131. Huang YY, Hoshino K, Chen P, et al. Immunomagnetic nanoscreening of circulating tumor cells with a motion controlled microfluidic system. *Biomed Microdevices*. 2013;15(4):673–681. doi:10.1007/s10544-012-9718-8
132. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235–1239. doi:10.1038/nature06385
133. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18392–18397. doi:10.1073/pnas.1012539107
134. Shi L, Wang K, Yang Y. Adhesion-based tumor cell capture using nanotopography. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;147:291–299. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.08.008
135. McCarley RL, Vaidya B, Wei S, et al. Resist-free patterning of surface architectures in polymer-based microanalytical devices. *J Am Chem Soc*. 2005;127(3):842–843. doi:10.1021/ja0454135
136. Adams AA, Okagbare PI, Feng J, et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc*. 2008;130(27):8633–8641. doi:10.1021/ja8015022
137. Barber CJ. Central venous catheter placement for intravenous digital subtraction angiography: an assessment of technical problems and success rate. *Br J Radiol*. 1989;62(739):599–602. doi:10.1259/0007-1285-62-739-599
138. Gorges TM, Penkalla N, Schalk T, et al. Enumeration and molecular characterization of tumor cells in lung cancer patients using a novel in vivo device for capturing circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9):2197–2206. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1416
139. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*. 2012;41(4):1241–1250. doi:10.3892/ijo.2012.1557
140. Scherag FD, Niestroj-Pahl R, Krusekopf S, Lucke K, Brandstetter T, Ruhe J. Highly selective capture surfaces on medical wires for fishing tumor cells in whole blood. *Anal Chem*. 2017;89(3):1846–1854. doi:10.1021/acs.analchem.6b04219
141. Theil G, Fischer K, Weber E, et al. The use of a new cell collector to isolate circulating tumor cells from the blood of patients with different stages of prostate cancer and clinical outcomes – a proof-of-concept study. *PLoS One*. 2016;11(8):e0158354. doi:10.1371/journal.pone.0158354
142. Chen N, Qin S, Yang X, Wang Q, Huang J, Wang K. “Sense-and-treat” DNA nanodevice for synergetic destruction of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(40):26552–26558. doi:10.1021/acsami.6b08695
143. Li S, Jiang Q, Liu S, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nat Biotechnol*. 2018;36(3):258–264. doi:10.1038/nbt.4071
144. Chen N, Yang X, Wang Q, et al. Proof of concept for inhibiting metastasis: circulating tumor cell-triggered localized release of anticancer agent via a structure-switching aptamer. *Chem Commun (Camb)*. 2016;52(41):6789–6792. doi:10.1039/c6cc02374f
145. Medina SH, El-Sayed ME. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chem Rev*. 2009;109(7):3141–3157. doi:10.1021/cr900174j
146. Xie J, Dong H, Chen H, et al. Exploring cancer metastasis prevention strategy: interrupting adhesion of cancer cells to vascular endothelia of potential metastatic tissues by antibody-coated nanomaterials. *J Nanobiotechnology*. 2015;13:9. doi:10.1186/s12951-015-0072-x
147. Xie J, Gao Y, Zhao R, et al. Ex vivo and in vivo capture and deactivation of circulating tumor cells by dual-antibody-coated nanomaterials. *J Control Release*. 2015;209:159–169. doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.036
148. Xie J, Zhao R, Gu S, et al. The architecture and biological function of dual antibody-coated dendrimers: enhanced control of circulating tumor cells and their hetero-adhesion to endothelial cells for metastasis prevention. *Theranostics*. 2014;4(12):1250–1263. doi:10.7150/thno.8775
149. Brandl A, Wagner T, Uhlig KM, et al. Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(5):284–293. doi:10.1093/jmcb/mjs013
150. Dong H, Han L, Wu Z-S, et al. Biostable Aptamer Rings Conjugated for Targeting Two Biomarkers on Circulating Tumor Cells in Vivo with Great Precision. *Chem Mater*. 2017;29(24):10312–10325.
151. Zheng F, Cheng Y, Wang J, et al. Aptamer-functionalized barcode particles for the capture and detection of multiple types of circulating tumor cells. *Adv Mater*. 2014;26(43):7333–7338. doi:10.1002/adma.201403530
152. Wang Y, Zhao Q, Han N, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine*. 2015;11(2):313–327. doi:10.1016/j.nano.2014.09.014
153. Gao Y, Gu S, Zhang Y, et al. The architecture and function of monoclonal antibody-functionalized mesoporous silica nanoparticles loaded with mifepristone: repurposing abortifacient for cancer metastatic chemoprevention. *Small*. 2016;12(19):2595–2608. doi:10.1002/smll.201600550
154. Gao Y, Xie X, Li F, et al. A novel nanomissile targeting two biomarkers and accurately bombing CTCs with doxorubicin. *Nanoscale*. 2017;9(17):5624–5640. doi:10.1039/c7nr00273d
155. Pattini BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev*. 2015;115(19):10938–10966. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00046
156. Dai Z, Yue X. Liposomal nanotechnology for cancer theranostics. *Curr Med Chem*. 2018;25(12):1397–1408.
157. Fenske DB, Cullis PR. Liposomal nanomedicines. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(1):25–44. doi:10.1517/17425247.5.1.25
158. Yu HP, Aljuffali IA, Fang JY. Injectable drug-loaded nanocarriers for lung cancer treatments. *Curr Pharm Des*. 2017;23(3):481–494. doi:10.2174/1381612822666161027113654
159. Muthu MS, Feng SS. Theranostic liposomes for cancer diagnosis and treatment: current development and pre-clinical success. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(2):151–155. doi:10.1517/17425247.2013.729576
160. Mitchell MJ, Castellanos CA, King MR. Nanostructured surfaces to target and kill circulating tumor cells while repelling leukocytes. *J Nanomater*. 2012;2012:831263. doi:10.1155/2012/831263
161. Mitchell MJ, Chen CS, Ponmudi V, Hughes AD, King MR. E-selectin liposomal and nanotube-targeted delivery of doxorubicin to circulating tumor cells. *J Control Release*. 2012;160(3):609–617. doi:10.1016/j.jconrel.2012.02.018
162. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology*. 2011;9:55. doi:10.1186/1477-3155-9-55
163. Peppas NA. Historical perspective on advanced drug delivery: how engineering design and mathematical modeling helped the field mature. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):5–9. doi:10.1016/j.addr.2012.09.040
164. Croy SR, Kwon GS. Polymeric micelles for drug delivery. *Curr Pharm Des*. 2006;12(36):4669–4684.
165. Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature*. 1997;388(6645):860–862. doi:10.1038/42218

166. Patri AK, Majoros IJ, Baker JR. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*. 2002;6(4):466–471.
167. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*. 2005;109(1–3):169–188. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.034
168. Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*. 1976;263(5580):797–800.
169. Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(2):517–535.
170. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475–2490.
171. Lu JM, Wang X, Marin-Muller C, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9(4):325–341. doi:10.1586/erm.09.15
172. Studer M, Briel M, Leimenstoll B, Glass TR, Bucher HC. Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: a systematic review. *Arch Intern Med*. 2005;165(7):725–730. doi:10.1001/archinte.165.7.725
173. Wickline SA, Neubauer AM, Winter PM, Caruthers SD, Lanza GM. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles. *J Magn Reson Imaging*. 2007;25(4):667–680. doi:10.1002/jmri.20866
174. Trivedi R, Kompella UB. Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(3):485–505. doi:10.2217/nmm.10.10
175. Venkatraman SS, Jie P, Min F, Freddy BY, Leong-Huat G. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *Int J Pharm*. 2005;298(1):219–232. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.023
176. Bisht S, Maitra A. Dextran-doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009;1(4):415–425. doi:10.1002/wnan.43
177. Ye YQ, Yang FL, Hu FQ, Du YZ, Yuan H, Yu HY. Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin. *Int J Pharm*. 2008;352(1–2):294–301. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.035
178. Yao J, Feng J, Gao X, et al. Neovasculature and circulating tumor cells dual-targeting nanoparticles for the treatment of the highly-invasive breast cancer. *Biomaterials*. 2017;113:1–17. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.10.033
179. Luk BT, Zhang L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*. 2015;220(Pt B):600–607. doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.019
180. Meyer RA, Sunshine JC, Green JJ. Biomimetic particles as therapeutics. *Trends Biotechnol*. 2015;33(9):514–524. doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.001
181. Dehaini D, Fang RH, Zhang L. Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery. *Bioeng Transl Med*. 2016;1(1):30–46. doi:10.1002/btm2.10004
182. Hu Q, Sun W, Qian C, Wang C, Bomba HN, Gu Z. Anticancer platelet-mimicking nanovehicles. *Adv Mater*. 2015;27(44):7043–7050. doi:10.1002/adma.201503323
183. Li J, Ai Y, Wang L, et al. Targeted drug delivery to circulating tumor cells via platelet membrane-functionalized particles. *Biomaterials*. 2016;76:52–65. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.046
184. Kang T, Zhu Q, Wei D, et al. Nanoparticles coated with neutrophil membranes can effectively treat cancer metastasis. *ACS Nano*. 2017;11(2):1397–1411. doi:10.1021/acsnano.6b06477
185. He X, Cao H, Wang H, et al. Inflammatory monocytes loading protease-sensitive nanoparticles enable lung metastasis targeting and intelligent drug release for anti-metastasis therapy. *Nano Lett*. 2017;17(9):5546–5554. doi:10.1021/acs.nanolett.7b02330

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

7.3 Anhang IV: Publikation Review 2



Review

Nano Meets Micro-Translational Nanotechnology in Medicine: Nano-Based Applications for Early Tumor Detection and Therapy

Svenja Siemer ¹, Désirée Wunsch ¹, Aya Khamis ¹, Qiang Lu ¹, Arnaud Scherberich ² ,
Miriam Filippi ², Marie Pierre Krafft ³, Jan Hagemann ¹ , Carsten Weiss ⁴, Guo-Bin Ding ⁵ ,
Roland H. Stauber ^{5,1,*} and Alena Gribko ^{1,*}

¹ Nanobiomedicine Department, University Medical Center Mainz/ENT, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz, Germany; svenja.siemer@uni-mainz.de (S.S.); wuensc@uni-mainz.de (D.W.);

ayakhamis@uni-mainz.de (A.K.); qianglu@uni-mainz.de (Q.L.); jan.hagemann@unimedizin-mainz.de (J.H.)

² Laboratory of Tissue Engineering, Universitätsspital Basel, Hebelstrasse 20, CH-4031 Basel, Switzerland; arnaud.scherberich@unibas.ch (A.S.); miriam.filippi@usb.ch (M.F.)

³ Institut Charles Sadron (CNRS), University of Strasbourg, 23 rue du Loess, 67034 Strasbourg Cedex, France; marie-pierre.krafft@ics-cnrs.unistra.fr

⁴ Institute of Biological and Chemical Systems-Biological Information Processing (IBCS-BIP), Postfach 3640, 76021 Karlsruhe, Germany; carsten.weiss@kit.edu

⁵ Institute for Biotechnology, Shanxi University, No. 92 Wucheng Road, 030006 Taiyuan, China; dinggb2012@sxu.edu.cn

* Correspondence: roland.stauber@unimedizin-mainz.de (R.H.S.); algribko@uni-mainz.de (A.G.); Tel.: +49-6131-176030 (A.G.)

Received: 10 January 2020; Accepted: 15 February 2020; Published: 22 February 2020



Abstract: Nanomaterials have great potential for the prevention and treatment of cancer. Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells of solid tumor origin entering the peripheral blood after detachment from a primary tumor. The occurrence and circulation of CTCs are accepted as a prerequisite for the formation of metastases, which is the major cause of cancer-associated deaths. Due to their clinical significance CTCs are intensively discussed to be used as liquid biopsy for early diagnosis and prognosis of cancer. However, there are substantial challenges for the clinical use of CTCs based on their extreme rarity and heterogeneous biology. Therefore, methods for effective isolation and detection of CTCs are urgently needed. With the rapid development of nanotechnology and its wide applications in the biomedical field, researchers have designed various nano-sized systems with the capability of CTCs detection, isolation, and CTCs-targeted cancer therapy. In the present review, we summarize the underlying mechanisms of CTC-associated tumor metastasis, and give detailed information about the unique properties of CTCs that can be harnessed for their effective analytical detection and enrichment. Furthermore, we want to give an overview of representative nano-systems for CTC isolation, and highlight recent achievements in microfluidics and lab-on-a-chip technologies. We also emphasize the recent advances in nano-based CTCs-targeted cancer therapy. We conclude by critically discussing recent CTC-based nano-systems with high therapeutic and diagnostic potential as well as their biocompatibility as a practical example of applied nanotechnology.

Keywords: biocompatibility; circulating tumor cells; metastasis; microbubbles; nanomedicine; nanotechnology

1. Introduction

The application of engineered nanomaterials (NMs) in technical products is steadily growing in biotechnology and biomedicine [1]. Nanomedicine, i.e., the medical application of nanotechnology, is

expected to play a vital role in early tumor detection and cancer treatment. The primary cause of cancer morbidity and mortality is cancer metastasis. It is estimated that about 90% of cancer deaths are caused by metastasis [2–5]. This process is determined as the dissemination of cancer cells from primary tumors to surrounding tissues and to distant organs, which is also known as the invasion-metastasis cascade. One necessary step in distant metastasis is the transport of tumor cells through the blood system, but detailed molecular mechanisms underlying tumor metastasis still remain unclear [6,7]. Detached cancer cells of solid tumor origin from primary tumor which intravasate into the peripheral blood system and circulate in the body are called circulating tumor cells (CTCs). Only a small number of CTCs are able to evade immune attack and extravagate during the circulation at distant capillary beds and seed the growth of a secondary tumor [8]. Consequently, CTCs play an important role as part of a ‘liquid biopsy’ which can offer important information on prediction of cancer progression and survival after specific treatment without surgery [9,10]. The analysis of CTCs includes characterization, determination and enumeration of CTCs. Comparison studies of enumerating CTCs before and after resection open up the possibility for monitoring therapeutic response. Moreover, the enumeration of CTCs also represents an attractive biomarker for predicting the possibility of tumor recurrence [3]. Furthermore, the number of detected CTCs usually correlates with the progression of cancer disease resulting in further information about tumor burden and recurrence [11–13]. Additionally, cultivation of isolated patients-derived CTCs can be used for drug resistance analyses and also for the development of personalized anti-cancer agents (Figure 1) [11,14].

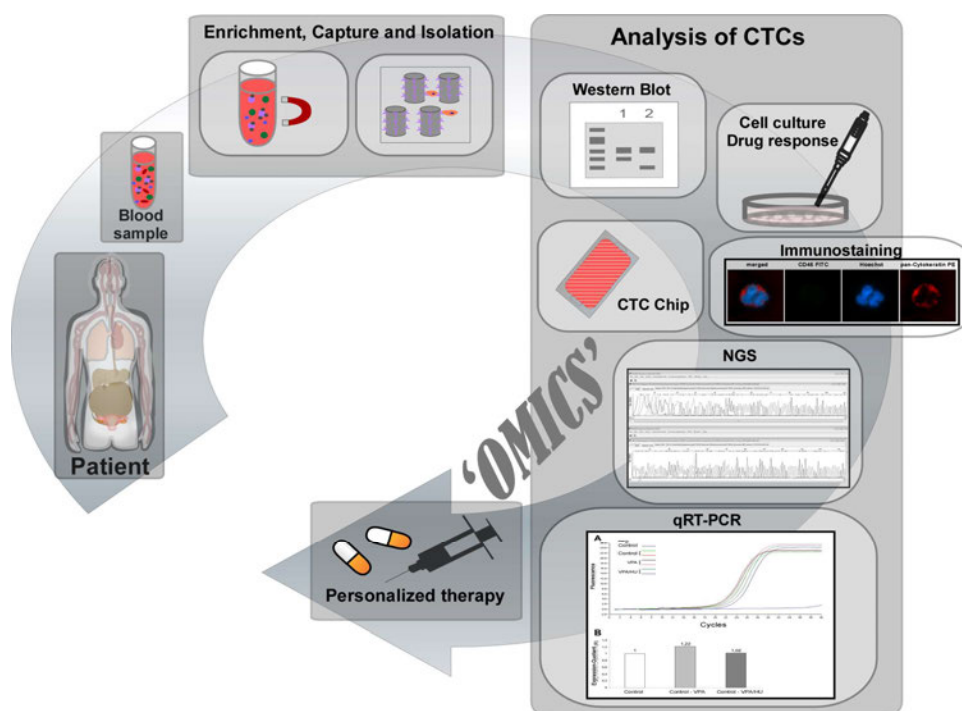


Figure 1. Overview of CTCs analysis of patients-derived CTCs including drug resistance detection and personalized therapy: Patients’ blood sample is screened and potential CTCs are captured and isolated by different isolation methods. Potential CTCs can be determined and used for further analysis to develop personalized medicine.

