

**Entwicklung von organo-typischen
In vitro-Kultursystemen des kolorektalen
Karzinoms und einer auf ihnen
basierenden multi-funktionellen
Medikamententestplattform**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg;
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften;
Department Chemie

vorgelegt von

Annika Sprüssel

Hamburg 2009

Die Promotionsarbeit wurde in Absprache mit dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg von Januar 2004 bis Oktober 2008 in der Firma Indivumed GmbH durchgeführt.

Das vorliegende Dissertationsthema wurde dort von Juni 2005 bis Oktober 2008 bearbeitet.

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Bredehorst
2. PD Dr. Kerstin David

Datum der Disputation: 02.10.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Kolorektales Karzinom und Behandlung.....	1
1.2 Medikamente in der Therapie von Karzinomen.....	2
1.3 Individuelle Therapie.....	4
1.4 Medikamententests.....	5
1.4.1 <i>In vitro</i> -Kultursysteme für präklinische Studien.....	6
1.4.2 Parameter für Medikamententests.....	8
1.5 Infrastrukturen der Firma Indivumed GmbH.....	9
1.6 Aufgabenstellung	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Material	11
2.1.1 Gewebe.....	11
2.1.2 Zelllinie HT29.....	11
2.1.3 Chemikalien.....	11
2.1.4 Chemotherapeutika und andere therapeutische Substanzen.....	11
2.1.5 Antikörper und Konjugate	13
2.1.6 Primer für die cDNA-Synthese.....	14
2.1.7 TaqMan [®] -Proben und -Primer für Real-time PCR	14
2.1.8 Enzyme	15
2.1.9 Kits	16
2.1.10 Geräte	17
2.1.11 Plastikmaterial	19
2.2 Gefahrstoffliste.....	20
2.3 Methoden.....	23
2.3.1 Probenentnahme von Gewebe.....	23
2.3.2 <i>In vitro</i> -Kulturmethoden	23
2.3.2.1 Herstellung und Kultivierung von Gewebeschnitten aus kolorektalem Adenokarzinom	23
2.3.2.2 Kultivieren der Zelllinie HT29.....	24
2.3.2.3 Herstellung und Kultivierung von primären Zellen aus kolorektalem Adenokarzinom	25
2.3.2.4 Herstellung von Sphäroiden	25
2.3.2.5 Collagen-Beschichtung von Kulturoberflächen.....	26
2.3.2.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	26
2.3.2.7 Behandlung mit Chemotherapeutika und anderen therapeutischen Substanzen.....	26
2.3.2.8 BrdU-Inkorporation zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellkulturen.....	27
2.3.2.9 Diffusionsanalysen an Gewebeschnitten.....	27

2.3.3	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.3.3.2	cDNA-Synthese	28
2.3.3.3	cRNA-Synthese	29
2.3.3.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren	29
2.3.3.5	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren.....	30
2.3.3.6	Qualitätskontrolle der RNA / cRNA-Qualität mittels Agilent-Chips ...	31
2.3.3.7	Real-time PCR.....	31
2.3.3.8	Microarray.....	33
2.3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.3.4.1	Extraktion von Proteinen.....	34
2.3.4.2	Proteinkonzentrationsmessung mittels BCA-Assay	35
2.3.4.3	Messung des ATP-Gehaltes	35
2.3.4.4	Messung des Gehaltes von aktiver Caspase 3/7	36
2.3.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.3.4.6	Western Blot	37
2.3.4.7	Immunprinting von Western Blots	37
2.3.4.8	Multi-funktioneller ELISA.....	38
2.3.4.9	Durchflusszytometrie	39
2.3.4.10	Histologie	39
2.3.4.11	Mikroskopie / Aufnahmen von Zellen und Gewebeschnitten	42
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Etablierung von <i>In vitro</i> -Kultursystemen für kolorektale Tumore	45
3.1.1	Passagenvergleiche der Langzeit-Kultur A413	46
3.1.2	Etablierung weiterer kolorektaler <i>In vitro</i> -Kulturen	49
3.1.2.1	Primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur	49
3.1.2.2	Etablierung dreidimensionaler organoider Kulturen	55
3.1.3	Genexpressionsanalysen von Kurzzeit-Kultur primärer Zellen und Gewebeschnitten	64
3.1.3.1	Vergleich der primären Zellen, Gewebeschnitte und der Zelllinie HT29.....	64
3.1.3.2	Vergleich der primären Zellen und Gewebeschnitte in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe	68
3.2	Etablierung und Evaluierung einer multi-funktionellen Medikamententestplattform	72
3.2.1	Etablierung der Medikamententestplattform.....	73
3.2.1.1	Auswahl der Messmethoden.....	73
3.2.1.2	Auswahl der Medikamente und Verknüpfung der Messmethoden...	78
3.2.1.3	Durchführung der Medikamententestplattform zur Etablierung.....	83
3.2.2	Evaluierung der Medikamententestplattform.....	88
3.3	Anwendung der Medikamententestplattform	93
3.3.1	Verwendung von Tumorgewebe von 28 Patienten	93
3.3.1.1	Vergleich der klinische Daten	94

3.3.1.2	Molekulare Gewebecharakteristika des konservierten Referenzgewebes	96
3.3.2	Durchführung der Medikamententestplattform	99
3.3.2.1	Auswertung und Klassifizierungsanalyse der FOLFOX-Reaktionen	99
3.3.2.2	Korrelationsanalysen	101
4	Diskussion	103
4.1	Etablierung von <i>In vitro</i> -Kultursystemen für kolorektale Tumore	103
4.2	Etablierung und Evaluierung einer multi-funktionellen Medikamententestplattform	113
4.3	Anwendung der Medikamententestplattform	120
4.4	Schlussbetrachtung und Ausblick	123
5	Zusammenfassung	125
6	Summary	127
7	Referenzen	129
8	Veröffentlichungen	151
	Danksagung	153
	Lebenslauf	155
	Eidesstattliche Erklärung	157

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)
5-FU	5-Fluorouracil
AKT (Genbezeichnung)	Akt (<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase 1-3</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CDKN1A (Genbezeichnung)	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i> (<u>p21</u> , Cip1)
CDKN1B (Genbezeichnung)	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> (<u>p27</u> , Kip1)
cDNA	komplementäre DNA
CEA / CEACAM5 (Genbezeichnung)	Karzinoembryonales Antigen (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
clv.	<i>cleaved</i> = gespalten (bei PARP und Caspase 3)
cRNA	komplementäre RNA
Ct	<i>cycle of threshold</i> (Zyklus, an dem der Schwellenwert der PCR überschritten wird)
CTNNB1 (Genbezeichnung)	Catenin β 1
CTP	Cytidine-5'-triphosphat
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 5
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
D-MEM	Dulbecco's MEM (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)

dNTP	Ribonukleosidtriphosphat (<i>desoxyribonucleoside triphosphate</i>)
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dT	2'-Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR / <i>EGFR</i> (Genbezeichnung)	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
<i>ERBB2</i> (Genbezeichnung)	<i>tyrosine kinase-type cell surface receptor HER2</i>
ERK 1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
F12	<i>nutrient mixture F-12</i> (Zellkulturmedium)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fam	Fluoreszein (mit Tamra (=Rhodamin) als Quencher)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
<i>FLT4</i> (Genbezeichnung)	VEGF-Rezeptor 3
FOLFOX	Kombination aus 5-Fluorouracil, Leucovorin und Oxaliplatin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gem	Gemcitabin
GO	Genontologie
GOLF	Kombination aus Gemcitabin und FOLFOX
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>HIF1A</i> (Genbezeichnung)	Hypoxia-induzierbarer Faktor 1a (<i>hypoxia inducible factor 1α</i>) (HIF-1 α)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp90	Hitzeschockprotein 90 (<i>heat shock protein 90</i>)
<i>HSPA1A/B</i> (Genbezeichnung)	Hitzeschock-70kDa-Protein 1A / 1B (<i>heat shock 70kDa protein 1A / 1B</i>)
Hz	Hertz [$1/s$]

IFOX	Kombination aus Iressa [®] und FOLFOX
IHC	Immunhistochemie
<i>IL18</i> (Genbezeichnung)	Interleukin 18
<i>IL8</i> (Genbezeichnung)	Interleukin 8
IVT	<i>In vitro</i> -Transkription
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KHB	Krebs-Henseleit Puffer
Kontr.	Kontrolle
L	Leucovorin
LSAB	<i>labelled streptavidin-biotin</i>
M	molar [mol/Liter]
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<i>MAPK1</i> (Genbezeichnung)	s. ERK 1/2
MEK 1/2	MAPK-Kinase/ERK-Kinase 1/2
MEM	<i>modified eagle medium</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MSD	Meso Scale Discovery (Firma)
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MW	Mittelwert
NSCLC	Nicht-Kleinzelliger Lungenkrebs (<i>non-small cell lung cancer</i>)
OP	Operation
Oxa	Oxaliplatin
p...	phosphorylierte Version eines Proteins (z.B. pAkt)
P70s6K	ribosomale Protein-S6-Kinase β -1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)polymerase 1
PCA	<i>principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
<i>PLAUR</i> (Genbezeichnung)	Plasminogenaktivator, Urokinaserezeptor (uPAR)
<i>PPIA</i> (Genbezeichnung)	Peptidylprolylisomerase A (Cyclophilin A)