During the early stages of tumorigenesis the determination of the existence of CTCs in blood samples of patients is a significant biomarker for early cancer detection [15]. Moreover, CTCs have been detected in many cancer types including breast [16], colon [17], lung [18], melanoma [2], ovarian [19] and prostate cancers [20]. Nevertheless, because of CTCs rarity and their property to move as individual cells or as multi-cellular clumps, their capture and detection are extremely challenging. For example,

in 1 mL blood sample of an early stage cancer patient can be detected approximately five billion red blood cells, ten million white blood cells and as few as one CTC [21,22]. Because of biological and molecular changes of CTCs during the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), the circulating cell population is heterogenic and requires the ability to handle a very small number of cells for efficient isolation methods [23].

Over the last few decades, nanoscale materials have been used in a wide range of areas such as electronics, energy conversion, catalysis, storage and medicine. The variety of these advanced nanoscale materials includes metal, metal oxide, semiconductor, polymeric NMs and microbubbles (MBs) [21,24]. Excellent contributions to clinical medicine were made by NMs since they possess some attractive properties related to their size, shape and surface characteristics [25]. Due to the nanoscale effect, NMs have surpassing structural and functional properties that are typically different from either bulk materials or discrete molecules. Although CTCs were already discovered in 1869 by the Australian researcher Thomas Ashworth, only during the last two decades a large number of important advancements have been made in the field of CTC isolation and detection techniques [26]. In recent years, nanomedicine (i.e., here the use of NMs for CTC detection and isolation) has been playing an increasingly important role in CTC detection and more than 100 companies are providing CTC related products and services [27]. The specificity of CTC recognition could be significantly improved by conjugation of NMs with targeting ligands. It has been shown that functionalized substrates and captured CTCs exhibit improved ligand-antigen binding. Nanostructured substrates demonstrate enhanced local topographic interactions that lead to enhanced cell capture affinity. NMs can also be used as drug delivery systems for CTC-targeted drug delivery and cancer treatment [28]. Moreover, NMs have a large surface-to-volume ratio that endows them with a high cellular binding affinity in the complex blood matrix. Additionally, ligand coating of nanostructures can be prepared with much higher density improving binding affinity in comparison to micro- and macrostructures. A manipulation of NMs gives them the ability of multiplexed detection and targeting, which are crucial to approach the heterogeneous problem of CTCs [21]. Furthermore, the use of microfluidic chips as cost-effective, miniaturized and efficiency improved applications for the enrichment and detection of CTCs obtain better performance with nanostructured substrates. When targeted MBs are used, CTCs can readily be separated by simple flotation or gentle centrifugation, preserving cell viability for culture and also providing theranostic capacities.

In this review, we will provide an overview of current CTC enrichment strategies and clarify the relationship between CTCs and tumor metastasis. We will discuss the interactions of nanoparticles (NPs) and MBs with biomolecules such as proteins in biological media, and what consequences this may have on detection and isolation strategies. Some CTC detection and analysis methods will briefly be discussed as a guide for the development of potential clinical diagnostic platforms. Literature on in vitro NPs-based CTCs enrichment systems which have drawn extensive attention due to their clinical potential will also be elaborated in this review. Besides our focus on the “nano”, we will also elucidate the “micro” including complementary microfluidic and lab-on-a-chip technologies for simultaneous CTCs enrichment and analysis. Last but not least, we will summarize the research progress of the development of robust nanosystems and MBs for CTC-targeted cancer therapy.

2. The Metastatic Process

As previously mentioned, metastasis is a multi-step process including the spread of cancer cells from primary tumor to distant organs by intravasation into the circulating system. These cells are often called circulating tumor stem cells due to their stem-like properties [29]. CTCs are involved in the process of EMT during early steps of the metastatic cascade [30]. This process is involved in breaking up the cell-to-cell contact by downregulation of various cell adhesion molecules (for example E-cadherin), or epithelial antigens (like epithelial cell adhesion molecule, EpCAM). Due to specific signaling molecules (*Wnt/β-catenin*, *FGF* or *TGFβ1/BMP*) EMT induces cell migration and development of mesenchymal-like cells [31]. During EMT CTCs detach from primary tumor, loose their epithelial

character by downregulation of EpCAM, infiltrate the blood circulation system and migrate into distant site of future metastasis [7,32]. At distant sites, CTCs interact with the local microenvironment which leads to its adaption via developmental and self-renewal signaling pathways, like Hh, Wnt and Notch. These signaling pathways are responsible for the proliferation and finally for the forming of metastases [33]. Subsequently, CTCs have to recover their epithelial characteristic to resettle in the target organ. This process is called mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and is a reverse process of EMT [34]. The process of MET at distant sites is not fully understood and it is also not known how many factors are responsible for MET activation. Banyard et al. demonstrated evidence for spontaneous MET process in an in vivo model [35]. This researcher group selected and expanded metastatic cancer cells that survived in the lymph node microenvironment of mice bearing human prostate tumors. The progression of lymphatic cancer cells demonstrated the existence of epithelial like cells as a result of MET. There are also evidences for MET activation after switching off EMT transcription factors, such as Twist 1, and silencing the EMT inducer Prrx1 to prevent further EMT and allow CTCs to migrate into distant sites of future metastasis [35–38].

The process of EMT is important for the initiation of a stem cell phenotype which displays some characteristics. During the metastasizing process developed characteristics such as high invasiveness, self-renewal ability and resistance to apoptosis and therapy, are used as biomarkers for detection and isolation of CTCs [39,40]. Specific biomarkers are essential for most biological detection methods. Cancer biomarkers are the measurable molecular changes between normal and cancerous tissues of patients. Each cancer type has specific pathological evolution and molecular characteristics. Consequently, for further applications in CTC capture and isolation the identification of these biomarkers is crucial [41,42]. For example, CTCs are commonly described to express epithelial markers like EpCAM and cytokeratins (CKs), and to be nucleated (identified by staining with a nuclear dye such as DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole). Moreover, CTCs do not express cell surface marker CD45 which is specific for white blood cells [43–46]. In summary, it can be declared that positive results in CTC specific detection can be obtained by using a variety of epithelial-, mesenchymal-, and stem cell markers. Additionally, in order to determine and eliminate debatable cells 'negative markers' could be used for CTC detection. These markers include for example platelet marker CD61, CD45 and apoptosis marker M30 [43–46]. Some of these key biomarkers are illustrated in Figure 2.

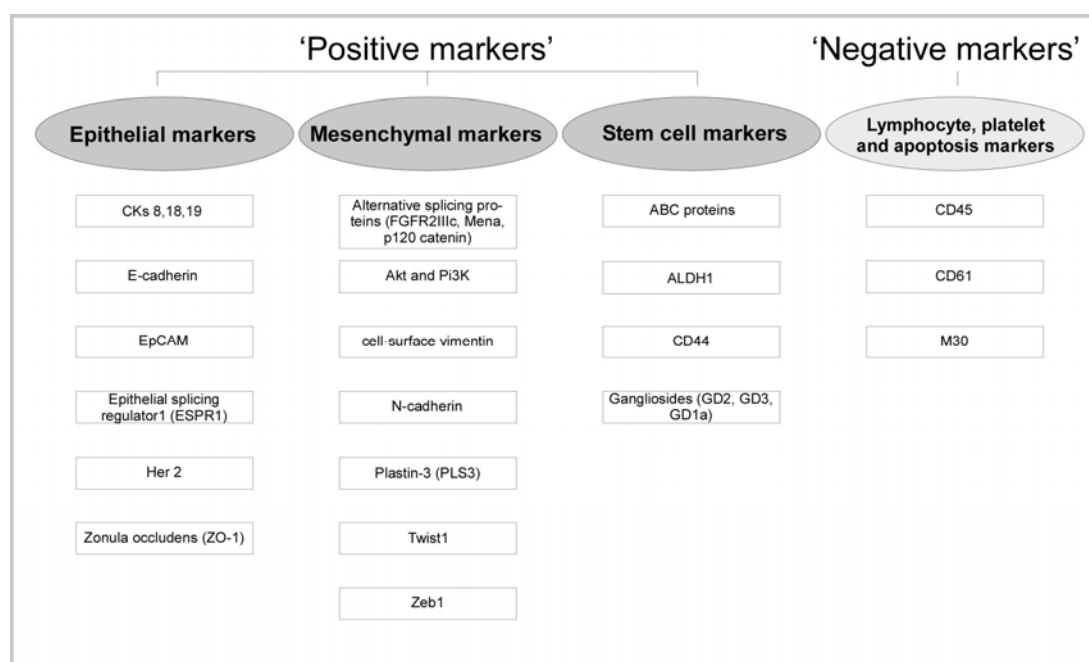


Figure 2. Illustration of CTCs detection specific key biomarkers.

3. Use of Nanomaterials in Tumor Detection and Isolation

A high level of sensitivity as well as specificity due to the extreme rarity and heterogeneous phenotype of CTCs in the blood system are necessary for an effective capture and accurate identification of CTCs [28]. Current CTC enrichment methods are based on either biological features (cell surface protein expression, invasive capacity, and viability) or physical properties (size, density, deformability and electrical charge) [47]. Commonly used isolation methods based on physical properties include membrane filtration, flotation, density gradient centrifugation and microchip-based capture platforms. These methods are fast, simple and label-free, but unfortunately less specific. Accordingly, ‘physical-methods’ are usually combined with the antibody-labeled biological method. Examples for biological characteristics-dependent isolation methods include immunomagnetic separation, buoyancy-based separation, substrate- and microchip-based capture platforms [21].

As mentioned, a high level of specificity and sensitivity is important for capture and identification of CTCs. NMs could largely improve the sensitivity and efficiency of CTCs enrichment, isolation and detection. Correspondingly, the unique properties of NMs can be used to accelerate detection and overcome some limitations in CTC detection [28]. It is necessary to understand the interaction of NPs with cells, tissues and organisms in detail to reach safe application of NMs as diagnostic devices in cancer therapy [48].

To understand changes of NMs in complex physiological or natural environments an extensive understanding about the behavioral and physico-chemical properties of NMs is urgently needed [1]. Due to a high surface-to-volume ratio, NPs interact with (bio)-molecules upon contact with biological and abiotic environment and form the so-called (bio)-molecular corona. In complex biological environments including simple and higher organisms this (bio)-molecular corona is formed spontaneously like an adsorption layer on the NP. Additionally, this adsorption layer plays an important role in the interaction of NPs with organisms and control of their physiological responses. The biomolecular adsorption is mediated by different properties of NPs, including composition, shape, size, surface charge and surface functionalization [49–52]. The protein absorption to NP surfaces is known as the ‘Vroman effect’ and thus was postulated in the pioneering work by Vroman [53]. This effect is described as dynamic change of protein corona composition by adsorption and desorption. This means that in a blood sample containing thousands of different proteins, abundant proteins will be desorbed from NP surface and replaced by rare ones with a higher affinity which leads to a constant level of adsorbed proteins [52,54,55].

In 2007, for the first time the term ‘protein corona’ was introduced to the NP community by Cedervall [54]. The term ‘hard protein corona’ was described as a strong bound layer of biomolecules, representing an analytically approachable protein/biomolecule signature of NP in a determined environment [1,49,55]. Some models additionally describe a ‘soft protein corona’ around the ‘hard protein corona’ which is described as a rapidly exchanging and highly complex biomolecule layer without direct contact to the NPs [1,49,54,56,57]. However, the presence of this ‘soft protein corona’ (also called ‘soft corona cloud’) and its importance at the nano-bio interface are not yet fully affirmed. Moreover, in the context of biology and medicine unspecific ligand-receptor interactions have been discussed and no differences between ‘soft’ and ‘hard’ ligand-receptor interactions were made. Therefore, it is recommended to term the analytically approachable NP-protein complex as ‘protein corona’, because the terming ‘soft’ versus ‘hard’ corona does not take into account all types of coronas and does not assist in resolving pressing scientific questions [1].

3.1. Magnetic Nanoparticle-Based System

Magnetic separation using magnetic NPs (MNPs) is principally used for the isolation of CTCs. Assembled in an organic or inorganic matrix, dispersed antibody-labelled MNPs or MNPs clusters are bound to CTCs. Due to this composition, cells can be separated via an external magnetic field [21,22]. During the presence of an external magnetic field a magnetic moment is exhibited by the most commonly used MNPs such as cobalt, chromium, iron and also their oxides [58]. The magnetic

response of iron oxide MNPs can be ferromagnetic or superparamagnetic depending on the particle shape and size. Moreover, this type MNPs presents chemically stable and biocompatible features [59]. In comparison to iron oxide MNPs, ferromagnetic NPs have a remnant magnetization after removal of the external magnetic field. Moreover, ferromagnetic NPs demonstrate poor stability leading to aggregation in aqueous media so that these particles are not used for cell isolation. Consequently, superparamagnetic NPs (SMNPs) or clusters composed of SMNPs are suitable for cell isolation because of thermal fluctuations [21,22,60]. Additionally, the surface of SMNPs is often modified by coating or grafting with surfactants, polymers, (polyethylene glycol-PEG), polypeptides or hydrophilic inorganic materials (silica and gold) [22].

The most commonly used magnetic system for CTCs isolation is the 'Food and Drug Administration' (FDA)-approved Cell Search system (Menarini Silicon Biosystems Inc, Huntington Valley, PA, USA) which is considered to be the gold standard. This system enriches CTCs using iron NPs (ferrofluid particles) linked with anti-EpCAM antibodies [61] (Figure 3A). The CellSearch system is primarily designed for the enumeration of CTCs with an epithelial origin expressing EpCAM and keratin. Due to the proportional correlation of the magnetic force and the number of bound NPs [62], cells can be selectively enriched by making use of the fact that NPs bound cells are isolated faster than free NPs in a solution under the same external permanent magnet field. This process is separated into two steps and also two different instruments: Autoprep is responsible for CTC capture and immunostaining, and CellTracks Analyzer evaluates the immunofluorescent-stained cells by a semi-automated fluorescence microscope. Further immunofluorescence staining with anti-keratin and anti-CD45 can increase the specificity of selected cells [58,63]. Although CellSearch represents a clinically validated method for CTC isolation, this system has to overcome large limitations including the dependence on cells expressing EpCAM and the fact that only a very small proportion of CTCs in the blood sample of a patient can be detected in a limited interval of time. The process of EMT and the accompanied downregulation of epithelial markers like EpCAM have already been discussed above [58].

Schüling et al. demonstrated aptamers as a suitable alternative to antibodies for whole cell detection with many advantages. High binding specificity is one of the key advantages of aptamer used applications. Despite comparable affinities to antibodies, aptamers present a limited affinity to negatively charged targets. Unfortunately, developed aptamer-based lateral flow assays are not commercially available at the moment because of missing integration in new nano-sized technologies [64].

The magnetic activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) represents a variation of the magnetic isolation method. MACS uses superparamagnetic Fe NPs combined with a magnetized steel wool column as a special feature in comparison to another magnetic-based isolation system. Cells can be eluted from the column by removing the column from the external magnetic field (Figure 3B). By using a combination of magnetic beads coupled with various antibodies and also the possibility of labeling cells with fluorescent antibodies, this technique describes a large advantage due to a direct enrichment and evaluation of captured cells without further detaching or staining procedures [65].

Another method using more than one antibody for the magnetic enrichment of CTCs is the AdnaTest (AdnaGen AG, Langenhagen, Germany). AdnaTest allows the immunomagnetic enrichment of CTCs via epithelial and tumor-specific antigens (Figure 3C) by making use of different magnetic microbeads, such as the superparamagnetic DynaBeads. This mixture of magnetic beads is simultaneously conjugated to antibodies against EpCAM and tumor-associated antigens for labeling of CTCs in peripheral blood. Next, labeled cells are lysed, mRNA is extracted from captured cells and transcribed into cDNA. The analysis of the CTC gene expression can be made by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) [66,67]. In comparison to CellSearch, AdnaTest exhibits improved enrichment efficiency due to the usage of two antibodies and the size of magnetic particles.

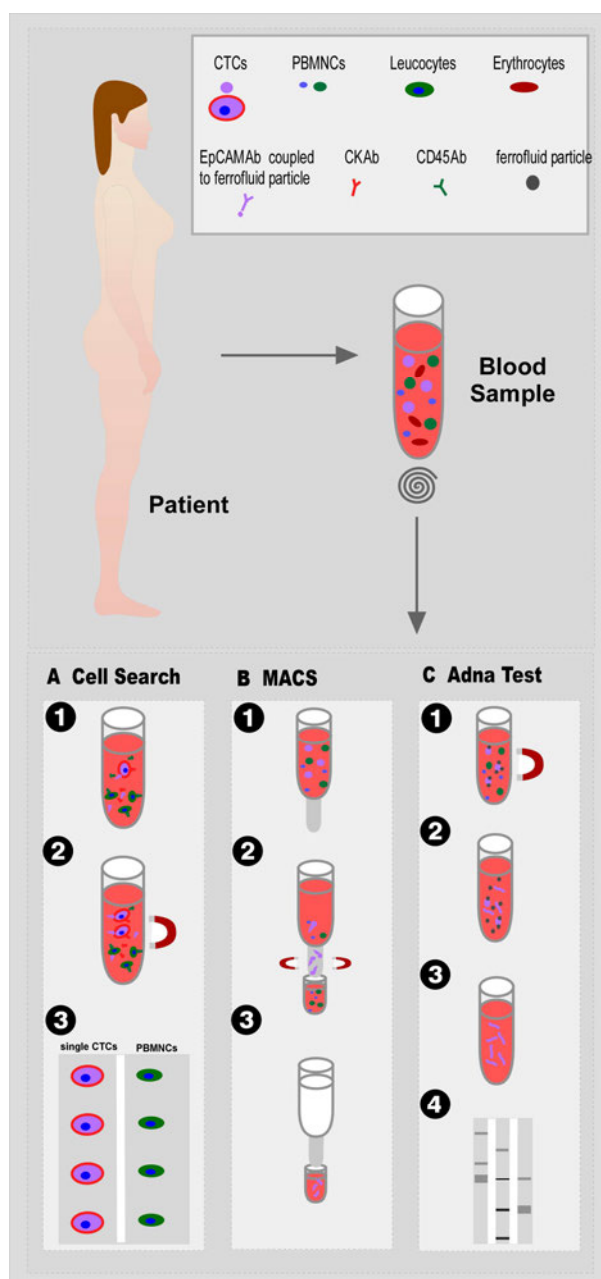


Figure 3. Illustration of CTC isolation methods by magnetic separation using MNPs: (A) The *CellSearch* system includes the enrichment of CTCs with ferrofluid particles linked with anti-EpCAM antibodies, magnetic separation of labeled cells and evaluation by immunofluorescent staining. (B) The principle of magnetic activated cell sorting (MACS) by using superparamagnetic Fe NPs within a magnetized steel wool column. (C) The process of AdnaTest describes the immunomagnetic enrichment of CTCs via epithelial and tumor-specific antigens. Potential CTCs are separated from peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) and lysed in order to analyze the CTC gene expression via multiplex PCR.

These three methods represent positive selection strategies for the specific isolation of CTCs out of a bulk of other cells. One large limitation of positive CTC selection is the described necessity of the expression of targeted markers on the surface of cells. A possible solution to overcome this hurdle is the use of negative depletion strategies with magnetic beads. For negative depletion a two-step procedure was suggested including lysis of red blood cells and removing white blood cells by labeling with CD45-specific MNPs. In summary, it remains a great challenge to efficiently capture CTCs, reduce

the great number of normal blood cells in a sample, and protect rare CTCs from damage during lysis and different washing steps [22].

For implementation of standardized CTC detection methods in daily clinical routine it is indispensable to compare different methods and determine the efficiency of the technology. Andreopoulou et al. compared CellSearch system and AdnaTest to evaluate CTC detection in peripheral blood samples of 55 metastatic breast cancer patients (2012). In this study the *CellSearch* system demonstrated 26 of 55 patients as CTC positive in comparison to 29 of 55 patients detected as CTC positive by using AdnaTest. Consequently, the detection efficiency of CTCs in metastatic breast cancer patients of both compared techniques is comparable. However, more studies are urgently needed to compare the CTC detection efficiency of described positive selection methods by using the same biological samples.

3.2. Fluorescence-Based Detection by Using Quantum Dots

Fluorescence detection methods take also an important part in leading techniques for CTC detection. For this reason, the use of organic dyes as imaging agents belongs to the standard, although their use is limited by low signal intensity, spectral overlapping, the necessity of multiple light sources to excite different fluorophores in mixed detection and photobleaching [21,68]. Examples for cytometric methods are immunohistochemical staining, flow cytometry and spectroscopic detection. The advantage of cytometric methods is the possibility to further analyze detected cells, if cell lysis is not necessary for former procedures, and to examine the cell morphology, if cells are reported microscopically. Nucleic acid-based methods assess tumor-specific genetic alterations by analyzing whole cells or extracted RNA or DNA by PCR, RT-PCR, and whole-genome amplification. Due to interference caused by the expression of normal cell markers, nucleic acid based methods usually have a low specificity, but a high sensitivity [21,69].

Quantum dots (QDs) are an example of fluorescent NPs with size-dependent fluorescent emission that can be applied in the field of CTC detection. In comparison to fluorescent proteins and traditional dyes, QDs display a high quantum yield, tunable emission wavelengths and long fluorescence duration which can enhance the sensitivity of surface-marker dependent CTC capture [59]. It is also possible to capture heterogeneous CTCs by using simultaneous multicolor labeling of size-dependent QDs [59,70]. Due to their strong and stable fluorescence, QDs-based ex vivo CTC detection is highly relevant for clinical applications. However, the use of QDs for in vivo CTC detection provoked heavy metal toxicity [71].

3.3. Gold Nanoparticles

Gold nanoparticles (Au NPs) are another type of NP extensively used for improving the efficiency of CTCs enrichment and capture due to enhanced light absorption and scattering properties. In previous studies a variety of Au NPs have been synthesized exhibiting different shapes such like nanospheres, -rods or -shells. Subsequently, it is possible to functionalize the surface of these NPs with therapeutic agents, targeting moieties and imaging labels. The interaction of Au NPs and CTCs can be monitored by analyzing the protein adsorption processes at the Au NPs surfaces. By using surface plasmon resonance (SPR), the molecular adsorption is demonstrated by a measurable shift. Furthermore, it is possible to measure the binding between Au NPs and CTCs by using photoacoustic signals [22,58,72–74].

Based on unique characteristics, such as high sensitivity, flexibility and throughput, Au NPs are broadly applicable in the field of imaging and diagnostics. One example for an in vivo application is CTCs targeting by injection of Au NPs into the blood stream. This allows real-time, in situ monitoring of CTCs without blood sampling, sample preparation and the following CTCs isolation steps. Furthermore, this application enables the phagocytic clearance of CTCs upon binding [22,58]. Besides these advantages, the method also exhibits some disadvantages due to the particular conditions in the blood system, like high shear stress or immune response. Similar to other CTC targeting methods,

injecting Au NPs into the blood may produce false positive results [75]. PEGylation of Au NPs is a commonly used strategy to overcome some of these issues resulting in an extended circulation time and decrease of non-specific binding [76,77].

Modified Au NPs with CTC-specific ligands can be used for direct binding and separation of CTCs from patient blood as an ex vivo approach [71]. This CTC detection method demonstrates two advantages: first, it protects patients from the potential toxicity of labeled NM for CTC-capturing and secondary, it enables cultivation and analysis of the isolated cells. Furthermore, it is possible to bind and enumerate CTCs label-free by immobilization of Au NPs on a nanostructured surface. For example, a thiolated ligand-exchange reaction with Au NPs on a herringbone chip (NP-^{HB}CTC-Chip) was used to isolate and release cancer cells from whole blood by Park et al. Antibody-coated NPs were chemically and directly assembled onto the ^{HB}CTC-Chip. This application has several advantages in comparison to antibodies coupled on flat silicon oxide surfaces: (1) increasing the available surface area to improve specific interaction of cancer cells with antibodies; (2) release of cancer cells from the surface by disrupting the metal-thiol interaction; (3) usage of released cancer cells for ex vivo cell culture and further molecular analysis; and (4) the optimization of this method for application in complex surface topographies without additional changes in the process by using chemically self-assembled monolayers [22,78].

3.4. Graphene and Carbon Nanotubes

Graphene is arranged in a two-dimensional layer of sp² hybridized carbon atoms ordered in a honeycomb network. Additionally, it is the basic structural block of other allotropes such as graphite and carbon nanotubes (CNTs). Unique chemical and physical properties of graphene and graphene oxide (GO) include strong mechanical strength, high surface area, high intrinsic mobility and great thermal conductivity with optical transmittance and electrical conductivity [58,79,80]. The chemical response results in a charge transfer between graphene and adsorbed molecules. GO can be functionalized through PEG-based chemistry and GO size is controllable by sonication time and filtration [81,82]. Moreover, graphene and GO have been used for electrical CTC detection due to the excellent electromagnetic detection of small biomolecules [83] and found their application in biological and medical research by using optical transparency for imaging [84]. The application of a GO chip for sensitive CTC capture was achieved by self-assembled GO nanosheets on a gold-patterned silicon surface via a positively charged intercalating agent and functionalization with PEG [85]. Yoon et al. spiked cells of different cancer cell lines into buffer or blood samples and flowed through a GO chip. Spiked cells were captured due to the usage of anti-EpCAM antibody for substrate functionalization by cross-linker and biotin-avidin linker chemistry. Blood samples from patients with breast, pancreatic and early lung cancer were cultivated on the gold-patterned surface with GO sheets with a capture efficiency of 2–23 CTCs/mL [83].

Furthermore, Wu et al. established an electrochemical protocol for the measurement of two tumor specific markers, such as anti-EpCAM and anti-GPC3, on a captured tumor cell surface by application of a GO film-modified glass carbon electrode [86]. This method allows the marker-dependent capture of tumor cells and enumeration of captured cells by square-wave voltammetry. It was also possible to use detected cells for fluorescent imaging [80,86]. The cultivation of captured CTCs opens the possibility for further applications and analysis [86].

The above-mentioned CNTs demonstrate remarkable electrical, mechanical and physico-chemical properties and are composed of graphitic hollow filaments of alterable lengths reaching up to several hundred micrometers. CNTs are known as two types: single-walled (SWCNTs) that comprise a single cylindrical sheet of graphene and double-/multi-walled (MWCNTs) that are composed of several concentric, coaxial, rolled up graphene sheets. The size of CNTs differs with a diameter typically ranging from 0.4 to 3 nm for SWCNT and from 2 to 200 nm for MWCNT [87]. CNTs are synthesized by chemical vapor deposition [87,88]. Due to electronic properties, the conductance of CNTs can be detected by electron current signals and is depending on chemical binding and mechanical

deformations. Carbon nanofibers (CNFs) are also included to the group of CNTs. CNFs defend a less perfect graphene sheet arrangement featuring layers of graphene nanocones, the so called ‘cups’ and usually denote ‘stacked-cup carbon nanotubes’ [89].

First experiments on CTC detection in blood were published by Shao et al. [90] Binding of breast cancer cells to functionalized SWCNTs lead to a measurable decrease of conductivity. This assay contains a sensing area that is able to detect potential CTCs with low protein expression. This application presents the advantage of using samples without enrichment steps for direct cancer cell testing on the one hand, and on the other the challenge of a very small volume of analyzed patient blood (<10 µL) bearing the risk of missing CTCs. There is also the possibility of CTC counting difficulties because the signal is determined by a single cell reaching the space between the electrodes. Another example demonstrates the application of MWCNTs on a sensitive CNT-based biosensor for detection of CTCs from whole blood samples based on binding of anti-EpCAM antibodies to cancer cells and resulting in an increased electron transfer resistance. The detection of cells was demonstrated as an electrical response which was proportional to the concentration of cancer cells [59,91].

4. Nano Meets Micro—Micro-Mized Tools for Tumor Research

Beside the above described nano-sized systems for CTC detection and isolation, there are also techniques extending to the micro scale. Since these methods are widely used in combination with NMs in order to complement and advance nanomedical applications, we also discuss selected examples in the following sections.

4.1. Microfabricated Filters

Membrane microfilter devices are a suitable tool for separation of CTCs from whole blood samples by cell size exclusion [13,46,92,93]. Whereas CTCs can vary in their size and shape, the typical smaller dimensions of blood cells are 5–9 µm for erythrocytes, 10–15 µm for granulocytes, 7–18 µm for lymphocytes and 12–20 µm for monocytes [93]. The size exclusion approach is composed of a parylene-based membrane microfilter device including two parylene membrane layers and a photolithography-defined gap to minimize stress. This is the reason why isolated cells are viable and can be used for further molecular analysis [92,93]. The possibility of label-free isolation of CTCs is a large advantage of this technology. However the sensitivity to cell-size in a blood sample can lead to the risk of losing CTCs which are smaller than the filter pores because of their size and shape heterogeneity [46]. As an example, a parylene-based membrane microfilter device with integrated electrodes containing 11 µm diameter circular pores was used to isolate cancer cells. These cells were pre-stained with hematoxylin and spiked into a blood sample. This cell suspension was loaded into a syringe and dispensed to pass through the filter. The flow-through was collected by the bottom syringe. After the isolation process, immunostaining was used to determine potential CTCs from other cells on the filter. The recovery rate of the membrane filters was evaluated by hemocytometer using the hematoxylin staining of spiked cancer cells and resulted in $89.0 \pm 9.5\%$ recovery from blood [93].

4.2. Microbubbles in Diagnosis and CTC Detection

MBs are gas-filled, echogenic bubbles with a diameter typically comprised between 0.5 and 10 µm commonly used as contrast agents (CAs) in medical imaging and as carriers for targeted drug delivery, recently also gaining attention in the field of cancer diagnosis and treatment [94,95]. They consist of a low solubility complex gas, such as a perfluorocarbon (PFC) gas, surrounded by an external shell generally composed of phospholipids. A mixture of lipids in chloroform is homogenized by sonication in the presence of gas. PFC is especially suitable due to its low solubility in water, which is necessary for maintaining MB stability in the aqueous phase [96]. The bubble size is predominately determined by the solubility degree and partial pressure of the gas [96,97].

The MBs most investigated have soft shells made of phospholipids, sometimes of denaturated albumin, and contain a fluorocarbon (FC) as or among their inner gas phase component(s).

Standard shell phospholipids include dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) [96,98]. The longer chain distearoylphosphatidylcholine (DSPC) forms semi-crystalline liquid-condensed monolayers that confer additional shell rigidity and stability. Pegylated lipids can provide stealthiness. The lipids and PEG chains can be fitted with a wide range of ligands. Polymeric shells can provide some additional stability but their response to UIS waves is usually dampened. The biologically inert inner FC gas, by considerably increasing lipid-coated bubble stability, made the development of commercial CAs a reality. The FC stabilizes MBs by drastically reducing the solubility of the inner gas in the continuous aqueous phase, by osmotically stabilizing the gas phase, and by providing co-surfactant activity with the phospholipids [96,99].

Furthermore, MBs were developed as CAs for conventional ultrasound (UIS)-imaging diagnostics and have been used for daily clinical practice for more than 20 years (Figure 4). Given their size and rheology comparable to red blood cells, MBs freely circulate through vessels and capillaries, with an average lifetime of 5 min. UIS triggers MBs resonance, resulting in detectable harmonic signals. Molecular imaging can be performed with MBs containing targeting ligands on the bubble-shell. During systemic circulation, targeted MBs progressively accumulate in the regions expressing the targeted molecules, defining areas of bright signals on UIS pictures [100,101]. As a consequence, the use of microbubbles for UIS-imaging can enhance their quality by precisely defining the region of targeted MBs accumulation. For example, MBs can attach to the vascular endothelium via a specific ligand-receptor bond, so that pathophysiological processes (like inflammation, angiogenesis, thrombosis, and tumors) can be imaged [101]. Multiple MBs fitted with targeting devices have been reported that are able to seek inflammation sites, myocardial ischemia, ischemia-reperfusion injury, ischemic memory, atherosclerotic plaques, thrombi, and angiogenesis in malignant solid tumors for the purpose of molecular imaging and focused therapy [102]. A perfluorobutane/lipid MB (BR55, Bracco, Milano, Italy) fitted with a heterodimeric peptide that has affinity for the vascular endothelial growth factor receptor type 2 (VEGFR2), a molecule expressed in neoangiogenesis, and hence, can help detect angiogenesis, has recently (2016) been licensed by the FDA for molecular imaging and characterization of liver masses and as intravesical contrast agent for voiding cystoureterography in children. This agent and other targeted MBs are also being investigated for detection of prostate, ovary and breast cancers [103–105].