PVDF	Polyvinylidenfluorid
rel.	relativ
RIN	RNA-Integritätsnummer
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
Ru(bpy) ₃	Ruthenium(II)-tris-bipyridin- (4-methylsulfonat)-NHS-ester („SULFO-TAG™“)
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
SOP	<i>standard operating procedure</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STMN1 (Genbezeichnung)	Stathmin 1
TGF α	<i>transforming growth factor α</i>
TNM	Tumorklassifikation: Tumor, Nodus (Lymphknoten) und Metastasen
TP53 (Genbezeichnung)	p53
TPA	Tripropylamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VEGFA (Genbezeichnung)	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (<i>vascular endothelial growth factor A</i>)
vs.	versus (gegen)

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom und Behandlung

Krebserkrankungen stellten laut World Health Organization (WHO) 2004 weltweit die dritthäufigste Todesursache (Männer: 13,4%, Frauen: 11,8%) dar ^[1], und allein 2004 wurden in Deutschland 432.500 Neuerkrankungen statistisch erfasst ^[2]. Das kolorektale Karzinom stand hierbei in Deutschland bei Männern mit 12,4% und bei Frauen mit 14,3% an zweiter Stelle. Seit 2004 wurden jedes Jahr 73.000 Neuerkrankungen diagnostiziert, und es starben seither jährlich 28.000 Menschen an dieser Tumorerkrankung ^[2].

Zur Behandlung stehen die drei Hauptmethoden Operation, Strahlen- und Chemotherapie zur Verfügung. Die primäre Behandlungsmethode ist die Operation. Die Strahlentherapie und die Chemotherapie werden sowohl adjuvant als auch neoadjuvant verwendet, um nach der Operation verbliebene Tumorzellen und Metastasen zu behandeln bzw. um vor der Operation den Tumor zu verkleinern ^[3]. Je nach Therapieform, abhängig von der klinischen Tumoreinteilung und dem individuellen Status des Patienten, werden diese drei Behandlungsmethoden kombiniert.

Zur Chemotherapie werden Substanzen verwendet, die Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen haben. Die meisten dieser Chemotherapeutika haben jedoch ubiquitären Einfluss auf alle proliferierenden Zellen und Gewebe eines Organismus, weshalb es bei ihrer Anwendung häufig zu starken Nebenwirkungen kommt ^[3]. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate lag in Deutschland 2004 bei 60% ^[2]. Bei einer Früherkennung von Tumoren (Stadium I) liegt diese Überlebensrate bei über 90%, und eine kurative (heilende) Therapie ist möglich ^[4, 5]. Bei einer späten Erkennung von Karzinomen, die schon Fernmetastasen gebildet haben bzw. in benachbarte Gewebe eingedrungen sind (Stadium IV), überleben weniger als 5% der Patienten die ersten fünf Jahre ^[6]. In diesen Fällen ist meist nur eine palliative Therapie möglich, die die Linderung der Schmerzen und eine Lebensverlängerung mit möglichst hoher Lebensqualität zum Ziel hat ^[4, 5]. Die Heilungschancen sind also abhängig von der Früherkennung und Diagnose ^[7]. Hierfür sind molekulare Erkennungsmarker notwendig. Dies können durch Mutationen oder Genamplifikation überexprimierte und überaktivierte (überphosphorylierte) Proteine sein, die das Überleben der Tumorzellen, die Proliferation und Stoffwechselforgänge fördern, z.B. ein konstitutiv aktiver EGF-Rezeptor (EGFR) ^[8, 9]. Außerdem können Proteine, die

z.B. die Apoptose positiv bzw. die DNA-Reparatur steuern, inaktiviert und ihre Expression herunterregelt werden, z.B. das Protein p53, dessen Wildtypform durch mutierte meist unfunktionelle Versionen unterdrückt und deletiert wird [10, 11]. Die Identifizierung solcher Gene sowie von Markern, die die frühe Tumorigenese anzeigen, ist eines der zentralen Ziele der Tumorforschung.

1.2 Medikamente in der Therapie von Karzinomen

In der Therapie des kolorektalen Karzinoms werden verschiedene Chemotherapeutika verwendet. Diese Zytostatika greifen an verschiedenen Punkten des Zellzyklus an und unterbrechen ihn: G1-, S-, G2- oder Mitose-Phase. Dies führt überwiegend zum gezielten Zelltod durch Apoptose, nicht durch Nekrose. Sie lassen sich aufgrund ihrer zellulären und molekularen Angriffspunkte in unterschiedliche Klassen einteilen [12].

Alkylantien wie Cyclophosphamid bilden DNA-Addukte, die zu DNA-Strangbrüchen führen und über diese DNA-Schädigung die Apoptose auslösen.

Antimetabolite ähneln Proteinen, die am Zellzyklus und der DNA-Replikation beteiligt sind, und werden an ihrer Stelle als „falsche Substrate“ verwendet. Hierzu gehören u.a. Pyrimidinanaloga wie 5-Fluorouracil (5-FU) [13, 14] und Gemcitabin [15, 16], die in die DNA eingebaut werden und durch sterische Scherkräfte Strangbrüche herbeiführen bzw. die Nukleotidsynthese blockieren. Das Folinsäurederivat Leucovorin, das als Standardkombination mit 5-FU bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird [13, 14], bindet und blockiert wie 5-FU die Thymidylatsynthase, die für die Nukleotidsynthese essentiell ist.

Antibiotika wie Mitomycin blockieren durch Interkalationen und Blockierung der Transkriptionsenzyme die mRNA-Synthese.

Pflanzenalkaloide wie Vinblastin oder Taxane wie Paclitaxel inhibieren während der M-Phase die essentielle Polymerisation der Tubulineinheiten zu Mikrotubuli.

Topoisomerase-Inhibitoren I oder II blockieren die Entfaltung von „supercoiled“ DNA zur DNA- und RNA-Synthese sowie zur DNA-Reparatur. Das Therapeutikum Irinotecan blockiert die Topoisomerase I [17, 18].

Platinkomplexverbindungen wie Oxaliplatin [9, 15] führen ähnlich wie die Alkylantien zu DNA-Addukten, die zu Inter- oder Intra-Strangbrüchen der DNA führen. Sie blockieren darüber hinaus Proteine der DNA-Reparatur und der Telomeraseaktivität. Andere Therapeutika besitzen darüber hinaus direkten inhibierenden Einfluss auf die Signaltransduktionswege. Diese Blockierung bestimmter Signalwege wie des MAP-

Kinase-, des Akt- oder JAK-STAT-Weges führt wiederum zu einer Inhibition des Zellzyklus und der Proliferation ^[19, 20, 21]. Darüber hinaus werden ebenfalls Signalwege beeinflusst, die das Überleben der Tumorzellen oder die Apoptose fördern oder die Stoffwechselaktivität steuern ^[19, 20, 21]. Hierzu gehören zum einen Kinase-Inhibitoren. Diese sind z.B. gegen die Kinasen Src, Raf und PI3K gerichtet, die Phosphorylierungssignale der Rezeptor-vermittelten Proliferation, Steuerung des Stoffwechsels und der Apoptose weiterleiten ^[8, 21]. Andere blockieren direkt die entsprechenden Rezeptoren. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib (Tarceva[®]) ^[22, 23] und Gefitinib (Iressa[®]) ^[24, 25] hemmen EGFR. Dieser Wachstumsfaktorrezeptor liegt beim kolorektalen Karzinom, aber auch beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), häufig durch Mutationen überexprimiert und hyperaktiv vor ^[26, 27], was mit einer schlechten Prognose verknüpft ist ^[28]. Durch eine konstitutive Aktivierung, z.B. durch Hotspot-Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne (Exon 19-21 ^[29, 30]) oder Deletion der Ligandenbindungsstelle (Aminosäuren 6-273 ^[27, 29]), findet eine permanente Stimulation der Proliferation, des Zellzyklus, des Stoffwechsels und der Translation mit gleichzeitiger Unterdrückung der Apoptose statt ^[8, 9, 30]. Neben diesen Kinase-Inhibitoren werden des Weiteren Rezeptorantagonisten verwendet. Spezifisch gegen die Rezeptoren gerichtete Antikörper blockieren aufgrund ähnlicher molekularer Strukturen die Ligandenbindungsstelle. Der inhibitorische Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) ^[31, 32] bindet z.B. spezifisch an EGFR und blockiert die Bindungsstelle für EGF oder TGF α . Dadurch verhindert er die Dimerisierung des Rezeptors, die gegenseitige Phosphorylierung der im Zytosol gelegenen Tyrosinkinase-Einheiten und somit die Aktivierung und Signaltransduktion ^[30, 32].