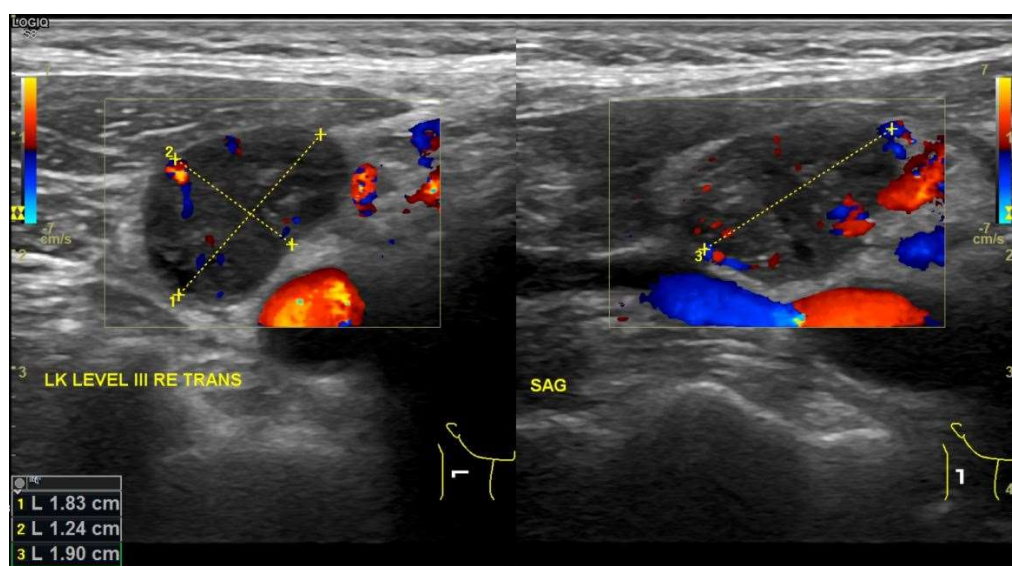


Figure 4. Ultrasound images of right transverse lymph node level III. Lymph node demonstrates malignant characteristics: axes are larger than 1 cm (left image), round shape with necrotic areas (right image).

Effective detection and isolation of CTC cells require high specificity and sensitivity, and simple and cost-effective technology. Targeted FC MBs are among the devices that are being investigated for CTC detection. They are easy to produce and collect cost-effectively. They can readily be fitted with multiple ligands, antibodies, and other markers that can recognize CTCs [102,103,106–109]. Due to their low density and buoyancy in aqueous media, they can easily be separated from aqueous media by flotation or gentle centrifugation. Once harvested, the isolated CTCs can be characterized, which can help determine treatment. CTCs may also be cultivated for personalized/precise drug testing. Besides their use for CTC isolation, MBs seem to enable CTC-targeted cancer drug delivery [102] (see Section 5.4) and may serve as carriers for drugs, genes and various markers, to overcome pathophysiological barriers, such as the blood brain barrier. Notably, MBs are furthermore already used for the delivery of energy, thus enabling techniques such as tissue ablation, sonothrombolysis or embolotherapy [102,110–112]. These approaches are technologically manageable, efficient and do not require any complex equipment. Their stability is limited, however, particular in biological fluids. But progress in formulation and preparation procedures has provided MBs sufficiently stable for efficient patient examination and for analytical procedures. MBs are extremely sensitive to UIS waves and can be imaged, monitored and manipulated by UIS [96,106]. Other imaging modalities, including ^{19}F -MRI can often be applied [113,114].

The use of MBs for CTC detection is very promising in theory but remains limited so far. Indeed, only one procedure using MBs to assist CTC separation from biological fluids has been reported [108,115]. This method is called flotation separation. The potential for targeted FC MBs to selectively bind and separate by buoyancy certain populations of circulating blood cells, initially erythrocytes and B-lymphoma cells, has been established [115]. This buoyancy-separation principle originally allowed for the isolation of CD4+ T lymphocytes from peripheral blood, following mixture with glass MBs [116]. In oncology, the capture of tumor cells has been demonstrated in solutions, blood or large-volume buffy coats [108,115]. Pancreatic tumor cells were captured within 15–30 min of incubation with functionalized MBs. The MB binding efficiency to human lung and mouse breast carcinoma into BSA/PBS or blood (around 90%) was comparable to that of commercial anti-EpCAM-coated magnetic beads (DynaBeads), ranging between 60–90% [117]. The EpCAM-targeted MBs can bind efficiently (85%) and rapidly (within 15 min) to various epithelial tumor cells suspended in cell medium [109]. In plasma-depleted blood, such MBs isolated tumor cells at high (105–106 cells/mL) and low (10–20 cells/mL) concentrations of tumor cells (mouse breast 4T1, human prostate PC-3 and pancreatic cancer BxPC-3 cells). However, in whole blood, MBs presented decreased stability, possibly due to gas mixing and exchange. Further development of the method led then to the design of blood-stable MBs for isolation of breast tumor cells [102]. Parallel studies on the lipid shell functionalization with anti-human EpCAM or EGFR antibodies demonstrated different preferential binding abilities to several breast tumor cell lines with distinct marker expression profiles, and culminated in the production of multi-targeted anti-human EpCAM/EGFR MBs recognizing all cell lines with over 95% efficiency [102]. Fast (30 min) and efficient (70–90%) recovery of CTCs was achieved in human blood. In patients with metastatic breast cancer, these MBs allowed for the isolation of CTCs, cell clusters and tumor-derived CK+/CD45- microparticles. Also, albumin-based MBs have been used for buoyancy-activated cell sorting, which showed inherent advantages (such as stability and simplicity of formulation) with respect to lipid-based ones [118]. In albumin-systems, the most common way for antibody conjugation is based on the non-covalent incorporation into the albumin shell of avidin linkers as anchor sites for biotinylated antibodies. Nevertheless, to strengthen the antibody conjugation, biotin can be first connected by a covalent amide bond to albumin, followed by incubation with avidin and biotinylated antibodies. These biotin-MBs targeted against CD44 receptors efficiently recognized luminal breast cancer cells in PBS, and were able to separate them from the CD44- basal-like breast cancer subset with higher sorting purity than other control MBs [118]. These results contribute to establishing that targeted MBs are an effective new approach to liquid biopsy [119]. As compared to other methods (adherence, absorbance, particle size, density gradient, dielectric properties, chemo-resistance), the antigen-antibody recognition provides

precise sorting. The two major sorting tools, being fluorescence activated cell sorting (FACS) and MACS, use expensive and large instruments, long processing time, and magnetic forces that may damage some types of cells [120–122]. Similarly, microfluidic approaches exert substantial shear stresses thus risking cell damage [123]. Instead, buoyant MBs isolate specific cells with molecular precision in a simple and safe way, given that the shear stress originated from a rising bubble and the tension from the buoyancy force are both far below the threshold for cell damage [124]. Moreover, whereas the assays where nano- or micron-sized immunomagnetic beads capture the CTCs suffer from some other limitations (such as non-specific carryover, relatively long processing time and contamination with leukocytes) [125–127], the MB-assisted cell isolation emerges as a promising method for rapid and accurate collection of exfoliated tumor cells in a variety of pathological samples (e.g., blood, bone marrow, urine). Finally, besides being cost-efficient and scalable, the flotation separation technology presents also wide horizons of optimization for biological use, considering the large versatility of MB surface functionalization.

MBs can also deliver therapeutic agents, and hence, exhibit extended theranostic potential. Remarkably, it was found that exposure to a supernatant FC gas can significantly enhance the adsorption and retention of a large variety of molecules, including lipids, proteins, surfactants, poloxamers, fluorinated drugs and hypoxia biomarkers at the surface of lipid-shelled MBs. The same phenomenon has been observed with diverse NPs, such as magnetic iron oxide, cerium oxide or nanodiamonds. The effect is particularly marked for fluorinated molecules and particles.

Multiple hybrid MBs are also being developed that carry NPs enclosed in or attached to their shell, including superparamagnetic iron oxides [128,129], QDs [130], gold clusters or nanorods [102,131,132], GO sheets [133], cerium oxide NPs [134], liposomes [135]. Small and stable MBs decorated with dendronized iron oxide magnetic NPs were obtained that are stabilized by fluorine-fluorine interactions between the internal FC gas and the fluorinated terminal end-group of the oligo(ethylene glycol)-based dendrons [136].

4.3. Microfluidic Lab-on-a-Chip Devices

A new development in the field of CTC enrichment and detection includes microfluidic lab-on-a-chip devices with immense advantages including cost-effectiveness, miniaturization, and the improvement of efficiency since it could be integrated into other techniques [14,137]. Consequently, isolation and analysis of CTCs on one chip can improve the number of caught CTCs by avoiding loss of rare cells during the experimental steps of sorting, enumeration and analysis [138]. Current microchip platforms are based on magnetic force, affinity, size or other physical properties and are separated into two types of microfluidic devices for CTC detection [139]. The first type of microfluidic devices includes the immunomagnetic-based method for CTC detection (e.g., CTC chip) and the second type represents the method of antibody-labeling combined with physical isolation (Figure 5), which can consist of different materials like silicon, glass or thermopolymer.

4.4. Immunomagnetic-Based Method and ‘Micro-Hall Detector’

Immunomagnetic-based CTC chip separation is performed by using the advantages of two combined techniques: the immunomagnetic separation and the microfluidic device. The capture efficiency depends on the magnetic strength and drag force under the flow condition. Cells bound to large number of NPs can be captured more efficiently by using both forces [21]. The isolation of cells in microfluidic channels is performed in the presence of a permanent magnetic field which can be located under the bottom of the chip [80,140] or on top of the channel to improve the separation efficiency by inverting the microchannel that results in gravity direction opposite to the magnetic field [141].

The possibility for a fast screening method for CTCs in a blood sample with a miniaturized microfluidic technology is called micro-Hall detector (μ HD). The μ HD can selectively and sensitively detect a wide range of single cellular biomarkers or multiple biomarkers on individual cells as screening system (Figure 5A). MNPs-immunolabeled cells can be detected via monitoring the magnetic

moments of cells in-flow on a single microfluidic chip. There is also an option to use MNPs with different magnetization properties to label different cellular markers. By using the particles' classifiable magnetization properties, the quantity of each MNP type representing the expression level of a distinct target biomarker in a single cell can be obtained [142].

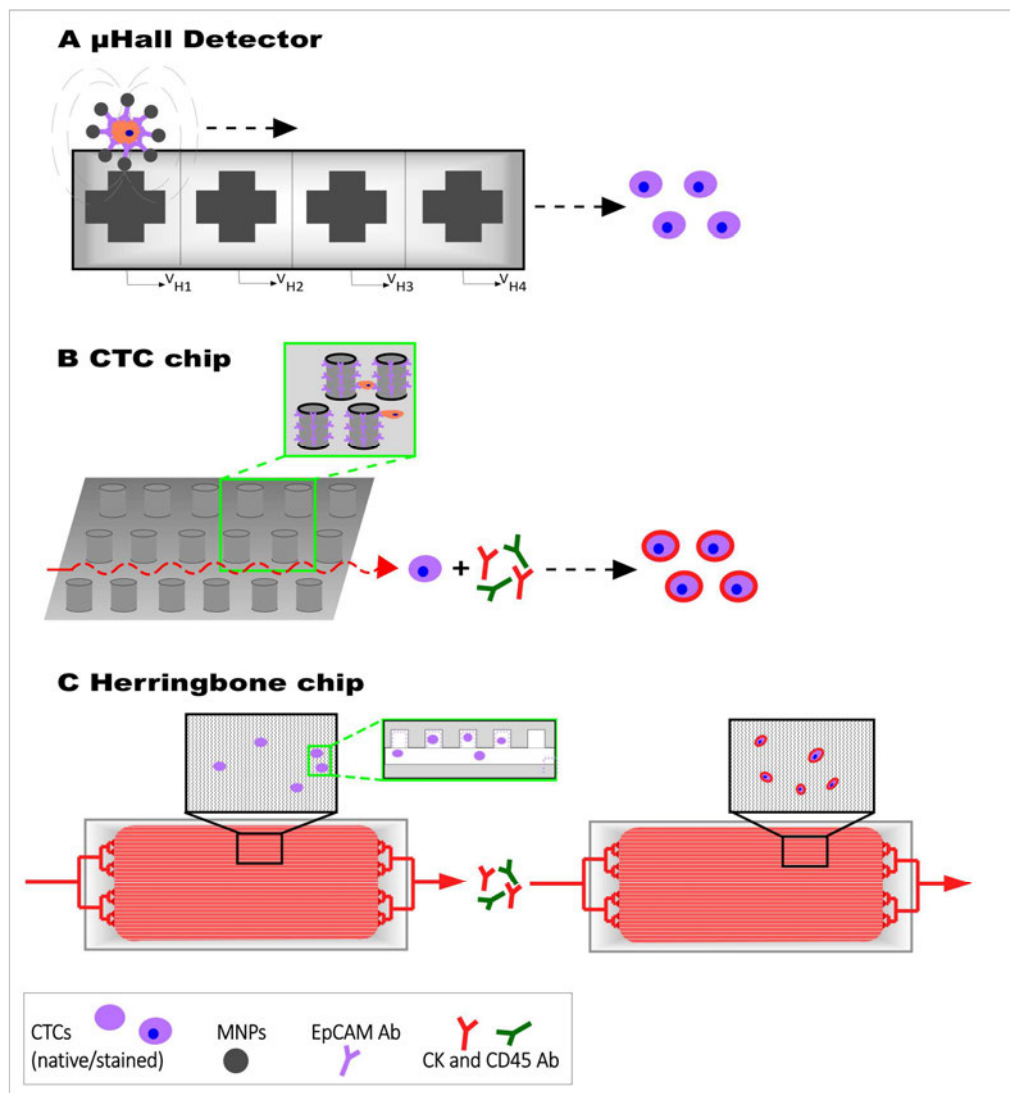


Figure 5. Design of microfluidic chips for CTC detection. Whole blood sample is pushed through the surface of the chip. (A) Cells are MNPs-immunolabeled and can be detected via monitoring the magnetic moments of cells in-flow on μ Hall detection chip. (B) CTC chip is coated with a CTC-specific antibody, such as EpCAM, and contains Ab-coated microposts. This system is also used in herringbone chip that contains Ab-coated microchannels (C). Captured cells are stained for CK, CD45 and DAPI for identification and enumeration.

4.5. 'CTC –Chip' as Silicon-Based Alternative

Another microfluidic device used for efficient and reproducible isolation of CTCs from the blood of patients with common epithelial tumors is called 'CTC-chip' [143]. This microfluidic system is composed of three parts: the CTC-chip etched in silicon, a manifold to enclose the chip, and a pump producing the flow through the capture module (Figure 5B). Additionally, the CTC-chip contains an EpCAM-antibody functionalized array of microposts. The cell capture efficiency can be influenced by two essential parameters: flow speed and shear force. The flow speed is important due to its influence

on the duration of cell-micropost contact, whereas the shear force has to be minimized to guarantee a high cell-micropost attachment [143].

4.6. Glass/PDMS-Based Chip and ‘Herringbone-Chip’

After the development of the CTC-chip a modified herringbone CTC capture chip was developed to increase the interaction of flowing cells and anti-EpCAM-functionalized polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels through passive mixing [144] (Figure 5C). The ‘herringbone-chip’ has integrated microvortices to disrupt streamlines and increase the capture efficiency. Due to the antibody-antigen interaction, cells tether to the chip and can be stained afterwards. The advantage of this glass chips is the transparency that allows clear imaging by using different types of light microscopy based techniques [80].

4.7. Thermoresponsive Polymer-Based CTC Chip

Due to magnificent optical transparency and low costs polymethylmethacrylate (PMMA) is also used for microfluidic CTC capture and analysis. PMMA includes UV exposure generated carboxylic acid groups on the surface to analyze protein concentration, electroless deposition and cancer cell capture [145]. Due to the enhanced surface area for functionalization, the surface area roughness can be additionally increased by high intensity light. The thermal bonding passes through to preserve these microfeatures at low temperature [146]. Accordingly, for CTCs specific capture and enumeration a high-throughput microsampling unit functionalized with anti-EpCAM antibodies and an included conductivity sensor has been developed [80].