Statt Monotherapien mit einzelnen Medikamenten werden jedoch meist Kombinationstherapien verwendet, durch die eine synergistische Wirkung auf die heterogenen und teilweise resistenten Tumorzellpopulationen erzielt werden soll. Die eingesetzten Medikamente sollten hierfür möglichst unterschiedliche Angriffsziele und Wirkungsmechanismen beinhalten, um eine Erhöhung der Zelltoxizität zu verhindern sowie während der Therapie erlangte oder schon zu Beginn der Therapie bestehende Resistenzen einzelnen Substanzen gegenüber ausgleichen zu können ^[12]. Beim kolorektalen Karzinom werden zurzeit Oxaliplatin mit 5-FU und Leucovorin (FOLFOX) ^[33, 34] bzw. Irinotecan mit 5-FU und Leucovorin (FOLFIRI) ^[17, 18] in klinischen Studien getestet und als therapeutische Kombination eingesetzt. Der Einsatz von Inhibitoren erfolgt ebenfalls in Kombination mit auf unterschiedliche Angriffsziele gerichteten Zytostatika. Als eine solche Kombination ist Gefitinib (Iressa[®]) mit der FOLFOX-

Kombination (= IFOX) in präklinischen und klinischen Studien am kolorektalen Karzinom beschrieben ^[9, 15].

Ein generelles Problem sind bei der Therapie unbekannte Mutationen und Resistenzmechanismen, die die Wirkungen der Zytostatika und einzelner Inhibitoren einschränken. Ihre Identifikation und die Analyse der komplexen Zusammenhänge ist eine ständig fortschreitende Aufgabe. An Resistenzmechanismen können sowohl die Proteine der einzelnen Phasen des Zellzyklus als auch die Kinasen und Rezeptoren beteiligt sein, auf die Zytostatika, Inhibitoren und Antagonisten gerichtet sind. Darüber hinaus sind z.B. weitere Mutationen in Proteinen des DNA-Mismatch-Reparatursystems (MLH1 und MSH2) identifiziert worden, durch die trotz Zellzyklus-Stopp und DNA-Schäden keine Induktion der Apoptose eintritt ^[36]. Beim EGFR sind Mutationen gefunden worden, die eine Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber Iressa[®] erst hervorrufen, so etwa eine Deletion in Exon 19 bzw. die L858R-Mutation ^[37, 38, 39]. Andere Mutationen des EGFR verursachen Resistenzen gegen Tyrosinkinase-Inhibitoren ^[30], so z.B. die während der Therapie erworbene Resistenz durch die Mutation T790M ^[38, 39, 40]. Der Inhibitor Gefitinib (Iressa[®]) wird aus entsprechenden Gründen mittlerweile hinsichtlich seiner Wirksamkeit sehr kontrovers diskutiert ^[41, 42, 43]. Neben solchen Rezeptoren sind häufig weitere Kinasen der Signaltransduktionswege gleichzeitig mutiert. Sie weisen überwiegend erhöhte Aktivität auf, und ihre Mutationen korrelieren mit schlechten Prognosen ^[35, 44]. Die Punktmutation in Kodon 600 des GTP-bindenden Proteins K-Ras, das in 35% aller kolorektaler Karzinome mutiert vorliegt ^[30], ist eine der vielen bis heute identifizierten Mutationen ^[44, 45]. Die Kinasen Raf ^[46], PI3K ^[30, 47], aber auch Akt ^[31] sind diesbezüglich als Träger von für Resistenzen verantwortlicher Mutationen identifiziert worden. Die Auswirkungen solcher mutagenen Veränderungen in Tumorzellen sowie die Wirkungsmechanismen der komplex vernetzten Signalwege sind immer noch nicht ausreichend geklärt. Die komplexen Resistenzmechanismen und die individuell auftretenden Mutationen verlangen die Entwicklung weiterer Therapeutika, den multiplen Einsatz von Kinase-Inhibitoren, und ihre Kombinierung in individuellen Therapieansätzen.

1.3 Individuelle Therapie

Um die Chancen einer erfolgreichen Therapie zu verbessern, werden individuelle Therapieansätze etabliert. Zum einen soll jeder Tumor eines Patienten charakterisiert

und ein System aufgebaut werden, durch das eine detaillierte Klassifizierung ermöglicht wird ^[48]. Dazu ist es nötig, die charakteristischen Merkmale und die Reaktion auf verschiedene Therapeutika eines Tumors analysieren zu können ^[49]. Parallel hierzu sollen die Wirkungswege von Medikamenten und Resistenzmechanismen genauer aufgeklärt werden. Ziel ist es, das Therapiedesign individuell auf jeden Patienten zuschneiden zu können ^[50, 51]. Im Falle des Mamma-Karzinoms wird aufgrund der Expression des HER2-Rezeptors entschieden, ob eine Therapie z.B. mit dem Rezeptorantagonisten Trastuzumab (Herceptin[®]) erfolgen sollte ^[52, 53]. Für das kolorektale Karzinom sind zurzeit noch keine effektiven prediktiven Marker identifiziert worden. Die Suche nach wirksameren Therapeutika und neuen Erkennungsmarkern zur Klassifizierung von Patienten ist eine zentrale Aufgabe zur Ermöglichung einer individuellen Therapie ^[54].

1.4 Medikamententests

Die Entwicklung und Zulassung von Medikamenten erfolgt durch verschiedene Studienphasen. Präklinische Studien analysieren die Wirksamkeit anhand verschiedener zellulärer und molekularer Parameter *in vitro* und anschließend *in vivo* (in Tierversuchen) ^[55, 56], um u.a. die metabolischen Effekte festzustellen und die Dosierung anzupassen. Im Anschluss erfolgen klinische Studien (Phasen I-IV) am Menschen ^[57], um die Verträglichkeit und Nebenwirkungen zu untersuchen und die Dosierung weiter einzugrenzen. Diese stufenweise Durchführung bedeutet einen immensen Aufwand und hohe Kosten. Im Schnitt erreichen nur drei Medikamente pro Jahr und erst nach einem Zeitraum von 10-12 Jahren und einem Kostenaufwand von 800-900 Mio. US-\$ die Zulassung ^[58, 59]. In jedem der Studienschritte werden Substanzen wegen Unwirksamkeit und zu großer Nebenwirkungen ausgeschlossen. Geringe Übereinstimmungen hinsichtlich Wirkungen und Dosierung der getesteten Therapeutika in den verschiedenen Phasen führen zu häufigen und teuren Wiederholungen. Wie gut die Ergebnisse aus präklinischen Studien mit denen der klinischen Studien am Menschen übereinstimmen bzw. übertragbar sind, hängt maßgeblich von den verwendeten *In vitro*-Kultursystemen ab. Tumore besitzen spezifische und individuelle chromosomale, genetische und proteinbiochemische Charakteristika, die verantwortlich für das Wachstum, das Migrationsverhalten und Metastasierungspotenzial, den Stoffwechsel ^[60, 61] und somit maßgeblich für sein Reaktionsvermögen auf verschiedene Therapeutika sind ^[62, 63]. Ein Tumor ist bezüglich der Zellpopulationen

und der morphologischen Struktur, der genetischen Diversität, der unterschiedlichen Mutationen und Phosphorylierungsmuster in den Signaltransduktionswegen [64, 65] sehr heterogen und komplex aufgebaut und somit individuell unterschiedlich. Es ist eine große Herausforderung, diese extremen Bedingungen in den *In vitro*-Kultursystemen nachzubilden, um eine möglichst gute Übertragbarkeit der Daten zu gewährleisten und so umfassend wie möglich falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, sowie parallel eine große Zahl an Ergebnissen zur Medikamentenwirkung zu erhalten [54, 66, 67]. Hierfür müssen zuverlässige *In vitro*-Kultursysteme entwickelt werden, um die Individualität der Patienten zu berücksichtigen, aber auch die notwendigen Studienphasen, den Zeitaufwand und die Kosten zu minimieren.

1.4.1 *In vitro*-Kultursysteme für präklinische Studien

Als Ausgangspunkt zur Etablierung von *In vitro*-Kultursystemen, die das Verhalten eines Ursprungstumors so genau wie möglich widerspiegeln, stehen verschiedene Modelle zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Zellzusammensetzung, der Kulturbedingungen, der Wachstumsstruktur (zwei- oder dreidimensional) und ihrer Stabilität in Verhalten und Expressionsmustern unterscheiden.

Die meisten *In vitro*-Kultursysteme basieren auf der Kultur einzelner Zellen, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden. Die Entstehungshierarchie solcher Zellkulturen ist in Abb. 1 dargestellt.