5. Applications in Nanomedicine

As fighting tumor metastasis is, besides elimination of the primary tumor, the overarching goal of chemotherapy, therapeutic targeting and specific depletion or destruction of CTCs from blood vessels may be an intriguing strategy for prevention of tumor metastasis. With the emerging possibilities of nanoscale materials, researchers have new tools at hand to design and develop a variety of nanosystems for targeted delivery of therapeutic agents to CTCs hoping to efficiently destroy them and thereby to inhibit tumor metastasis (Figure 6).

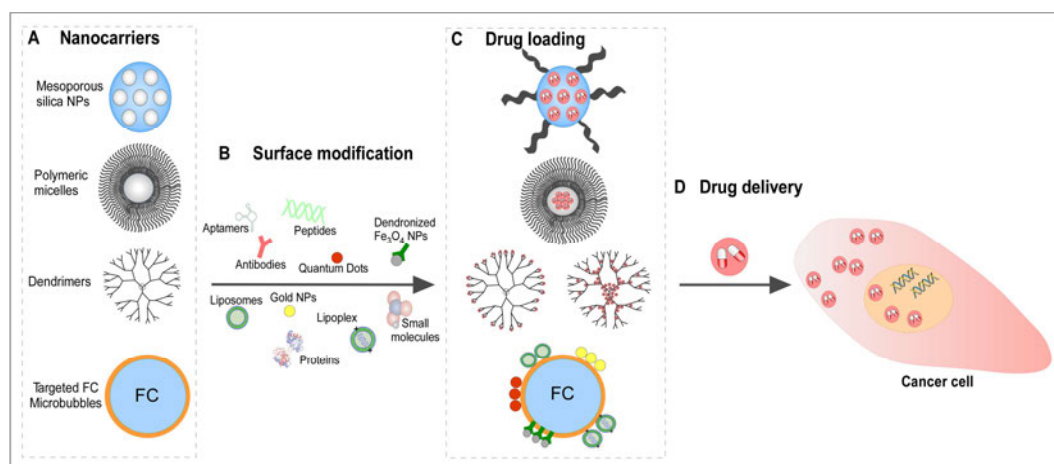


Figure 6. Illustration of drug delivery system of different nanocarriers: (A) Unloaded nanocarriers: Mesoporous silica NPs, polymeric micelles, dendrimers and targeted FC microbubbles. (B) Surface modification of nanocarriers with cancer cell specific targets (aptamers, antibodies, dendronized Fe₃O₄ NPs, gold NPs, liposomes, lipoplex, peptides, proteins, quantum dots, and small molecules). (C) Illustration of drug loaded nanocarriers and drug release in cancer cells (D).

5.1. Mesoporous Silica Nanoparticles

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) with a pore size from 2 nm to 50 nm show attractive properties, such as a large surface area, mesoporous structure as well as a controllable pore size, ease of surface functionalization and good biocompatibility [147] and have therefore drawn considerable attention especially for drug delivery applications during the past years. For example, nanoplatforms have been developed, which can specifically target colorectal cancer cells via an EpCAM antibody-functionalization representing an in vitro model for CTC targeting in colorectal cancer patients [148]. Furthermore, loading of MSNs with mifepristone allowed the inhibition of lung metastasis in mice. Thus, this proof-of-concept study suggested the MSN-based prevention of metastasis spread by restraining CTC activity [148].

5.2. Polymeric Colloidal Particles as Polymeric Micelles

Polymeric colloidal particles can be produced in a size range of several nm and allow for secure encapsulation, adsorption or conjugation of therapeutic agents within their polymeric matrix or their surface [149,150]. Due to their biodegradability and biocompatibility as well as the possibility to combine a broad range of controlled chemical and physical properties by molecular synthesis, polymeric materials remain an important cancer drug delivery system. Linear, globular or branched polymers of different sizes have been used in the past [151–153]. Core-shell particles, which are mainly formed using amphiphilic block copolymers, are called “micelles”. Micelles consist of a hydrophobic core to minimize aqueous exposure and a hydrophilic shell to stabilize the core [154]. These properties leave micelle structures attractive for drug delivery applications as they allow the loading with hydrophobic small molecule drugs into their core while a steric protection can be added to the outer “shell” layer. Additionally, hydrophilic drugs including macromolecules like nucleic acids can be included into polymeric NPs by electrostatic attraction or chemical conjugation. Moreover, controlled release of macromolecules from micelles has now been applied in different studies [155,156].

In the design of different drug-loaded nano-systems, a number of materials have been applied and were found to be well suited, albeit showing different advantages depending on the application. Polyamides, poly(amino acids), polyesters and polyacrylamides with thermoplastic aliphatic polyesters such as poly glycolic acid, polylactic acid (PLA) and copolymer poly (lactic co-glycolic acid) (PLGA) are some of the most common examples [157–160]. Due to its high biodegradability, PLGA is often utilized in biomedical applications [156,161]. Furthermore, PLA and chitosan form polymeric micelles [149] whereas the latter can be applied as transport vehicle for hydrophilic drugs. Similarly, PLGA and PLA exhibit advantageous characteristics such as low toxicity in combination with negative surface charge [162]. Nonspecific side effects of the antitumor agent Doxorubicin (Dox) could be reduced by Dox encapsulation in chitosan NPs tested for the treatment of solid tumors in vivo [163,164].

Deng et al. used Dox-loaded biodegradable polymeric micelles to target CTCs and finally suppress tumor metastasis [165]. They synthesize monomethyl poly (ethylene glycol)-poly (ε-caprolactone) (mPEG-PCL) deblock copolymers to prepare Dox-loaded micelles via a pH-induced self-assembly. Whereas unloaded micelles showed minimal cytotoxicity when incubated with 4T1 cells even at very high concentrations, micelles loaded with Dox induced slightly higher cytotoxicity than Dox alone. Dox micelles were able to inhibit tumor growth, suppress tumor metastasis by killing CTCs and extend the survival rate in transgenic zebrafish as well as a mouse model, by inducing apoptosis and reducing the number of proliferation-positive cells in tumors [165].

In another study, a designed nanoplatform consisting of paclitaxel-loaded PEG-PLA polymeric micelles was successfully applied to achieve dual damaging of the primary tumor as well as CTCs [166]. In a recent study, Gener et al. loaded polymeric micelles with the FDA-approved drug ZileutonTM which has been reported to be a potent inhibitor of cancer stem cells. Interestingly, the authors reported complete eradication of CTCs in the blood stream of an in vivo mouse model and thus, suggested their system to be effective against metastatic spread [167].

5.3. Dendrimers

Dendrimers are highly soluble, can be synthesized with a uniformity in size and composition, and have a high number of surface groups. This combination of properties and the ease of functionalizing the surface groups, make them interesting to develop drug development strategies [168]. Employing a novel polyamidoamine dendrimer-based nanoplatfrom, CTCs could be captured and their adhesion to the vascular endothelial layer inhibited [169–172]. The nanoscale dendrimers therefore made use of two antibodies coated to their surface and targeting membrane markers of human colorectal CTCs (anti-EpCAM and -Slex). Whereas it has been reported, that targeting of EpCAM can directly disturb the adhesion process of CTCs, the Slex (saliva acidifying lous oligosaccharides X) antibody can indirectly interrupt the adhesion between CTCs and endothelial cells via Slex/E-selection interaction [169]. In comparison to their single antibody-coated counterparts, the dual antibody conjugates displayed a remarkably enhanced efficiency and specificity in recognizing and capturing CTCs from a large population of leukocytes or red blood cells *in vitro*, as well as from the blood of patients and mice *in vivo*. Recently, this group developed dual aptamer rings which are conjugated on dendrimers and thus, are able to simultaneously target EpCAM and Her2 biomarkers on CTCs in the presence of millions of normal cells with excellent stability and accuracy [173]. The described study provides new ideas for the design of more powerful and intelligent nanomedicines allowing the prevention of tumor metastasis via suppressing CTCs and blocking their adhesion to blood vessels. Zheng et al. presented a type of barcode particle consisted of spherical colloidal crystal clusters which are surrounded by dendrimer-amplified aptamer probes [174]. A specific aptamer functionalization let the particles interact with specific CTC types and used dendrimers able to amplify the effect of the aptamers. Particles with these capabilities are able to capture, detect and release multiple types of CTCs from clinical samples [174].

5.4. Microbubbles in Tumor Treatment

In recent years, MBs have started to be used for therapeutic approaches [175]. Chemotherapeutic agents can be delivered to malignant tissues by combining UIS and MBs, enhancing the *in vivo* delivery of the drug into the tumor, thereby minimizing the harmful systemic side effects on normal tissues [176]. In this regard, focused UIS in the presence of circulating MBs have been extensively exploited to temporarily open the blood-brain barrier and elicit the passage of chemotherapeutic agents into neural neoplasms. In fact, the local tumor insonation elicits a stable *cavitation* effect, as the UIS energy is transferred to the circulating MBs, letting them to expand and contract cyclically. This oscillation results in damage of the tight junctions and interruption of the contiguous endothelial cell layer [177].

Novel MBs have been developed to directly be loaded with drugs and to release them, thus acting as drug delivery platforms, either in the presence or in the absence of UIS stimulation. Strategies for incorporation of several drugs onto the MB surface have been reviewed [107,178]. The mechanisms of drug release and tumor delivery are different. For instance, the cavitation can cause MB rupture during tumor insonation and drive the drug throughout the capillary wall by delivering a “ballistic effect” [179]; alternatively, sonication can induce MB oscillation leading to permeabilization of the contiguous cell membranes, enhancing the entry of a locally released agent into either cancerous or endothelial cells [180,181]. Furthermore, MBs loaded with specific molecules, called *sonosensitizers*, can be used for sonodynamic tumor therapy [175,182]. In sonodynamic therapy, cell cultures or tumors are sonicated by UIS at selected frequency and intensity range (usually around 1.0–2.0 MHz, 0.5–3.0 W.cm^{−2}), resulting in phenomena of inertial cavitation. The rapid collapse of bubbles in the liquid milieu determines shock waves producing free radicals and a cascade of molecular events that activate the sonosensitizers, which in turn kill rapidly dividing cancer cells nearby [183]. Conventional sonosensitizers are the same light-sensitive agents developed for photodynamic therapy [184], like hematoporphyrin and its derivatives. When loaded onto MBs [175], their circulation into the tumor vasculature can then be monitored by diagnostic UIS, so that the sonodynamic process can be initiated once detected within the mass, thus creating a therapeutic-diagnostic platform to monitor the treatment

effectiveness [185–187]. In addition, damaging of the tumor vascularity can also be achieved through MBs (i.e., *antivascular therapy*). Here, MBs act as vascular disrupting agents, whose insonation results into local thermal and cavitation effects leading to the destruction of endothelial cells lining the tumor vessels [188] and necrosis of the neoplastic cells, with a consequent reduction in tumor growth and lengthened survival time. Finally, targeted MBs could be used to selectively eliminate CTCs during their systemic circulation: after intrasystemic injection and CTCs recognition, their insonation might induce local cavitation effects and stimulate either release of chemotherapeutics or cell damage. Moreover, the possibility to combine MBs with other nano-objects (such as liposomes or superparamagnetic NPs) widens the plethora of therapeutic options that one could exploit for CTC killing, including new strategies of drug loading/release and thermotherapy. Nevertheless, even though the principle of the CTC-eliminating MBs could be easily applied, thus far only one study of such kind has been carried out [189]: here, liposome-loaded MBs targeted to N-cadherin (N-cad) could bind to a human melanoma cell line derived from a lymph node metastasis (HMB2 cells). Upon insonation, a model drug (propidium iodide) loaded onto the liposomes was intracellularly delivered to N-cad-expressing cells only. Due to the great potential of MB-mediated CTC depletion strategy and to the urgency in finding effective and portable solutions to hinder cancer relapse caused by metastatic colonization, more efforts in development of such technology are expected in a near future.

6. Conclusions and Outlook

In the field of nanomedicine, the application of engineered NMs has assumed an increasing role in early cancer diagnosis and efficient treatment. The analysis of captured CTCs in liquid biopsies from cancer patients provides important information about the biology of cancer micrometastases, and offers a well-tolerated alternative to standard biopsies in the clinical management of carcinoma patients.

Preliminary results of CTCs' enumeration and analysis obtained by the FDA-approved CellSearch system suggest the possibility of 'on-line' monitoring of an ongoing therapy and the drug efficiency. In recent years, a variety of CTC isolation assays have been evolved for supervising a range of distinct tumor types at different disease stages. Due to the extremely rare presence of CTCs in peripheral blood the isolation and detection of CTCs can be very challenging. Consequently, new technologies have to accomplish the challenges of rare cells physical properties including their size, density, deformability and cell shape. Therefore, specificity and sensitivity and cost-effectiveness remain the key issues which upcoming technologies need to address. The development of nanotechnology-based methods for detection and follow-up analysis of CTCs represents a milestone to achieve high capture efficiency, accuracy, and sensitivity. NMs can implement the possibility of a multiplexed targeting because of their possibility to be modified with different targeting ligands to capture, isolate and detect CTC subpopulations.

By summarizing a variety of NM-based enrichment, capture and also detection methods, and by comparing them to complementary micro-sized systems, such as the use of microbubbles, the advantages, but also some disadvantages of nano-sized systems became obvious. Obvious advantages of nanostructured substrates and platforms for the detection and capture of CTCs are better ligand-antigen binding between the functionalized substrate and captured CTCs. Nanostructured substrates demonstrate enhanced local topographic interactions that lead to enhanced cell capture affinity. Additionally, ligand coating of nanostructures can be prepared with much higher density thereby improving binding affinity in comparison to micro- and macrostructures. Moreover, the use of microfluidic chips as cost-effective, miniaturized and efficiency improved applications for the enrichment and detection of CTCs obtain better performance with nanostructured substrates. In contrast, few nanomaterials have made it to clinical trials, or even clinical practice and there is not yet any FDA-approved nanomedical product that markedly improves patient survival or quality of life. The use of NMs in nanomedicine products (e.g., devices and therapeutics) has been quite limited due to their frequent toxic and harmful properties in biological and medical contexts [190]. To however

improve therapeutic gain of nanomedicine also in the CTC field, a mechanistic understanding of determinants at nanobio-interfaces is a must.

The benefits of microchip technology and nanotechnology are associated with a combination of NMs with microfluidic devices to optimize the CTC capture methods for further analysis. Targeted lipid-coated FC MBs may ensure rapid and efficient isolation by simple flotation of CTCs from the blood of patients with metastatic cancer, and enable focused drug delivery as well. Besides detection and analysis of CTCs, a huge potential of this technology lies in a CTC-targeted cancer therapy to eliminate tumor cells in the peripheral blood. In conclusion, the further development of nano-sized CTC systems should be not only focused on tumor diagnosis and monitoring, but should also exploit its own potential as anticancer treatment. To benefit from a combination of available technologies, the “nano meets micro” approach seems to be promising to achieve long overdue progress in the field of nanomedicine.

Author Contributions: All authors contributed toward data analysis, drafting and critically revising the paper, gave final approval of the version to be published, and agree to be accountable for all aspects of the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Research Center for Natural and Medical Sciences ([Naturwissenschaftlich-medizinisches Forschungszentrum]; NMFZ), Brigitte and Konstanze Wegener Foundation, German Research Foundation ([Deutsche Forschungsgemeinschaft]; DFG), foreign experts project of Shanxi Provincial ‘100 Talents Plan’ (RS, GD), and NanoTransMed, which is co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) in the framework of the Interreg V Upper Rhine program, the Swiss Confederation, and the Swiss cantons of Aargau, Basel-Landschaft, and Basel-Stadt.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Docter, D.; Westmeier, D.; Markiewicz, M.; Stolte, S.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H. The nanoparticle biomolecule corona: Lessons learned—Challenge accepted? *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6094–6121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mocellin, S.; Hoon, D.; Ambrosi, A.; Nitti, D.; Rossi, C.R. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 4605–4613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Pantel, K.; Alix-Panabieres, C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 398–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kramer, O.H.; Stauber, R.H.; Bug, G.; Hartkamp, J.; Knauer, S.K. SIAH proteins: Critical roles in leukemogenesis. *Leukemia* **2013**, *27*, 792–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Garzia, L.; D’Angelo, A.; Amoresano, A.; Knauer, S.K.; Cirulli, C.; Campanella, C.; Stauber, R.H.; Steegborn, C.; Iolascon, A.; Zollo, M. Phosphorylation of nm23-H1 by CKI induces its complex formation with h-prune and promotes cell motility. *Oncogene* **2008**, *27*, 1853–1864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hong, Y.; Fang, F.; Zhang, Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 2206–2216. [[CrossRef](#)]
7. Lambert, A.W.; Pattabiraman, D.R.; Weinberg, R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **2017**, *168*, 670–691. [[CrossRef](#)]
8. Nguyen, D.X.; Bos, P.D.; Massague, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 274–284. [[CrossRef](#)]
9. Austin, R.G.; Huang, T.J.; Wu, M.; Armstrong, A.J.; Zhang, T. Clinical utility of non-EpCAM based circulating tumor cell assays. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**. [[CrossRef](#)]
10. Gribko, A.; Kunzel, J.; Wunsch, D.; Lu, Q.; Nagel, S.M.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H.; Ding, G.B. Is small smarter? Nanomaterial-based detection and elimination of circulating tumor cells: Current knowledge and perspectives. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 4187–4209. [[CrossRef](#)]
11. Allard, W.J.; Matera, J.; Miller, M.C.; Repollet, M.; Connelly, M.C.; Rao, C.; Tibbe, A.G.; Uhr, J.W.; Terstappen, L.W. 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*, 6897–6904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Kim, S.; Han, S.I.; Park, M.J.; Jeon, C.W.; Joo, Y.D.; Choi, I.H.; Han, K.H. Circulating tumor cell microseparator based on lateral magnetophoresis and immunomagnetic nanobeads. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2779–2786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pantel, K.; Brakenhoff, R.H.; Brandt, B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 329–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hao, S.J.; Wan, Y.; Xia, Y.Q.; Zou, X.; Zheng, S.Y. Size-based separation methods of circulating tumor cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ried, K.; Eng, P.; Sali, A. Screening for Circulating Tumour Cells Allows Early Detection of Cancer and Monitoring of Treatment Effectiveness: An Observational Study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2017**, *18*, 2275–2285. [[CrossRef](#)]
16. Jaeger, B.A.; Jueckstock, J.; Andergassen, U.; Salmen, J.; Schochter, F.; Fink, V.; Alunni-Fabbroni, M.; Rezai, M.; Beck, T.; Beckmann, M.W.; et al. Evaluation of two different analytical methods for circulating tumor cell detection in peripheral blood of patients with primary breast cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 491459. [[CrossRef](#)]
17. Murray, N.P.; Albarran, V.; Perez, G.; Villalon, R.; Ruiz, A. Secondary Circulating Tumor Cells (CTCs) but not Primary CTCs are Associated with the Clinico-Pathological Parameters in Chilean Patients With Colo-Rectal Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2015**, *16*, 4745–4749. [[CrossRef](#)]
18. Wendel, M.; Bazhenova, L.; Boshuizen, R.; Kolatkar, A.; Honnatti, M.; Cho, E.H.; Marrinucci, D.; Sandhu, A.; Perricone, A.; Thistlethwaite, P.; et al. Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early-and late-stage non-small cell lung cancer: A glimpse into lung cancer biology. *Phys. Biol.* **2012**, *9*, 016005. [[CrossRef](#)]
19. Engel, H.; Kleespies, C.; Friedrich, J.; Breidenbach, M.; Kallenborn, A.; Schondorf, T.; Kolhagen, H.; Mallmann, P. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 1165–1173. [[CrossRef](#)]
20. de Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, R.B.; Parker, C.; Miller, M.C.; Tissing, H.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.; Pienta, K.J.; Raghavan, D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6302–6309. [[CrossRef](#)]
21. Bhana, S.; Wang, Y.; Huang, X. Nanotechnology for enrichment and detection of circulating tumor cells. *Nanomedicine (Lond)* **2015**, *10*, 1973–1990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, Z.; King, M.R. Nanomaterials for the Capture and Therapeutic Targeting of Circulating Tumor Cells. *Cell. Mol. Bioeng.* **2017**, *10*, 275–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Satelli, A.; Mitra, A.; Brownlee, Z.; Xia, X.; Bellister, S.; Overman, M.J.; Kopetz, S.; Ellis, L.M.; Meng, Q.H.; Li, S. Epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells capture for detecting tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 899–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lindner, J.R. Microbubbles in medical imaging: Current applications and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 527–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rauscher, H.; Sokull-Kluttgen, B.; Stamm, H. The European Commission’s recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 1195–1197. [[CrossRef](#)]
26. Ashworth, T.R. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumors Were Seen in the Blood after Death. *Australas. Med. J.* **1869**, *14*, 146–149.
27. Arya, S.K.; Lim, B.; Rahman, A.R. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells. *Lab Chip* **2013**, *13*, 1995–2027. [[CrossRef](#)]
28. Ming, Y.; Li, Y.; Xing, H.; Luo, M.; Li, Z.; Chen, J.; Mo, J.; Shi, S. Circulating Tumor Cells: From Theory to Nanotechnology-Based Detection. *Front Pharmacol.* **2017**, *8*, 35. [[CrossRef](#)]
29. Clevers, H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 313–319. [[CrossRef](#)]
30. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122. [[CrossRef](#)]
31. Wollenberg, B. Implication of stem cells in the biology and therapy of head and neck cancer. *GMS Curr. Top Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.* **2011**, *10*, Doc01. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Krawczyk, N.; Meier-Stiegen, F.; Banys, M.; Neubauer, H.; Ruckhaeberle, E.; Fehm, T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 415721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Massague, J.; Obenauf, A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **2016**, *529*, 298–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nieto, M.A. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. *Science* **2013**, *342*, 1234850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Banyard, J.; Chung, I.; Wilson, A.M.; Vetter, G.; Le Behec, A.; Bielenberg, D.R.; Zetter, B.R. Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tsai, J.H.; Donaher, J.L.; Murphy, D.A.; Chau, S.; Yang, J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 725–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ocana, O.H.; Corcoles, R.; Fabra, A.; Moreno-Bueno, G.; Acloque, H.; Vega, S.; Barrallo-Gimeno, A.; Cano, A.; Nieto, M.A. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 709–724. [[CrossRef](#)]
38. Jie, X.X.; Zhang, X.Y.; Xu, C.J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget* **2017**, *8*, 81558–81571. [[CrossRef](#)]
39. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715. [[CrossRef](#)]
40. Lippert, B.M.; Knauer, S.K.; Fetz, V.; Mann, W.; Stauber, R.H. Dynamic survivin in head and neck cancer: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1169–1174. [[CrossRef](#)]
41. Shen, Z. Cancer biomarkers and targeted therapies. *Cell Biosci.* **2013**, *3*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Knauer, S.K.; Stauber, R.H. Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4815–4820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alix-Panabieres, C.; Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 623–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Opoku-Damoah, Y.; Assanhoun, A.G.; Sooro, M.A.; Baduweh, C.A.; Sun, C.; Ding, Y. Functional Diagnostic and Therapeutic Nanoconstructs for Efficient Probing of Circulating Tumor Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 14231–14247. [[CrossRef](#)]
45. Raimondi, C.; Gradilone, A.; Naso, G.; Cortesi, E.; Gazzaniga, P. Clinical utility of circulating tumor cell counting through CellSearch(R): The dilemma of a concept suspended in Limbo. *Onco. Targets Ther.* **2014**, *7*, 619–625. [[CrossRef](#)]
46. Zhang, J.; Chen, K.; Fan, Z.H. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. *Adv. Clin. Chem.* **2016**, *75*, 1–31. [[CrossRef](#)]
47. Alix-Panabieres, C.; Pantel, K. Technologies for detection of circulating tumor cells: Facts and vision. *Lab Chip* **2014**, *14*, 57–62. [[CrossRef](#)]
48. Wang, H.; Lin, Y.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G.U. The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
49. Monopoli, M.P.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K.A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786. [[CrossRef](#)]
50. Monopoli, M.P.; Bombelli, F.B.; Dawson, K.A. Nanobiotechnology: Nanoparticle coronas take shape. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 11–12. [[CrossRef](#)]
51. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Treuel, L.; Docter, D.; Maskos, M.; Stauber, R.H. Protein corona—From molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 857–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Vroman, L. Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature* **1962**, *196*, 476–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K.A.; Linse, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2050–2055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Westmeier, D.; Stauber, R.H.; Docter, D. The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *299*, 53–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Walczyk, D.; Bombelli, F.B.; Monopoli, M.P.; Lynch, I.; Dawson, K.A. What the cell “sees” in bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5761–5768. [\[CrossRef\]](#)
57. Walkey, C.D.; Olsen, J.B.; Song, F.; Liu, R.; Guo, H.; Olsen, D.W.; Cohen, Y.; Emili, A.; Chan, W.C. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* **2014**, *8*, 2439–2455. [\[CrossRef\]](#)
58. Myung, J.H.; Tam, K.A.; Park, S.J.; Cha, A.; Hong, S. Recent advances in nanotechnology-based detection and separation of circulating tumor cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 223–239. [\[CrossRef\]](#)
59. Huang, Q.; Wang, Y.; Chen, X.; Wang, Y.; Li, Z.; Du, S.; Wang, L.; Chen, S. Nanotechnology-Based Strategies for Early Cancer Diagnosis Using Circulating Tumor Cells as a Liquid Biopsy. *Nanotheranostics* **2018**, *2*, 21–41. [\[CrossRef\]](#)
60. Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 24–46. [\[CrossRef\]](#)
61. Riethdorf, S.; O’Flaherty, L.; Hille, C.; Pantel, K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Pamme, N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* **2006**, *6*, 24–38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Rao, C.G.; Chianese, D.; Doyle, G.V.; Miller, M.C.; Russell, T.; Sanders, R.A., Jr.; Terstappen, L.W. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 49–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Torsten Schöling, A.E.; Thomas Scheperand and Johanna Walter. Aptamer-based lateral flow assays. *AIMS Bioeng.* **2018**, *5*, 78–102. [\[CrossRef\]](#)
65. Jia, Z.; Liang, Y.; Xu, X.; Li, X.; Liu, Q.; Ou, Y.; Duan, L.; Zhu, W.; Lu, W.; Xiong, J.; et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid by magnetic-activated cell sorting (MACS). *Cell Biol. Int.* **2018**, *42*, 262–271. [\[CrossRef\]](#)
66. Andreopoulou, E.; Yang, L.Y.; Rangel, K.M.; Reuben, J.M.; Hsu, L.; Krishnamurthy, S.; Valero, V.; Fritsche, H.A.; Cristofanilli, M. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1590–1597. [\[CrossRef\]](#)
67. Gorges, T.M.; Tinhofer, I.; Drosch, M.; Rose, L.; Zollner, T.M.; Krahn, T.; von Ahsen, O. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 178. [\[CrossRef\]](#)
68. Rosorius, O.; Heger, P.; Stelz, G.; Hirschmann, N.; Hauber, J.; Stauber, R.H. Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells. *Biotechniques* **1999**, *27*, 350. [\[CrossRef\]](#)
69. Yu, M.; Stott, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D.A. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 373–382. [\[CrossRef\]](#)
70. Lee, J.; Kang, H.J.; Jang, H.; Lee, Y.J.; Lee, Y.S.; Ali, B.A.; Al-Khedhairy, A.A.; Kim, S. Simultaneous imaging of two different cancer biomarkers using aptamer-conjugated quantum dots. *Sensors* **2015**, *15*, 8595–8604. [\[CrossRef\]](#)
71. Galanzha, E.I.; Zharov, V.P. Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo. *Cancers* **2013**, *5*, 1691–1738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Wu, X.; Xia, Y.; Huang, Y.; Li, J.; Ruan, H.; Chen, T.; Luo, L.; Shen, Z.; Wu, A. Improved SERS-Active Nanoparticles with Various Shapes for CTC Detection without Enrichment Process with Supersensitivity and High Specificity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 19928–19938. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2008**, *1*, 17–32. [\[CrossRef\]](#)
74. Hu, M.; Chen, J.; Li, Z.Y.; Au, L.; Hartland, G.V.; Li, X.; Marquez, M.; Xia, Y. Gold nanostructures: Engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1084–1094. [\[CrossRef\]](#)
75. He, W.; Wang, H.; Hartmann, L.C.; Cheng, J.X.; Low, P.S. In vivo quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11760–11765. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

76. He, B.; Yang, D.; Qin, M.; Zhang, Y.; He, B.; Dai, W.; Wang, X.; Zhang, Q.; Zhang, H.; Yin, C. Increased cellular uptake of peptide-modified PEGylated gold nanoparticles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *494*, 339–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Zhang, Y.; Kohler, N.; Zhang, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553–1561. [[CrossRef](#)]
78. Park, M.H.; Reategui, E.; Li, W.; Tessier, S.N.; Wong, K.H.; Jensen, A.E.; Thapar, V.; Ting, D.; Toner, M.; Stott, S.L.; et al. Enhanced Isolation and Release of Circulating Tumor Cells Using Nanoparticle Binding and Ligand Exchange in a Microfluidic Chip. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2741–2749. [[CrossRef](#)]
79. Pramani, K.A.; Jones, S.; Gao, Y.; Sweet, C.; Vangara, A.; Begum, S.; Ray, P.C. Multifunctional hybrid graphene oxide for circulating tumor cell isolation and analysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**. [[CrossRef](#)]
80. Yoon, H.J.; Kozminsky, M.; Nagrath, S. Emerging role of nanomaterials in circulating tumor cell isolation and analysis. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1995–2017. [[CrossRef](#)]
81. Dreyer, D.R.; Park, S.; Bielawski, C.W.; Ruoff, R.S. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 228–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Sun, X.; Liu, Z.; Welshe, K.; Robinson, J.T.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H. Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano Res.* **2008**, *1*, 203–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yoon, H.J.; Kim, T.H.; Zhang, Z.; Azizi, E.; Pham, T.M.; Paoletti, C.; Lin, J.; Ramnath, N.; Wicha, M.S.; Hayes, D.F.; et al. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 735–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Loh, K.P.; Bao, Q.; Eda, G.; Chhowalla, M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1015–1024. [[CrossRef](#)]
85. Wei, Z.; Barlow, D.E.; Sheehan, P.E. The assembly of single-layer graphene oxide and graphene using molecular templates. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3141–3145. [[CrossRef](#)]
86. Wu, Y.; Xue, P.; Kang, Y.; Hui, K.M. Highly specific and ultrasensitive graphene-enhanced electrochemical detection of low-abundance tumor cells using silica nanoparticles coated with antibody-conjugated quantum dots. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3166–3173. [[CrossRef](#)]
87. Murray, A.R.; Kisin, E.R.; Tkach, A.V.; Yanamala, N.; Mercer, R.; Young, S.H.; Fadeel, B.; Kagan, V.E.; Shvedova, A.A. Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*, 10. [[CrossRef](#)]
88. Allegri, M.; Perivoliotis, D.K.; Bianchi, M.G.; Chiu, M.; Pagliaro, A.; Koklioti, M.A.; Trompeta, A.A.; Bergamaschi, E.; Bussolati, O.; Charitidis, C.A. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol. Rep.* **2016**, *3*, 230–243. [[CrossRef](#)]
89. De Jong, K.P.; Geus, J.W. Carbon nanofibers: Catalytic synthesis and applications. *Catal. Rev. Sci. Eng.* **2000**, *42*, 481–510. [[CrossRef](#)]
90. Shao, N.; Wickstrom, E.; Panchapakesan, B. Nanotube-antibody biosensor arrays for the detection of circulating breast cancer cells. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 465101. [[CrossRef](#)]
91. Liu, Y.; Zhu, F.; Dan, W.; Fu, Y.; Liu, S. Construction of carbon nanotube based nanoarchitectures for selective impedimetric detection of cancer cells in whole blood. *Analyst* **2014**, *139*, 5086–5092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Tan, S.J.; Yobas, L.; Lee, G.Y.; Ong, C.N.; Lim, C.T. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 883–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Zheng, S.; Lin, H.; Liu, J.Q.; Balic, M.; Datar, R.; Cote, R.J.; Tai, Y.C. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1162*, 154–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Harvey, C. Ultrasound with microbubbles. *Cancer Imaging* **2015**, *15*, O19. [[CrossRef](#)]
95. Ambika Rajendran, M. Ultrasound-guided Microbubble in the Treatment of Cancer: A Mini Narrative Review. *Cureus* **2018**, *10*, e3256. [[CrossRef](#)]
96. Schutt, E.G.; Klein, D.H.; Mattrey, R.M.; Riess, J.G. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3218–3235. [[CrossRef](#)]
97. Talu, E.; Hettiarachchi, K.; Powell, R.L.; Lee, A.P.; Dayton, P.A.; Longo, M.L. Maintaining monodispersity in a microbubble population formed by flow-focusing. *Langmuir* **2008**, *24*, 1745–1749. [[CrossRef](#)]
98. Sirsi, S.; Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble Sci. Eng. Technol.* **2009**, *1*, 3–17. [[CrossRef](#)]