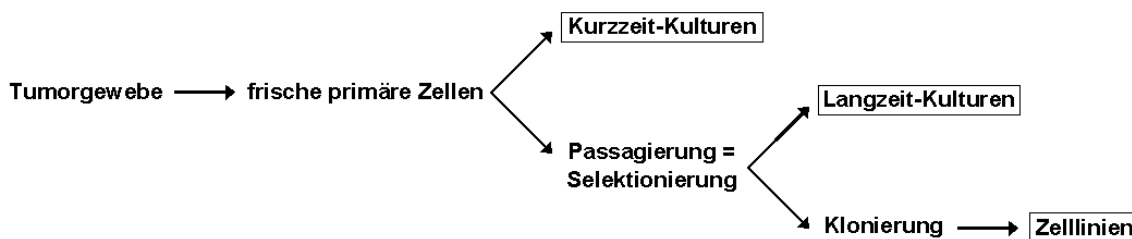


Abb. 1: Schema verschiedener Zellkulturen aus Tumorgewebe

Hierzu gehören frische primäre Zellen (Kurzzeit-Kultur), passagierte primäre Zellen (Langzeit-Kultur) sowie Zelllinien (sekundäre Kulturen). Letztere sind häufig schon Jahrzehnte alt und grundsätzlich aus einer einzelnen Tumorzelle kloniert. Verschiedene Zelllinien des kolorektalen Karzinoms mit unterschiedlicher Expressionsausprägung spiegeln jedoch auch gemeinsam nicht den Zustand eines tatsächlichen Tumors wider [14, 15]. Durch Passagierung (Langzeit-Kultur) und Klonierung kommt es

zu einem Verlust der originalen Zellzusammensetzung und somit zur Herabsetzung der Zellheterogenität und genetischen Diversität [68, 69, 70]. Die Komplexität und Heterogenität eines Tumors bleibt nur in primären Kulturen erhalten, die in Kurzzeitkultur ohne Passagierung und Selektionierung verwendet werden. Der Verlust des zellulären und genetischen Aufbaus der Zellpopulationen ist deutlich geringer als in passagierten primären Kulturen oder in Zelllinien [68, 69, 70].

Bei der Entwicklung geeigneter Kultursysteme basierend auf Adenokarzinomgewebe muss berücksichtigt werden, dass solche Tumore dreidimensionale, extrem komplexe Gebilde sind, deren Eigenschaften und Reaktionen auf Substanzen und Medikamente stark von den Zell-Zell-Interaktionen, der Versorgung durch Gefäße bzw. der Möglichkeit der passiven oder aktiven Diffusion von Substanzen von außen in das Innere des Tumors abhängig sind [71]. Die Zellfunktionen und das Verhalten von Zellen eines natürlich gewachsenen Zellverbands können in diesen Zellkulturen nicht nachgebildet werden, da sie überwiegend in einer Einzelschicht (Monolayer) und somit zweidimensional wachsen. Zur Berücksichtigung dreidimensionaler Eigenschaften müssen andere organo-typische *In vitro*-Kultursysteme verwendet werden.

Sphäroide – organ-ähnliche (organoide) Sphären – werden aus Zellkulturen hergestellt und sollen den Vorteilen und Charakteristika der jeweiligen Zellkulturen die Eigenschaft der Dreidimensionalität hinzufügen. Aus in Suspension kultivierten, adhärent wachsenden Zellen entstehen Zellaggregate, durch Schwerkraft aneinander gelagerte Zellhaufen, deren Zellen als Wachstumsoberfläche wie im Ursprungstumor andere Zellen verwenden. Diese können sich aus verschiedenen Zellen und Zelltypen zusammensetzen und erlauben wegen ihres kompakten Zellverbundes anders als herkömmliche Zellkulturen Untersuchungen an einem komplexen Zellzusammenhalt und den Zell-Zell-Kontakten [72, 73]. Allerdings entspricht die Zellzusammensetzung und Zelldiversität von Sphäroiden nicht denen eines Ursprungstumors, da sie sich in anderen Zelltypverhältnissen künstlich zusammenlagern.

Neben diesen auf Zellen basierenden *In vitro*-Kultursystemen können Gewebeschnitte hergestellt und je nach Gewebetyp Stunden bis Tage kultiviert werden [74, 75].

Der dreidimensionale Gewebeaufbau bleibt erhalten, es werden die Tumorzellen in der exakten originalen Zusammensetzung verwendet. Allerdings umfasst dies bisher meist nur Toxizitätsanalysen von Substanzen und wird daher vorzugsweise an normalem Lebergewebe durchgeführt [75, 76]. Vickers et al. (1994) [77] haben an Schnitten aus normalem Nierengewebe von Menschen und Ratten den zellulären

Einfluss des Zytostatikums Cisplatin analysiert. Eine Verwendung von humanen Karzinomen wird erst in den letzten Jahren angestrebt. So haben van der Kuip et al. (2006) ^[78] an Brustkrebsgewebe erste Medikamententests durchgeführt. Der Einsatz von kolorektalem Karzinomgewebe als Basis für Medikamententests sowie die Übertragbarkeit möglicher Daten auf die Ursprungstumore wurde bislang noch nicht demonstriert.

1.4.2 Parameter für Medikamententests

Für die Testung von Medikamenten müssen eine Vielzahl an Parametern berücksichtigt werden. Erste Untersuchungen bestehen aus *In vitro*-Analysen zur Wirksamkeit, Art der Wirkung und des zeitlichen Ablaufs. Es muss geklärt werden, wie sich die Vitalität, die Zellzahl, die Apoptoserate und – wegen zytostatischer Wirkungen – die Proliferationsrate verändert ^[79, 80]. Darüber hinaus müssen die in Stoffwechselwege und an der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion angreifenden Therapeutika berücksichtigt werden ^[81, 82, 83, 84]. Es müssen sowohl die dadurch veränderten Expressions- als auch Phosphorylierungsmuster analysiert werden. Neben dem Vergleich von Monotherapien mit Kombinationstherapien spielen zeitabhängige Effekte eine Rolle. Um alle diese Parameter sowie die Kinetik verschiedener Medikamente analysieren zu können, muss eine Plattform generiert werden, die eine Verknüpfung und parallele Durchführung zulässt und auf Basis der als geeignet identifizierten *In vitro*-Kultursysteme anwendbar ist. Abb. 2 zeigt eine solche Plattform.

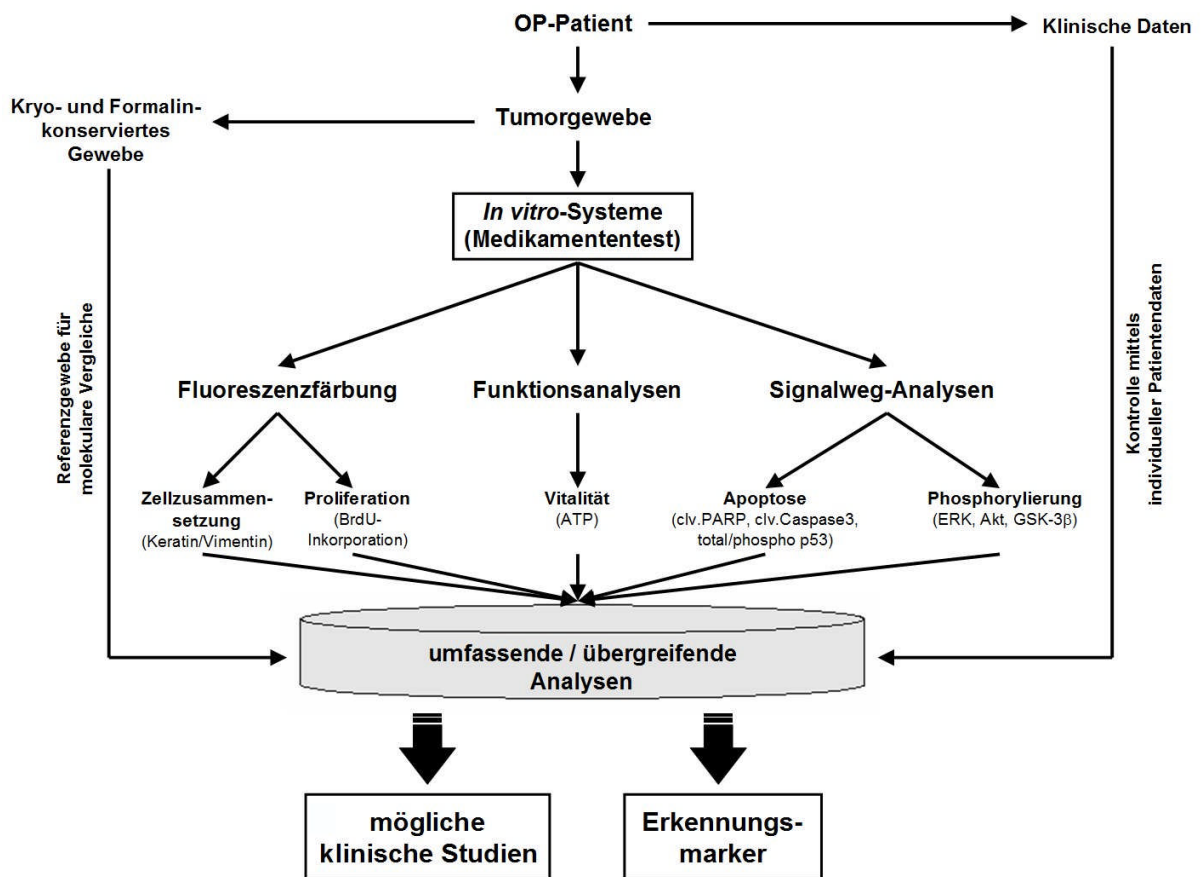


Abb. 2: Umfassende Plattform zur Medikamententestung, aufgebaut bei Indivumed GmbH

Neben der parallelen Durchführung einer Vielzahl von Analysen an *In vitro*-Kultursystemen beinhaltet dieser Aufbau gleichzeitig sowohl die Erfassung der klinischen Daten für statistische Kontrollen als auch die Konservierung von Ursprungsgewebe für molekulare Vergleichsanalysen. Diese Kontroll- und Vergleichsanalysen ermöglichen über eine Testung von Medikamenten hinaus statistische Klassifizierungs- und Korrelationsanalysen.

1.5 Infrastrukturen der Firma Indivumed GmbH

Um eine solche Plattform und Vergleiche mit klinischen Daten und konserviertem Referenzgewebe zu ermöglichen, sind standardisierte Methoden zur Gewinnung und Verarbeitung der Proben und der klinischen Daten eines Patienten essentiell. Über ein dafür notwendiges Netzwerk verfügt die Firma Indivumed GmbH ^[85]. Mit diesem können – nach Einverständniserklärung gemäß den Richtlinien “Protection of Human Subjects” des *US National Institutes of Health* – zum einen die umfangreichen klinischen Daten sowie Lebensumstände und -gewohnheiten der Patienten im

zeitlichen Verlauf dokumentiert werden. Dies geschieht auch im Rahmen der von Indivumed GmbH organisierten Nachsorge. Zum anderen wird die operative Entnahme von Tumoren begleitet, der komplette zeitliche Ablauf der Operation einschließlich der Medikamentengaben detailliert protokolliert und die Gewinnung der Gewebeproben, Normal- und Tumorgewebe, nach betriebsintern entwickelten Methoden standardisiert durchgeführt. Nachdem der Pathologe genügend Material erhalten hat, wird erstens Gewebematerial für die Gewebedatenbank konserviert, das als Referenzmaterial für Analysen dienen kann (s. Abb. 2). Zweitens kann Gewebe vital und unter Aufrechterhaltung einer durchgehenden Kühlkette transportiert und ebenfalls nach SOP-Vorgaben aufgearbeitet, der Langzeitlagerung zugeführt bzw. zur Herstellung von *In vitro*-Kulturen verwendet werden.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer Medikamententestplattform und ihre Evaluierung für *In vitro*-Kulturen auf Basis des kolorektalen Karzinoms. Die Etablierung der Plattform beinhaltete zwei Teilaufgaben:

1. Etablierung und Vergleich verschiedener *In vitro*-Kultursysteme und Überprüfung (Expressionsanalysen) hinsichtlich ihrer Eignung für Medikamententests.
2. Etablierung von geeigneten Messmethoden, die verschiedene Wirkungswege und -effekte von Medikamenten analysieren und die Anwendung der in 1. identifizierten *In vitro*-Kultursysteme zuließen. Anschließend folgte die Verknüpfung zur Plattform und Evaluierung auf Basis dieser Kultursysteme.

Nach Etablierung und Evaluierung der Medikamententestplattform wurden erste weiterführende Analysen zur Anwendung dieser Plattform in der Tumorforschung anhand des kolorektalen Karzinoms durchgeführt.

3. Vergleiche von klinischen und immunhistologischen Daten der Referenzgewebe mit den Reaktionen der *In vitro*-Kultursysteme auf Medikamente.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe

Es wurden kolorektale Adenokarzinomgewebe von ca. 200 Patienten für Sphäroide, primäre Zellen in Langzeit- und Kurzzeit-Kultur sowie Gewebeschnitte verwendet. Den Patienten wurden vor der Operation anhand eines Aufklärungsbogens der Zweck und die weitere Verwendung der Proben erläutert. Mit einer Einverständniserklärung gaben sie anschließend die Zustimmung zur Entnahme und Verwendung der Proben. Der Schutz der Patientendaten wird nach internationalen ethischen Richtlinien und gesetzlichen Vorschriften wie dem Datenschutzgesetz, den Richtlinien der Europäischen Union und des US-amerikanischen „National Institute of Health“ (NIH) gewährleistet.

2.1.2 Zelllinie HT29

Zum Kontrollvergleich zu kolorektalen primären Zellen und Geweben wurde die Zelllinie HT29 benutzt, deren Zellen 1964 aus einem kolorektalen Adenokarzinom des Tumorstadiums II gewonnen wurden. Die HT29-Zellen wurden von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) erhalten.

2.1.3 Chemikalien

Es wurden Chemikalien verwendet, die von Sigma (Steinheim), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), AMS Biotechnology (Frankfurt), Qiagen (Hilden), PAA (Cölbe), Dako (Hamburg), Biozol (Eching) und Ventana (Tucson, AZ, USA) erworben wurden.

2.1.4 Chemotherapeutika und andere therapeutische Substanzen

Es wurden die folgenden Chemotherapeutika, andere therapeutische Substanzen und Kombinationen verwendet:

Tab. 1: Chemotherapeutika und andere therapeutische Substanzen

Name	Abk.	Substanztyp	Hersteller	Stockkonzentration	Lagerung	Einsatzkonzentration / Verdünnung
Oxaliplatin (Eloxatin [®])	Oxa	alkylierende Platinverbindung	Sigma (Steinheim)	20mM in DMSO	-80°C	20µM / 1:1000
5-Fluorouracil	5-FU / FU	Antimetabolit	Sigma (Steinheim)	0,5M in DMSO	-80°C	0,5mM / 1:1000
Leucovorin	Leuco / L	Antimetabolit (Folinsäurederivat)	Sigma (Steinheim)	10mM in D-PBS	-20°C	100µM / 1:100
Gefitinib (Iressa [®])	Iressa [®]	Inhibitor des EGFR	AstraZeneca (Wilmington, DE, USA)	1mM in DMSO	-20°C	2µM / 1:500
Gemcitabin (Gemzar [®])	Gem	Antimetabolit	Eli Lilly (Delaware, IN, USA)	25mg/ml in DMSO	-80°C	50µg/ml / 1:500

Tab. 2: Kombinationsbehandlungen

Name	Zusammensetzung	Einsatzkonzentration / Verdünnung
5-FU/L	0,5mM 5-Fluorouracil; 100µM Leucovorin	1:1000; 1:100
FOLFOX	5-FU / L; 20µM Oxaliplatin	s. 5-FU/L; 1:1000
IFOX	FOLFOX; 2µM Iressa [®]	s. FOLFOX; 1:500
GOLF	FOLFOX; 50µg/ml Gemcitabin	s. FOLFOX; 1:500

2.1.5 Antikörper und Konjugate

Für Western Blot-, Immunfluoreszenz-Analysen und Durchflusszytometrie (FACS) wurden folgende Antikörper und Antikörper-Konjugate verwendet:

Tab. 3: Erstantikörper

Antikörper	Hersteller	Spezies	Verdünnung	verwendete Methode	
anti-Akt	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	WB	2.3.4.7
anti-CEA	LabVision (Fremont, CA, USA)	Maus (monoklonal)	1:1000	WB	2.3.4.7
anti-clv. Caspase 3	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	IF, WB	2.3.4.10 / 2.3.4.7
anti-EGFR (Ab-10)	Dianova (Hamburg)	Maus (monoklonal)	1:100	IF / FACS	2.3.4.10 / 2.3.4.9
anti-EGFR	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:200	WB	2.3.4.7
anti-pEGFR (Tyr 1173)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	Ziege (polyklonal)	1:200	WB	2.3.4.7
anti-pERK 1/2 (Thr 202 / Tyr 204)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	Maus (monoklonal)	1:200	WB	2.3.4.7
anti-Hsp90	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	WB	2.3.4.7
anti-p53	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:500	IHC	2.3.4.10
anti-Ki67	Biogenex (San Ramon, CA, USA)	Maus (monoklonal)	1:40	IHC	2.3.4.10
anti-p-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:50	IHC	2.3.4.10
anti-PanCytokeratin	Zytomed Systems (Berlin)	Maus (monoklonal)	1:50	IF	2.3.4.10
anti-Vimentin	LabVision (Fremont, CA, USA)	Kaninchen (polyklonal)	1:150	IF	2.3.4.10
anti-BrdU	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)	Maus (monoklonal)	1:50	IF	2.3.4.10
anti-GAPDH	Ambion, Applied Biosystems (Weiterstadt)	Maus (monoklonal)	1:4000	WB	2.3.4.7

Tab. 4: Zweitantikörper, konjugiert

Antikörper	Hersteller	Konjugation	Verdünnung	verwendete Methode	
				WB	2.3.4.7
anti-Maus	Pierce (Sankt Augustin)	HRP	1:20.000	WB	2.3.4.7
anti-Maus	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)	AlexaFluor488	1:100	IF	2.3.4.10
anti-Maus	KPL (Gaithersburg, MD, USA)	Fluoreszein	1:10	FACS	2.3.4.9
anti-Maus	Biozol (Eching)	Biotin	1:400	IHC	2.3.4.10
anti-Kaninchen	Pierce (Sankt Augustin)	HRP	1:10.000	WB	2.3.4.7
anti-Kaninchen	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)	AlexaFluor647	1:100	IF	2.3.4.10
anti-Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	HRP	1:5000	WB	2.3.4.7

2.1.6 Primer für die cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA zum Zweck der Microarray-Analysen (DualChip™, Eppendorf) wurden Hexanukleotide (Roche) verwendet.