99. Szijjarto, C.; Rossi, S.; Waton, G.; Krafft, M.P. Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles: Osmotic effect versus interfacial film stabilization. *Langmuir* **2012**, *28*, 1182–1189. [[CrossRef](#)]
100. Yeh, J.S.; Sennoga, C.A.; McConnell, E.; Eckersley, R.; Tang, M.X.; Nourshargh, S.; Seddon, J.M.; Haskard, D.O.; Nihoyannopoulos, P. A Targeting Microbubble for Ultrasound Molecular Imaging. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129681. [[CrossRef](#)]
101. Wang, S.; Hossack, J.A.; Klibanov, A.L. Targeting of microbubbles: Contrast agents for ultrasound molecular imaging. *J. Drug Target* **2018**, *26*, 420–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Wang, G.; Benasutti, H.; Jones, J.F.; Shi, G.; Benchimol, M.; Pingle, S.; Kesari, S.; Yeh, Y.; Hsieh, L.E.; Liu, Y.T.; et al. Isolation of Breast cancer CTCs with multitargeted buoyant immunomicrobubbles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *161*, 200–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Abou-Elkacem, L.; Bachawal, S.V.; Willmann, J.K. Ultrasound molecular imaging: Moving toward clinical translation. *Eur. J. Radiol.* **2015**, *84*, 1685–1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Smeenge, M.; Tranquart, F.; Mannaerts, C.K.; de Reijke, T.M.; van de Vijver, M.J.; Laguna, M.P.; Pochon, S.; de la Rosette, J.; Wijkstra, H. First-in-Human Ultrasound Molecular Imaging With a VEGFR2-Specific Ultrasound Molecular Contrast Agent (BR55) in Prostate Cancer: A Safety and Feasibility Pilot Study. *Investig. Radiol.* **2017**, *52*, 419–427. [[CrossRef](#)]
105. Willmann, J.K.; Bonomo, L.; Testa, A.C.; Rinaldi, P.; Rindi, G.; Valluru, K.S.; Petrone, G.; Martini, M.; Lutz, A.M.; Gambhir, S.S. Ultrasound Molecular Imaging With BR55 in Patients With Breast and Ovarian Lesions: First-in-Human Results. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 2133–2140. [[CrossRef](#)]
106. Chong, W.K.; Papadopoulou, V.; Dayton, P.A. Imaging with ultrasound contrast agents: Current status and future. *Abdom. Radiol. (NY)* **2018**, *43*, 762–772. [[CrossRef](#)]
107. Ferrara, K.W.; Borden, M.A.; Zhang, H. Lipid-shelled vehicles: Engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 881–892. [[CrossRef](#)]
108. Shi, G.; Cui, W.; Mukthavaram, R.; Liu, Y.T.; Simberg, D. Binding and isolation of tumor cells in biological media with perfluorocarbon microbubbles. *Methods* **2013**, *64*, 102–107. [[CrossRef](#)]
109. Shi, G.X.; Cui, W.J.; Benchimol, M.; Liu, Y.T.; Mattrey, R.F.; Mukthavaram, R.; Kesari, S.; Esener, S.C.; Simberg, D. Isolation of Rare Tumor Cells from Blood Cells with Buoyant Immuno-Microbubbles. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)]
110. Hernot, S.; Klibanov, A.L. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1153–1166. [[CrossRef](#)]
111. Jain, A.; Tiwari, A.; Verma, A.; Jain, S.K. Ultrasound-based triggered drug delivery to tumors. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2018**, *8*, 150–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Unger, E.C.; Porter, T.; Culp, W.; Labell, R.; Matsunaga, T.; Zutshi, R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1291–1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Aw, M.S.; Paniwnyk, L.; Losic, D. The progressive role of acoustic cavitation for non-invasive therapies, contrast imaging and blood-tumor permeability enhancement. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 1383–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Song, K.H.; Harvey, B.K.; Borden, M.A. State-of-the-art of microbubble-assisted blood-brain barrier disruption. *Theranostics* **2018**, *8*, 4393–4408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Simberg, D.; Mattrey, R. Targeting of perfluorocarbon microbubbles to selective populations of circulating blood cells. *J. Drug Target* **2009**, *17*, 392–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Hsu, C.H.; Chen, C.; Irimia, D.; Toner, M. Isolating cells from blood using buoyancy activated cell sorting (BACS) with glass microbubbles. In Proceedings of the 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen, The Netherlands, 3–7 October 2010.
117. Cristofanilli, M.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M.C.; Reuben, J.M.; Doyle, G.V.; Allard, W.J.; Terstappen, L.W.M.M.; et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 781–791. [[CrossRef](#)]
118. Liou, Y.R.; Wang, Y.H.; Lee, C.Y.; Li, P.C. Buoyancy-activated cell sorting using targeted biotinylated albumin microbubbles. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125036. [[CrossRef](#)]
119. Zhu, L.; Cheng, G.; Ye, D.; Nazeri, A.; Yue, Y.; Liu, W.; Wang, X.; Dunn, G.P.; Petti, A.A.; Leuthardt, E.C.; et al. Focused Ultrasound-enabled Brain Tumor Liquid Biopsy. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6553. [[CrossRef](#)]

120. Schmitz, B.; Radbruch, A.; Kummel, T.; Wickenhauser, C.; Korb, H.; Hansmann, M.L.; Thiele, J.; Fischer, R. Magnetic activated cell sorting (MACS)—A new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: Comparison of different separation techniques. *Eur. J. Haematol.* **1994**, *52*, 267–275. [\[CrossRef\]](#)
121. Macey, M.G. Flow cytometry: Principles and clinical applications. *Med. Lab Sci.* **1988**, *45*, 165–173. [\[PubMed\]](#)
122. Bianchi, D.W.; Klinger, K.W.; Vadnais, T.J.; Demaria, M.A.; Shuber, A.P.; Skoletsky, J.; Midura, P.; Diriso, M.; Pelletier, C.; Genova, M.; et al. Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat. Diagn.* **1996**, *16*, 289–298. [\[CrossRef\]](#)
123. Vankooten, T.G.; Schakenraad, J.M.; Vandermei, H.C.; Dekker, A.; Kirkpatrick, C.J.; Busscher, H.J. Fluid Shear-Induced Endothelial-Cell Detachment from Glass—Influence of Adhesion Time and Shear-Stress. *Med. Eng. Phys.* **1994**, *16*, 506–512. [\[CrossRef\]](#)
124. Wu, J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *J. Biotechnol.* **1995**, *43*, 81–94. [\[CrossRef\]](#)
125. Krivacic, R.T.; Ladanyi, A.; Curry, D.N.; Hsieh, H.B.; Kuhn, P.; Bergsrud, D.E.; Kepros, J.F.; Barbera, T.; Ho, M.Y.; Chen, L.B.; et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10501–10504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Kraeft, S.K.; Ladanyi, A.; Galiger, K.; Herlitz, A.; Sher, A.C.; Bergsrud, D.E.; Even, G.; Brunelle, S.; Harris, L.; Salgia, R.; et al. Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3020–3028. [\[CrossRef\]](#)
127. Bauer, K.D.; de la Torre-Bueno, J.; Diel, I.J.; Hawes, D.; Decker, W.J.; Priddy, C.; Bossy, B.; Ludmann, S.; Yamamoto, K.; Masih, A.S.; et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3552–3559.
128. Owen, J.; Crake, C.; Lee, J.Y.; Carugo, D.; Beguin, E.; Khrapitchev, A.A.; Browning, R.J.; Sibson, N.; Stride, E. A versatile method for the preparation of particle-loaded microbubbles for multimodality imaging and targeted drug delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2018**, *8*, 342–356. [\[CrossRef\]](#)
129. Park, J.I.; Jagadeesan, D.; Williams, R.; Oakden, W.; Chung, S.; Stanis, G.J.; Kumacheva, E. Microbubbles loaded with nanoparticles: A route to multiple imaging modalities. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6579–6586. [\[CrossRef\]](#)
130. Jin, B.; Lin, M.; Zong, Y.; Wan, M.; Xu, F.; Duan, Z.; Lu, T. Microbubble embedded with upconversion nanoparticles as a bimodal contrast agent for fluorescence and ultrasound imaging. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 345601. [\[CrossRef\]](#)
131. Dong, Z.; Yu, D.; Liu, Q.; Ding, Z.; Lyons, V.J.; Bright, R.K.; Pappas, D.; Liu, X.; Li, W. Enhanced capture and release of circulating tumor cells using hollow glass microspheres with a nanostructured surface. *Nanoscale* **2018**, *10*, 16795–16804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
132. Wei, Y.; Liao, R.; Mahmood, A.A.; Xu, H.; Zhou, Q. pH-responsive pHLIP (pH low insertion peptide) nanoclusters of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a tumor-selective MRI contrast agent. *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 194–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Jalani, G.; Jeyachandran, D.; Bertram Church, R.; Cerruti, M. Graphene oxide-stabilized perfluorocarbon emulsions for controlled oxygen delivery. *Nanoscale* **2017**, *9*, 10161–10166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Justeau, C.; Vela-Gonzalez, A.V.; Jourdan, A.; Riess, J.G.; Krafft, M.P. Adsorption of Cerium Salts and Cerium Oxide Nanoparticles on Microbubbles Can Be Induced by a Fluorocarbon Gas. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 11450–11456. [\[CrossRef\]](#)
135. McLaughlan, J.R.; Harput, S.; Abou-Saleh, R.H.; Peyman, S.A.; Evans, S.; Freear, S. Characterisation of Liposome-Loaded Microbubble Populations for Subharmonic Imaging. *Ultrasound Med. Biol.* **2017**, *43*, 346–356. [\[CrossRef\]](#)
136. Shi, D.; Wallyn, J.; Nguyen, D.-V.; Perton, F.; Felder-Flesch, D.; Bégin-Colin, S.; Maaloum, M.; Krafft, M.P. Microbubbles decorated with dendronized magnetic nanoparticles for biomedical imaging. Effective stabilization via fluororous interactions. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2019**, *10*, 2103–2115. [\[CrossRef\]](#)
137. Qian, W.; Zhang, Y.; Chen, W. Capturing Cancer: Emerging Microfluidic Technologies for the Capture and Characterization of Circulating Tumor Cells. *Small* **2015**, *11*, 3850–3872. [\[CrossRef\]](#)
138. Jackson, J.M.; Witek, M.A.; Kamande, J.W.; Soper, S.A. Materials and microfluidics: Enabling the efficient isolation and analysis of circulating tumour cells. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4245–4280. [\[CrossRef\]](#)
139. Li, P.; Stratton, Z.S.; Dao, M.; Ritz, J.; Huang, T.J. Probing circulating tumor cells in microfluidics. *Lab Chip* **2013**, *13*, 602–609. [\[CrossRef\]](#)

140. Hoshino, K.; Huang, Y.Y.; Lane, N.; Huebschman, M.; Uhr, J.W.; Frenkel, E.P.; Zhang, X. Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip* **2011**, *11*, 3449–3457. [[CrossRef](#)]
141. Huang, Y.Y.; Hoshino, K.; Chen, P.; Wu, C.H.; Lane, N.; Huebschman, M.; Liu, H.; Sokolov, K.; Uhr, J.W.; Frenkel, E.P.; et al. Immunomagnetic nanoscreening of circulating tumor cells with a motion controlled microfluidic system. *Biomed. Microdevices* **2013**, *15*, 673–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Issadore, D.; Chung, J.; Shao, H.; Liong, M.; Ghazani, A.A.; Castro, C.M.; Weissleder, R.; Lee, H. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 141–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Nagrath, S.; Sequist, L.V.; Maheswaran, S.; Bell, D.W.; Irimia, D.; Ulkus, L.; Smith, M.R.; Kwak, E.L.; Digumarthy, S.; Muzikansky, A.; et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **2007**, *450*, 1235–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Stott, S.L.; Hsu, C.H.; Tsukrov, D.I.; Yu, M.; Miyamoto, D.T.; Waltman, B.A.; Rothenberg, S.M.; Shah, A.M.; Smas, M.E.; Korir, G.K.; et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18392–18397. [[CrossRef](#)]
145. McCarley, R.L.; Vaidya, B.; Wei, S.; Smith, A.F.; Patel, A.B.; Feng, J.; Murphy, M.C.; Soper, S.A. Resist-free patterning of surface architectures in polymer-based microanalytical devices. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 842–843. [[CrossRef](#)]
146. Adams, A.A.; Okagbare, P.I.; Feng, J.; Hupert, M.L.; Patterson, D.; Gottert, J.; McCarley, R.L.; Nikitopoulos, D.; Murphy, M.C.; Soper, S.A. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8633–8641. [[CrossRef](#)]
147. Wang, Y.; Zhao, Q.; Han, N.; Bai, L.; Li, J.; Liu, J.; Che, E.; Hu, L.; Zhang, Q.; Jiang, T.; et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 313–327. [[CrossRef](#)]
148. Gao, Y.; Gu, S.; Zhang, Y.; Xie, X.; Yu, T.; Lu, Y.; Zhu, Y.; Chen, W.; Zhang, H.; Dong, H.; et al. The Architecture and Function of Monoclonal Antibody-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Mifepristone: Repurposing Abortifacient for Cancer Metastatic Chemoprevention. *Small* **2016**, *12*, 2595–2608. [[CrossRef](#)]
149. Mahapatro, A.; Singh, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 55. [[CrossRef](#)]
150. Peppas, N.A. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 5–9. [[CrossRef](#)]
151. Croy, S.R.; Kwon, G.S. Polymeric micelles for drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4669–4684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Jeong, B.; Bae, Y.H.; Lee, D.S.; Kim, S.W. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* **1997**, *388*, 860–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Patri, A.K.; Majoros, I.J.; Baker, J.R. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 466–471. [[CrossRef](#)]
154. Gaucher, G.; Dufresne, M.H.; Sant, V.P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J.C. Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Control Release* **2005**, *109*, 169–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Langer, R.; Folkman, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* **1976**, *263*, 797–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Sadat Tabatabaei Mirakabad, F.; Nejati-Koshki, K.; Akbarzadeh, A.; Yamchi, M.R.; Milani, M.; Zarghami, N.; Zeighamian, V.; Rahimzadeh, A.; Alimohammadi, S.; Hanifehpour, Y.; et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 517–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Jain, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475–2490. [[CrossRef](#)]
158. Lu, J.M.; Wang, X.; Marin-Muller, C.; Wang, H.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *9*, 325–341. [[CrossRef](#)]
159. Studer, M.; Briel, M.; Leimenstoll, B.; Glass, T.R.; Bucher, H.C. Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: A systematic review. *Arch. Intern. Med.* **2005**, *165*, 725–730. [[CrossRef](#)]
160. Wickline, S.A.; Neubauer, A.M.; Winter, P.M.; Caruthers, S.D.; Lanza, G.M. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles. *J. Magn. Reson. Imaging* **2007**, *25*, 667–680. [[CrossRef](#)]