Für die Synthese der cDNA und die anschließende *In vitro*-Transkription der cRNA zum Zweck der Microarray-Analyse (Affymetrix) wurde ein T7-(dT)₂₄-Primer (TIB MOLBIOL; Berlin) benutzt.

2.1.7 TaqMan®-Proben und -Primer für Real-time PCR

In Tab. 5 sind die als Primer und die als TaqMan®-Proben für die Real-time PCR dienenden Oligonukleotide aufgelistet. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein („6FAM“) ist bei jeder TaqMan®-Probe am 5'-Ende, der Quencher (Tamra = „X“), der bei intakter TaqMan®-Probe die Fluoreszenz unterdrückt, am 3'-Ende an die Oligonukleotide gekoppelt.

Tab. 5: Primer und TaqMan®-Proben

Zielgen, Primer und TaqMan®-Proben		Sequenz (5'-3')	Hersteller
CYCA:			
sense-Primer	22-mer	- AATGCTGGACCCAACACAAATG -	TIB Molbiol (Berlin)
antisense-Primer	27-mer	- CACAATATTCATGCCTTCTTT CACTTT -	TIB Molbiol (Berlin)
TaqMan®- Probe	29-mer	- <u>6FAM</u> - ACACCACATGCTTGC CATCCAACCACT _x C -	TIB Molbiol (Berlin)
c-fos:			
sense-Primer	19-mer	- ACTTCTGCACGGACCTGGC -	TIB Molbiol (Berlin)
antisense-Primer	27-mer	- CTCTTCTTCTTCTGGAGATAACT GTTTC -	TIB Molbiol (Berlin)
TaqMan®- Probe	28-mer	- <u>6FAM</u> - TGCCAACCTTCATTCC CACGGTCACTGC _x T -	TIB Molbiol (Berlin)
HIF-1α:			
sense-Primer	21-mer	- GCTCATCAGTTGCCACTTCCA -	TIB Molbiol (Berlin)
antisense-Primer	27-mer	- TGCTTTTCATGTCATCTTCAAT ATCCAA -	TIB Molbiol (Berlin)
TaqMan®- Probe	29-mer	- <u>6FAM</u> - ACCAGCATCCAGAAG TTTCCTCACACGC _x T -	TIB Molbiol (Berlin)

2.1.8 Enzyme

Es wurden folgende Enzyme verwendet:

- Real-time PCR: AmpliTaq Gold (Roche; Mannheim)
- cDNA-Synthese zum Zweck des Microarray (Affymetrix): SuperScript™ II, RNase H⁻ Reverse Transkriptase, DNA-Ligase, RNA-Polymerase, RNase H und T4-DNA-Polymerase (Invitrogen; Karlsruhe) sowie die T7-RNA-Polymerase (Ambion; Austin, USA)
- Isolierung primärer Zellen und Subkultivierung: Collagenase NB6 (Serva; Heidelberg) und Trypsin-EDTA (PAA; Cölbe)

2.1.9 Kits

Es wurden folgende kommerziell erhältliche Kits für Analysen verwendet:

Tab. 6: verwendete Kits

Kit	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Phase Lock Gel™ (PLG)	Eppendorf (Hamburg)
GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
SuperSignal® West Dura Trial Kit	Pierce (Sankt Augustin)
SuperSignal® West Femto Trial Kit	Pierce (Sankt Augustin)
EasyLyse Reagenz	Dako (Hamburg)
ATPlite™ Luminescence Kit	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega (Madison, WI, USA)
MS6000 Apoptosis Whole Cell Lysate Kit [p53 (total), pp53 (Ser 15), PARP, Caspase-3]	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
MS6000 Akt Signaling Whole Cell Lysate Kit [pAkt (Ser473), pp70S6K (Thr421/Ser424), pGSK-3beta (Ser9)]	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
MS6000 Akt Signaling (Total Protein) Panel Whole Cell Lysate Kit [Akt, p70S6K, GSK-3beta]	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
MS6000 Phospho (Y1173) / Total EGFR Whole Cell Lysate Kit	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
MS6000 Phospho (Thr 202 / Tyr 204, Thr 185 / Tyr 187) / Total ERK Whole Cell Lysate Kit	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
MS6000 Phospho (Ser 217 / 221) / Total MEK1/2 Whole Cell Lysate Kit	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
MS6000 ERK-STAT3 Cascade Whole Cell Lysate Kit [pSTAT3 (Tyr 705), pERK 1/2 (Thr 202 / Tyr 204, Thr 185 / Tyr 187), pMEK 1/2 (Ser 217 / 221)]	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)

2.1.10 Geräte

Es wurden für sämtliche Analysen die folgenden Geräte verwendet:

Tab. 7: verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Berlin)
CO ₂ -Begasungsbrutschrank Inkubator Hera Cell 150	Thermo Life Science (Frankfurt)
Kryostat HM 500 O	Microm (Walldorf)
HM 560	Microm (Walldorf)
Formalinautomat „Microm STP420D“	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific) (Waltham, MA, USA)
Einbettautomat AP280-3	Microm (Walldorf)
IHC-Automat Discovery [®] XT	Ventana (Tucson, AZ, USA)
Analysenwaage	A&D Engineering (Milpitas, CA, USA)
Feinwaage BP 110 S	Sartorius (Göttingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
BD FACS Calibur System	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
FLUOstar Optima	BMG Labtech GmbH (Offenburg)
Handhomogenisator Ultra Turrax T8; T8.01 Netzgerät	IKA [®] -Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
HTM 130	HLP (Bovenden)
Heizrührer MR 3001 K	Heidolph (Schwalbach)
Trockenschrank ED 53	Binder GmbH (Tuttlingen)
Durchlichtmikroskop & Kamera Axiovert 25 & AxioCam ICc 1	Carl Zeiss Jena AG (Jena)
Fluoreszenzmikroskop & Kamera P.A.L.M. MicroBeam (MB04022); Mikroskop Axio Observer.Z1 & AxioCam MRc Rev.3	Carl Zeiss Jena AG (Jena)
Scanner für Objektträger „Mirax Scan“	Carl Zeiss Jena AG (Jena)
Geldokumentation [®] Raytest, Diana II Kamera	Isotopen Messgeräte GmbH (Straubenhardt)

Gerätebezeichnung	Hersteller
Digital Graphik Printer UP-D895	Sony (Berlin)
kl. Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
gr. Zentrifuge Universal 32 R	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Krumdieck-Tissue-Slicer	Alabama Research (Munford, AL, USA)
MACSmix	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
multi-funktionelles ELISA-Gerät MS6000	Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MA, USA)
PCR-Gerät iCycler	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
pH-Meter SevenEasy	MettlerToledo (Greifensee, Schweiz)
Pipettierhilfe "Pipettus"	VWR International (Hamburg)
Power Supply: Power Pac 300	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
Rotationsmikrotom HM 340E	Microm (Walldorf)
Schüttler MicroMix 5	DPC-Biermann (Bad Nauheim)
Promax 1020	Heidolph (Schwalbach)
Rotamax 150	Heidolph (Schwalbach)
Schwingmühle Schwingmühle MM 300, Retsch®	Qiagen (Hilden)
Sterilwerkbank HERAsafe KS	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific) (Waltham, MA, USA)
kl. Stickstofftonne KGW Isotherm	Roth (Karlsruhe)
gr. Stickstofftonne Arpege 170	Air Liquide Kryotechnik GmbH (Düsseldorf)
Vortexer REAXtop	Heidolph (Schwalbach)
Wasserbad GFL® 1083	GFL (Burgwedel)

2.1.11 Plastikmaterial

Es wurden folgende teilweise zusammengefasste Plastikmaterialien verwendet:

Tab. 8: verwendetes Plastikmaterial

Bezeichnung	Hersteller
0,22µm-Filter & Einwegspritzen (20ml)	Roth (Karlsruhe, BRD) & B.Braun (Melsungen, BRD)
RNAse-freie 1,5ml Gefäße 1,5ml Reaktionsgefäße (RNAse-frei)	Eppendorf (Hamburg, BRD)
1,5ml- Reaktionsgefäße SafeSeal Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
2,0ml- Reaktionsgefäße SafeSeal Reagiergefäße 2,0ml	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
2,0ml Eppendorfgefäße SafeLock-Tubes 2,0ml	Eppendorf (Hamburg, BRD)
Reaktionsröhren (Falcons) 15ml & 50ml	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Kryogefäße CryoPure Gefäße	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Stabpipetten	Corning (Corning, NY, USA)
Spitzen für Eppendorfpipetten 1-10µl; 2-20µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf (Hamburg, BRD); Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Combitips plus 10ml; 5ml; 2,5ml; 1ml	Eppendorf (Hamburg, BRD)
T25-Zellkulturflaschen mit Schräghals	Corning (Corning, NY, USA)
T75-Zellkulturflaschen mit Schräghals	Corning (Corning, NY, USA)
T175-Zellkulturflaschen mit Schräghals	Corning (Corning, NY, USA)
35mm-Zellkulturschalen	Corning (Corning, NY, USA)
60mm- Zellkulturschalen	Corning (Corning, NY, USA)
100mm- Zellkulturschalen	Corning (Corning, NY, USA)
6well-Multiwell-Platten	Corning (Corning, NY, USA)
12well-Multiwell-Platten	Corning (Corning, NY, USA)
24well-Multiwell-Platten	Corning (Corning, NY, USA)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Zellsiebe (Cell Strainer) 70µm- & 100µm-	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)

2.2 Gefahrstoffliste

Die folgenden Gefahrstoffe wurden entsprechend ihrer Gefahreinstufung und den R- und S-Sätzen verwendet und nach Abschluss der Analysen entsorgt:

Tab. 9: Gefahrstoffliste, inkl. Gefahrstoffsymbolen und R- und S-Sätzen

Substanzbezeichnung / Handelsname	Gefahrensymbol		R- und S-Sätze
5-Fluorouracil	Xn	R 22	S -
Amphotericin B	Xi	R 36/37/38	S -
Bicinchoninicsäure-Lsg.	-	R 36	S 26-36
Bis-Tris	Xi	R 36/37/38	S 26-36
5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)	T	R 46-61	S 36/37/39-45
Calciumchlorid	Xi	R 36	S 22-24
Caspase-Glo 3/7-Kit	Xn	R 20/21/22	S 9-23-36/37-60
Cell Conditioner „CC1-s“	-	R 22-36-37-38-43	S -
Chlorobutanol	Xn	R 10-22-36/37/38	S 26
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Collagenase NB6	Xn	R 36/37/38-42/43	S 22-24-26-36/37-45
DAB Map TM Kit	-	R 22-31-37-38-41	S -
DEPC	Xn	R 22-36/37/38	S 26-36
Dexamethason	Xi	R 43	S 36/37
Dinatriumcarbonat	Xi	R 36	S 22/26
Dinatrium-EDTA	Xn	R 22	S 2-4
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 22-36/37/39
DMSO	Xi	R 36/38	S 26
Eosin Y	F, Xn	R 11-20/21/22-68/20/21/22	S 16-36/37-45
Essigsäure	C	R 10-35	S 23-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Fluoromount G	Xn	R 22-52/53	S 61
Flüssigstickstoff	-	R -	S 9-23-26
Formalin 4%	T	R 20/21/22-40-43	S 36/37

Substanzbezeichnung / Handelsname	Gefahren- symbol		R- und S-Sätze
GBX-Entwickler	Xn	R 22-36/37/38-40-43-68	S 26-36/37/39
GBX-Fixierer	Xn	R 20/21/22-36/37/38	S 26-36
Gefitinib (Iressa [®])	Xn	R 20/21/22	S 22-24/25-36/37/39
Gemcitabin (Gemzar [®])	Xi, Xn	R 21-36/38-46-62-63	S 25-26-36/37-53
Gentamicin	Xn	R 42/43	S 23-36/37-45
Hämatoxylin	Xi	R 36/37/38	S 26-36
Hoechst 33342	Xn	R 22-37/38	S 36/37
Hydrocortison	Xn	R 63	S 36/37
Isopropanol	Xi, F	R 11-36-67	S 7-16-24/25-26
Kupfersulfat	Xn, N	R 22-36/38-50/53	S 22-60-61
Leucovorin	Xn	R 36/37/38-42/43	S 26-36
Magnesiumchlorid	Xi	R 36/37	S 26-39
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S 7-16-36/37-45
Natrium-EGTA	-	R -	S 22-24/25
Natriumhydrogencarbonat	Xi	R 36	S 22/26
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Oxaliplatin (Eloxatin [®])	Xn	R 36/37/38-42/43-40	S 26-36
Paraformaldehyd	Xn	R 20/22-37/38-40-41-43	S 26-36/37/39-45
Penicillin G & Streptomycinsulfat	Xn & T	R 42/43 & R 61-22	S 36 & S 45-36/37/39-22
Phenol	T, C	R 23/24/25-34-48/20/21/22-68	S 24/25-26-28-36/37/39-45
Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol-Lsg. (25:24:1) (v/v/v)	T, C	R 23/24/25-34-40-48/20/21/22-68	S 24/25-26-28-36/37/39-45
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I	-	R -	S 23-24/25
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II	-	R -	S 23-24/25
RNA-Stat 60	Xn & T, C	R 22-52/53 & R 23/24/25-34-48/20/21/22-68	S 13-61 & S 24/25-26-28-36/37/39-45
Roti [®] -Histokitt II	Xn	R 10-20/21-38	S 25-36/37

Substanzbezeichnung / Handelsname	Gefahren- symbol		R- und S-Sätze
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
SDS	Xn	R 22-36/38	S 2-46
SuperSignal® West Dura Trial Kit	Xn	R 22	S -
Staurosporin	T	R 45	S 53
Triiodothyronin	Xn	R 20/21/22	S 36
Tris	Xi	R 36/38	S 26
Triton X-100	Xn	R 22-41	S 26-36-23
Trypanblau-Lösung 0,4%	T	R 45	S 53-45
Trypsin	Xn	R 42	S 22
Xylol	Xn	R 10-20/21-38	S 25
β-Mercaptoethanol	F, Xn, N	R 11-20-50/53	S 16-25-60-61

2.3 Methoden

2.3.1 Probenentnahme von Gewebe

Die operative Entnahme der kolorektalen Adenokarzinomgewebe erfolgte im Israelitischen Krankenhaus (Hamburg), im Diakonie-Krankenhaus Alten Eichen (Hamburg) und im Marienkrankenhaus (Hamburg). Um unspezifische molekulare Veränderungen zu vermeiden, wurden nur Gewebe mit einer kalten Ischämiezeit von maximal 14min akzeptiert. Die gewonnenen Tumorstücke von einer Größe von 1,5g bis 11,5g wurden in 30ml gekühltem Transportmedium (s.u.) bei ununterbrochener Kühlung (4°C) für die weitere Aufarbeitung ins Labor transportiert. Als Referenzgewebe wurden parallel Stücke mit einem Volumen von minimal 5 x 5 x 5mm in flüssigem Stickstoff konserviert oder mit 4% phosphatgepuffertem Formalin fixiert und für histologische Analysen verwendet.

Transportmedium (Lagerung bei 4°C für max. 14 Tage):

500ml D-MEM/F12-Medium (Gibco, Invitrogen); 10% (v/v) FCS; 2mM L-Glutamin; 5µg/ml Transferrin; 12,5µg/ml Fetuin; 1% (v/v) MEM-Vitamine; 20µg/ml Insulin; 3% (v/v) Pen/Strep; 0,6% (v/v) Gentamicin; 0,75µg/ml Amphotericin B (Fungizone®)

2.3.2 *In vitro*-Kulturmethoden

2.3.2.1 Herstellung und Kultivierung von Gewebeschnitten aus kolorektalem Adenokarzinom

Das frische Gewebe wurde bis zur jeweiligen Aufarbeitung (max. 4h nach Entnahme) in Transportmedium (s. 2.3.1) bei 4°C gelagert. Das Gewebe wurde gewogen und das Gewicht, die Größe und die Beschaffenheit notiert.

Das Gewebestück wurde in 4°C-kaltem KHB-Puffer (KHB-Pulver (Sigma); 2,5mM CaCl₂ x 6 H₂O; 19,8mM Na₂CO₃; pH 7,4) zuerst per Hand mit einem Einwegskalpell in möglichst dünne Schnitte mit einer Fläche von ca. 5 x 5mm zerschnitten und diese zur ersten Etablierung der Kulturbedingungen oder Microarray-Analysen verwendet.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Schnitte, um die Reproduzierbarkeit und Homogenität der Schnitte genauestens kontrollieren zu können, mit Hilfe eines „Krumdieck-Slicers“ (Alabama Research) gewonnen, der sehr dünne Schnitte von bis zu 200µm herstellen kann. Die Gewebeschnitte wurden zur Etablierung der Kulturbe-

dingungen, für Diffusionsanalysen und Behandlung mit Therapeutika verwendet. Mit einem Skalpell wurde unter Kühlung (4°C) das Gewebe in makroskopisch ähnliche und in sich möglichst homogene Streifen von maximal 1,5cm Länge und einem Durchmesser von maximal 8mm zerteilt. Im „Krumdieck-Slicer“ und mit Hilfe eines 8mm-Stanzenhalters wurden die Gewebestreifen in gekühltem D-PBS an einer sich seitlich bewegenden Rasierklinge in 400µm-dicke Schnitte zerteilt und in einen Auffangbehälter gespült. Die Schnitte eines jeden Streifens wurden separat gesammelt und bis zum Ende der Schneideprozedur in Transportmedium auf Eis (4°C) gelagert. Um eine mögliche bakterielle oder Pilz-Kontamination der Schnitte zu verhindern wurden sie 20min in einer hochprozentigen Antibiotika-Lösung (KHB-Puffer; 6,5% (v/v) Pen/Strep; 2% (v/v) Gentamicin) auf Eis (4°C) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte entweder separat in einer 12Well-Platte mit 2ml Vollmedium (s.u.) bei 37°C und 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert oder für Referenzanalysen in 4% Formalin fixiert bzw. in flüssigem Stickstoff konserviert. Es wurden jeweils drei Gewebeschnitte einer Probe für weitergehende Analysen vereint und aufgearbeitet.