161. Trivedi, R.; Kompella, U.B. Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: Strategies and underlying principles. *Nanomedicine (Lond)* **2010**, *5*, 485–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Venkatraman, S.S.; Jie, P.; Min, F.; Freddy, B.Y.; Leong-Huat, G. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 219–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Bisht, S.; Maitra, A. Dextran-doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 415–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Ye, Y.Q.; Yang, F.L.; Hu, F.Q.; Du, Y.Z.; Yuan, H.; Yu, H.Y. Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin. *Int. J. Pharm.* **2008**, *352*, 294–301. [[CrossRef](#)]
165. Deng, S.; Wu, Q.; Zhao, Y.; Zheng, X.; Wu, N.; Pang, J.; Li, X.; Bi, C.; Liu, X.; Yang, L.; et al. Biodegradable polymeric micelle-encapsulated doxorubicin suppresses tumor metastasis by killing circulating tumor cells. *Nanoscale* **2015**, *7*, 5270–5280. [[CrossRef](#)]
166. Yao, J.; Feng, J.; Gao, X.; Wei, D.; Kang, T.; Zhu, Q.; Jiang, T.; Wei, X.; Chen, J. Neovasculature and circulating tumor cells dual-targeting nanoparticles for the treatment of the highly-invasive breast cancer. *Biomaterials* **2017**, *113*, 1–17. [[CrossRef](#)]
167. Gener, P.; Montero, S.; Xandri-Monje, H.; Diaz-Riascos, Z.V.; Rafael, D.; Andrade, F.; Martinez-Trucharte, F.; Gonzalez, P.; Seras-Franzoso, J.; Manzano, A.; et al. Zileuton loaded in polymer micelles effectively reduce breast cancer circulating tumor cells and intratumoral cancer stem cells. *Nanomedicine* **2019**, *24*, 102106. [[CrossRef](#)]
168. Medina, S.H.; El-Sayed, M.E. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3141–3157. [[CrossRef](#)]
169. Xie, J.; Dong, H.; Chen, H.; Zhao, R.; Sinko, P.J.; Shen, W.; Wang, J.; Lu, Y.; Yang, X.; Xie, F.; et al. Exploring cancer metastasis prevention strategy: Interrupting adhesion of cancer cells to vascular endothelia of potential metastatic tissues by antibody-coated nanomaterial. *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13*, 9. [[CrossRef](#)]
170. Xie, J.; Gao, Y.; Zhao, R.; Sinko, P.J.; Gu, S.; Wang, J.; Li, Y.; Lu, Y.; Yu, S.; Wang, L.; et al. Ex vivo and in vivo capture and deactivation of circulating tumor cells by dual-antibody-coated nanomaterials. *J. Control Release* **2015**, *209*, 159–169. [[CrossRef](#)]
171. Xie, J.; Zhao, R.; Gu, S.; Dong, H.; Wang, J.; Lu, Y.; Sinko, P.J.; Yu, T.; Xie, F.; Wang, L.; et al. The architecture and biological function of dual antibody-coated dendrimers: Enhanced control of circulating tumor cells and their hetero-adhesion to endothelial cells for metastasis prevention. *Theranostics* **2014**, *4*, 1250–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Brandl, A.; Wagner, T.; Uhlig, K.M.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H.; Melchior, F.; Schneider, G.; Heinzl, T.; Kramer, O.H. Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress. *J. Mol. Cell Biol.* **2012**, *4*, 284–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Dong, H.; Han, L.; Wu, Z.-S.; Zhang, T.; Xie, J.; Ma, J.; Wang, J.; Li, T.; Gao, Y.; Shao, J.; et al. Biostable Aptamer Rings Conjugated for Targeting Two Biomarkers on Circulating Tumor Cells in Vivo with Great Precision. *Chem. Mater.* **2017**, *24*, 10312–10325. [[CrossRef](#)]
174. Zheng, F.; Cheng, Y.; Wang, J.; Lu, J.; Zhang, B.; Zhao, Y.; Gu, Z. Aptamer-functionalized barcode particles for the capture and detection of multiple types of circulating tumor cells. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 7333–7338. [[CrossRef](#)]
175. Wood, A.K.; Sehgal, C.M. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy. *Ultrasound Med. Biol.* **2015**, *41*, 905–928. [[CrossRef](#)]
176. Heath, C.H.; Sorace, A.; Knowles, J.; Rosenthal, E.; Hoyt, K. Microbubble therapy enhances anti-tumor properties of cisplatin and cetuximab in vitro and in vivo. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2012**, *146*, 938–945. [[CrossRef](#)]
177. Burgess, A.; Hynynen, K. Drug delivery across the blood-brain barrier using focused ultrasound. *Expert Opin. Drug. Deliv.* **2014**, *11*, 711–721. [[CrossRef](#)]
178. Mayer, C.R.; Geis, N.A.; Katus, H.A.; Bekerredjian, R. Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 1121–1138. [[CrossRef](#)]
179. Liu, Y.; Miyoshi, H.; Nakamura, M. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery. *J. Control Release* **2006**, *114*, 89–99. [[CrossRef](#)]
180. Stride, E.P.; Coussios, C.C. Cavitation and contrast: The use of bubbles in ultrasound imaging and therapy. *Proc. Inst. Mech. Eng. H* **2010**, *224*, 171–191. [[CrossRef](#)]

181. Zhao, Y.Z.; Du, L.N.; Lu, C.T.; Jin, Y.G.; Ge, S.P. Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 1621–1633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Zheng, Y.; Zhang, Y.; Ao, M.; Zhang, P.; Zhang, H.; Li, P.; Qing, L.; Wang, Z.; Ran, H. Hematoporphyrin encapsulated PLGA microbubble for contrast enhanced ultrasound imaging and sonodynamic therapy. *J. Microencapsul.* **2012**, *29*, 437–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Misik, V.; Riesz, P. Free radical intermediates in sonodynamic therapy. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2000**, *899*, 335–348. [[CrossRef](#)]
184. Kuroki, M.; Hachimine, K.; Abe, H.; Shibaguchi, H.; Kuroki, M.; Maekawa, S.; Yanagisawa, J.; Kinugasa, T.; Tanaka, T.; Yamashita, Y. Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 3673–3677. [[PubMed](#)]
185. McEwan, C.; Fowley, C.; Nomikou, N.; McCaughan, B.; McHale, A.P.; Callan, J.F. Polymeric microbubbles as delivery vehicles for sensitizers in sonodynamic therapy. *Langmuir* **2014**, *30*, 14926–14930. [[CrossRef](#)]
186. McEwan, C.; Kamila, S.; Owen, J.; Nesbitt, H.; Callan, B.; Borden, M.; Nomikou, N.; Hamoudi, R.A.; Taylor, M.A.; Stride, E.; et al. Combined sonodynamic and antimetabolite therapy for the improved treatment of pancreatic cancer using oxygen loaded microbubbles as a delivery vehicle. *Biomaterials* **2016**, *80*, 20–32. [[CrossRef](#)]
187. McEwan, C.; Owen, J.; Stride, E.; Fowley, C.; Nesbitt, H.; Cochrane, D.; Coussios, C.C.; Borden, M.; Nomikou, N.; McHale, A.P.; et al. Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours. *J. Control Release* **2015**, *203*, 51–56. [[CrossRef](#)]
188. Levenback, B.J.; Sehgal, C.M.; Wood, A.K. Modeling of thermal effects in antivasular ultrasound therapy. *J. Acoust. Soc. Am.* **2012**, *131*, 540–549. [[CrossRef](#)]
189. Geers, B.; De Wever, O.; Demeester, J.; Bracke, M.; De Smedt, S.C.; Lentacker, I. Targeted liposome-loaded microbubbles for cell-specific ultrasound-triggered drug delivery. *Small* **2013**, *9*, 4027–4035. [[CrossRef](#)]
190. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine* **2013**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ARF	alternate reading frame protein
BSA	Rinderserumalbumin, engl. Bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CK	Cytokeratin
cs	cleavage site
CS1	cleavage site 1 (Schnittstelle 1)
CS2	cleavage site 2 (Schnittstelle 2)
CSC	cancer stem cell
CTC	Zirkulierende Tumorzellen, engl. <i>circulating tumor cells</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial mesenchymal transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
et al.	Und andere, lat. et alii

FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FDA	US Food and Drug Administration
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein, engl. <i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HIV	humanen Immundefizienz-Virus
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	humane Papillomviren
IMC	invasion-metastasis cascade
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilodalton
l	Liter
M	molar (Mol pro Liter)
m	Milli-
MET	Mesenchymal Epithelial Transition
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLL	Mixed Lineage Leukemia
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukläres Lokalisationssignal
NPM1	Nucleophosmin1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>

PFA	Para-Formaldehyd
pH	negative dekadischer Logarithmus der $[H^+]$ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodiumdodecylsulfate
SMNPs	superparamagnetische Nanopartikel
Tab.	Tabelle
TAD	transkriptionelle Transaktionsdomäne
TAE	Tris-Acetate-EDTA Puffer
Taspase1	Threonin Aspartase 1
TBP	TATA-Bindeprotein
TEMED	N,N'-tetramethyl-ethylene-diamine
TFIIA	Transkriptionsfaktor 2A
TRD	transkriptionelle Repressionsdomäne
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
trx	trithorax
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
WHO	world health organization
wt	wildtype
z.B.	zum Beispiel

Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den 24.02.2025

9. Curriculum Vitae

Curriculum Vitae

Alena Leunov (geb. Gribko)

*02.01.1989

55270 Klein-Winternheim



Als Leiterin der wissenschaftlichen und Unternehmenskommunikation bei der GBG kombiniere ich Fachwissen im medizinischen Schreiben mit Unternehmens-kommunikation sowie starken zwischenmenschlichen und Führungsfähigkeiten. Mit meiner Fähigkeit, komplexe wissenschaftliche Konzepte in klare, prägnante Inhalte zu verwandeln, erstelle ich erfolgreich regulatorische Dokumente, Forschungs-arbeiten und medizinische Schulungsmaterialien. Meine exzellenten Kommunikations- und Teamfähigkeiten ermöglichen eine effektive Zusammenarbeit, während mein lösungsorientiertes Denken den reibungslosen Ablauf von Projekten sicherstellt. Ich bin anpassungsfähig, detailorientiert und besitze ausgeprägte organisatorische Fähigkeiten, die entscheidend für das Management wissenschaftlicher Projekte, die Optimierung interner Prozesse und die Steigerung der Unternehmenssichtbarkeit sind.

Berufserfahrung

seit 05/2024

Lead Scientific and Corporate Communication

German Breast Group (GBG) GmbH, Neu-Isenburg

seit 09/2022

Scientific Advisor/ Medical Writer

German Breast Group (GBG) GmbH, Neu-Isenburg

Erziehungszeit

Erziehungszeit 13.01.2020 – 19.09.2022

von 2 Kindern (*13.01.2020 und *19.11.2021)

seit 09/2016

Doktorandin mit angestrebter Promotion (Dr.rer.nat)

Molekulare und Zelluläre Onkologie, HNO-Klinik, Universitätsmedizin Mainz

Titel: „Funktionelle Analyse der pathobiologisch relevanten Taspase1-NPM1-Interaktion“

Schul- und Hochschulausbildung

04/2014 – 07/2016

Master of Science in Molekularer Anthropologie (1,6)

Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Titel: „Effekt des MTH1 Inhibitors TH588 auf die Sensitivität von Glioblastom- und Mammakarzinom-Zellen gegenüber klinisch relevanten Zytostatika“

Institut für Toxikologie, Universitätsmedizin Mainz

04/2010 – 06/2013

Bachelor of Science in Ecological Impact Assessment/BioGeoWissenschaften

Universität Koblenz-Landau, Koblenz

Titel: „Vorratsschädlinge im Haushalt“

AG Zoologie, Fachbereich Biologie, Universität Koblenz-Landau, Koblenz

Weiterbildung

Wissenschaftlich

GCP-Update-Kurs

für Prüfer und Studienpersonal in klinischen Prüfungen

Winicker Norimed

» Zertifizierung, 4,5-stündiger Kurs

Sicherheit in der Gentechnik

Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

» anerkannt nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3

Praktischer Histologie Kurs

Institut für Molekulare Biologie, Mainz

» Zertifizierung, 20-stündiger Kurs

Praktischer Kurs: Bildbearbeitung und Analyse

Institut für Molekulare Biologie, Mainz

» Zertifizierung, 17-stündiger Kurs

Teilnahme an Seminaren und Veranstaltungen

Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

» 04/2013 – 09/2013

» Schwerpunkt: Kognitive Neurobiologie, Tierethik in Theorie und Praxis

Mitgliedschaften

EMWA (European Medical Writer Association), Mitglied seit April 2023

Kenntnisse

Sprachen

» Deutsch	■	■	■	■	■
» Russisch	■	■	■	■	■
» Englisch	■	■	■	■	■
» Französisch	■	■	■	■	■

Software

» MS Office	■	■	■	■	■
» Endnote	■	■	■	■	■
» Canvas	■	■	■	■	■
» CMS	■	■	■	■	■
» Design - Canva	■	■	■	■	■
» Axio Vision	■	■	■	■	■
» GraphPad Prism	■	■	■	■	■
» Fiji (ImageJ2)	■	■	■	■	■
» <i>in-silico</i> -tools (BioEdit, SnapGene, Image Lab, etc.)					

Laborbereich

Geräte

- » Hochdurchsatzmikroskopie: Cellomics Array Scan
- » Multimode-Mikroplatten Reader: Tecan Spark
- » Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie: FACS
- » Fluoreszenz-basierte Mikroskopie mit Live Cell Imaging
- » Mikroinjektionseinheit
- » Pipettierroboter

Methodiken

- » Zellkultur (IHC, Herstellung von stabilen Zelllinien, Protein knock-down, Toxizitätsstudien, Proliferations-Analyse-Systeme, Zellzyklus-Analyse, Transfektion, Bestrahlung)
- » Isolation von zirkulierenden Tumorzellen und Exosomen aus Patientenproben (Blut)
- » Protein Biochemie (Herstellung von Rekombinanten Proteinen, funktionelle *in-vitro* Assays, Interaktionsstudien mit coIP/GST-pull-down etc., Western-Blotting)
- » Molekulare Biologie (DNA-/RNA- Isolation, Klonierung, Vektor-Design, Mutagenese)
- » Lumineszenzbasierte Assay Systeme (Luciferase, MTT)
- » Fluoreszenzbasierte Mikroskopie (Lokalisations-Studien, *in-vitro* imaging, γ -H2AX, live-cell-Mikroinjektion, Comet-Assay, Zelltod Assay Systeme)
- » NGS mit biostatistischer Datenanalyse (SeqMan, FaBox, Excel, Textpad, Arlequin)
- » Chromosomendiagnostik mit Chromosomenbänderungsverfahren

Laborbereich

Kooperationsprojekt mit Fraunhofer Institut Mainz

- » Testung der entwickelten CTCelect IMS Unit zur Detektion und Isolation von Zirkulierenden Tumorzellen (Testung mit Blut von Klinikspatienten)
- » Überprüfung auf die Anwendungsmöglichkeit im Klinikalltag, Validierung des Systems, Optimierung der Protokolle
- » Optimierung der Detektionsmethodik (Immunfluoreszenz)

Publikationen

1. **Gribko, A.**, Stiefel, J., Liebetanz, L., Nagel, S.M., Künzel, J., Wandrey, M., Hagemann, J., Stauber, R.H., Freese, C., Gül, D. (2021). IsoMAG-An Automated System for the Immunomagnetic Isolation of Squamous Cell Carcinoma-Derived Circulating Tumor Cells. *Diagnostics* (Basel). 4;11(11):2040.
2. Siemer, S., Wunsch, D., Khamis, A., Lu, Q., Scherberich, A., Filippi, M., Krafft, M.P., Hagemann, J., Weiss, C., Ding, G.B., Stauber, R., **Gribko, A.** (2020). Nano meets Micro- Translational nanotechnology in medicine: Nano-based applications for early tumor detection and therapy. *Nanomaterials* (Basel). 10.
3. **Gribko, A.**, Kunzel, J., Wunsch, D., Lu, Q., Nagel, S.M., Knauer, S.K., Stauber, R. and Ding, G.B. (2019). Is Small Smarter? - Nanomaterial-Based Detection and Elimination of Circulating Tumor Cells - Current Knowledge and Perspectives. *Int J Nanomedicine*. 14, 4187-4209.
4. Kunzel, J., **Gribko, A.**, Lu, Q., Stauber, R. and Wunsch, D. (2019). Nanomedical detection and downstream analysis of circulating tumor cells in head and neck patients. *Biol Chem*. 400, 1465-1479.
5. Heinrich, U.R., Schmidtman, I., Meuser R., Ernst, B.P., Wünsch, D., Siemer, S., **Gribko, A.**, Stauber, R.H., Strieth, S. (2019). Early Alterations of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Patterns in the Guinea Pig Cochlea After Noise Exposure. *J Histochem Cytochem*. 67(11):845-855.
6. **Gribko, A.**, Hahlbrock, A., Strieth, S., Becker, S., Hagemann, J., Deichelbohrer, M., Hildebrandt, A., Habtemichael, N., ... Wünsch, D. (2017). Disease-relevant signalling-pathways in head and neck cancer: Taspase1's proteolytic activity fine-tunes TFIIA function. *Scientific reports*, 7(1), 14937.
7. Beltz, A., Gösswein, D., Zimmer, S., Limburg, I., Wünsch, D., **Gribko, A.**, Deichelbohrer, M., Hagemann, J., Stauber, R. H., Künzel, J. (2019). Staging of oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck: Prognostic features and power of the 8th edition of the UICC staging manual. *Eur J Surg Oncol*. pii: S0748-7983(19)30305-1.