Vollmedium (Lagerung bei 4°C):

500ml D-MEM/F12-Medium (Gibco, Invitrogen); 10% (v/v) FCS; 2mM L-Glutamin; 5µg/ml Transferrin; 12,5µg/ml Fetuin; 1% (v/v) MEM-Vitamine; 20µg/ml Insulin; 1% (v/v) Pen/Strep; 0,2% (v/v) Gentamicin; 0,75µg/ml Amphotericin B (Fungizone®)

2.3.2.2 Kultivieren der Zelllinie HT29

Die verwendeten Zellen wurden in Multiwellschalen (Sarstedt), Kulturschalen (Corning) bzw. Kulturflaschen aus Polystyrol (175cm², 75cm², 25cm²; Sarstedt) im Kulturmedium D-MEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

Zur Subkultivierung der Zellen wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden kurz mit einigen Millilitern D-PBS (PAA) gespült. Die Kulturoberflächen wurden anschließend mit 40µl/cm² einer Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco™ Invitrogen) versetzt. Nach Ablösung und Waschen der Zellen im Kulturmedium (D-MEM (Gibco™ Invitrogen); 10% (v/v) FCS; 1% (v/v) Pen/Strep) wurden sie in einer Dichte von 1,25 x 10³ bis 1,25 x 10⁴ pro cm² ausgesät und im Zellkulturbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.3.2.3 Herstellung und Kultivierung von primären Zellen aus kolorektalem Adenokarzinom

Das frische Gewebe wurde wie für die Herstellung von Gewebeschnitten bis zur Aufarbeitung (maximal 4h nach der operativen Entnahme) in Transportmedium bei 4°C gelagert, gewogen und das Gewicht, die Größe und die Beschaffenheit notiert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe mit Hilfe einer Schere mechanisch zerkleinert. Die enzymatische Zerkleinerung erfolgte mit 10ml Collagenase-Lösung (0,2% (w/v) in D-PBS, Serva) 30min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit (bei kleinen Gewebestücken bis etwa 3g waren 5ml Collagenase-Lösung ausreichend). Der dadurch gewonnene Gewebebrei wurde durch ein Sieb mit 0,4mm-Maschenweite („Cell dissociation sieve - Tissue Grinder kit“; Sigma) gegeben und mit 10-20ml Vollmedium (s. 2.3.2.1) nachgespült. Diese Zellsuspension wurde durch ein oder mehrere 100µm- und anschließend 70µm-Zellsiebe („Cell Strainer“; BD Biosciences) gegeben, und durch Zentrifugation 3min bei 500 x g gewaschen. Wenn deutlich mehr als die Hälfte der anfänglichen Menge von Gewebebrei im Sieb zurückgeblieben war, wurde diese Prozedur der enzymatischen Zerkleinerung und Zellvereinzelnung ein- bis zweimal wiederholt und die Zellen der vorherigen Durchgänge solange in Vollmedium bei 4°C gelagert. Nach dem Vereinen der Zellen aller Durchgänge wurden sie in 5ml D-PBS gewaschen, die Erythrozyten durch 10-15min Inkubation bei RT in 2ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (Dako) entfernt und nochmals gewaschen. Das Zell-Pellet wurde in 5-10ml Vollmedium suspendiert und die Zellzahl und die Vitalität (s. 2.3.2.6) bestimmt. Die primären Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 pro cm² in frischem Vollmedium in Collagen-beschichteten ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) Kulturgefäßen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Subkultivierung der primären Zellen wurde ebenso wie für Zelllinien verfahren. Nach Ablösung und Waschen der Zellen wurden sie in Vollmedium resuspendiert und wie zuvor in einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 pro cm² erneut in frischem Vollmedium ausgesät und kultiviert.

2.3.2.4 Herstellung von Sphäroiden

Zur Herstellung von Sphäroiden wurden Zelllinien, primäre Zellkulturen aus Langzeit- und Kurzzeit-Kulturen eingesetzt und die Methode des „hängenden Tropfens“ angewandt. Es wurde für jede Sphäroidkultur eine Zellsuspension mit einer Dichte von 5×10^4 /ml Vollmedium angesetzt. Auf den umgedrehten Deckel einer Petrischale wurden 50 Tropfen à 20µl (= 1×10^3 Zellen) pipettiert. Der Deckel wurde auf die ge-

gen Austrocknung mit 10ml D-PBS gefüllte Petrischale gestülpt, so dass die Tropfen frei am Deckel über dem D-PBS hingen. Die Entstehung und das Wachstum der kugeligen Zellaggregate (Sphäroide), die durch die im Tropfen herabsinkenden Zellen gebildet wurden, wurden mikroskopisch verfolgt.

2.3.2.5 Collagen-Beschichtung von Kulturoberflächen

Für ein optimales Wachstum der primären Zellen wurden die Kulturgefäße mit einer Konzentration von $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Collagen (rat tail; Roche) beschichtet. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen eine 2mg/ml-konzentrierte Collagen-Stammlösung in 0,2% (v/v) Essigsäure angesetzt. Die Collagen-Stammlösung oder eine Verdünnung in 0,2% (v/v) Essigsäure wurde auf die Böden (Wachstumsflächen) der Kulturgefäße pipettiert: Multiwellschalen (Sarstedt), Kulturschalen (Corning) bzw. Kulturflaschen aus Polystyrol (75cm^2 , 25cm^2 ; Sarstedt). Mit einem Zellschaber bzw. durch seitliches Klopfen gegen die Platte wurde die Collagen-Lösung gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Gefäße für mehrere Stunden unter der Sterilwerkbank getrocknet. Die Lagerung der Collagen-beschichteten Kulturgefäße und Collagen-Lösungen erfolgte bei 4°C .

2.3.2.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. In der Kammer sind neun Großquadrate aus je 16 Kleinquadraten markiert. Ausgezählt wurden die Zellen in vier Großquadraten und mit folgender Formel die Zellzahl pro Milliliter berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl in vier Großquadraten} : 4) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Zur Bestimmung der Vitalität wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (10% (v/v)) versetzt. Die Vitalität berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Prozentanteil vitaler Zellen} = 100\% - (\text{Zahl der gefärbten Zellen} : \text{Gesamtzahl} \times 100)$$

2.3.2.7 Behandlung mit Chemotherapeutika und anderen therapeutischen Substanzen

Zelllinie und primäre Zellen in Langzeit-Kultur

Nach adhärentem Anwachsen der Zellen (nach ca. 24h nach Aussaat oder nach Erreichen einer Konfluenz von 30-45%) wurde das Kulturmedium entfernt und durch Therapeutika-versetztes Kulturmedium im selben Volumen (Einsatzkonzentrationen s. Tab. 1 und Tab. 2 , 2.1.4) ersetzt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit DMSO-versetz-

tem Kulturmedium inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen der höchsten Konzentration, die durch die verwendeten Therapeutika und Kombinationen vorgegeben wurden.

primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur

Die primären Zellen in Kurzzeit-Kultur wurden behandelt, wenn sie eine Konfluenz von 20-40% erreicht hatten. Wenn diese nicht nach 24h bis 72h erreicht war, wurden die Kulturen nicht verwendet. Die Behandlung und der Austausch des Mediums erfolgten bei den primären Zellen ebenso wie bei den Zelllinien.

Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden nach Herstellung 20-24h kultiviert. Wenn die Kulturen keine erkennbare Kontamination aufwiesen, konnten sie behandelt werden. Die Behandlung erfolgte wie bei den anderen *In vitro*-Kulturen durch einen kompletten Mediaumaustausch.

2.3.2.8 BrdU-Inkorporation zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellkulturen

Die Proliferationsrate von Zellen wurde durch BrdU-Inkorporation analysiert. BrdU, 5-Brom-2-desoxyuridin, ist ein Uridin-Derivat, das während der Synthesephase der DNA-Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird (Inkorporation). Hierfür wurden die kultivierten Zellen 24h vor der Proliferationsanalyse mit 20µM BrdU (Endkonzentration im Kulturmedium) versetzt und bis zum Messzeitpunkt inkubiert. Das in die DNA integrierte BrdU wurde im Weiteren von einem spezifischen anti-BrdU-Antikörper (Molecular Probes, Invitrogen) erkannt, der mit der Methode der Immunfluoreszenz mikroskopisch sichtbar gemacht wurde (s. 2.3.4.10 und 2.3.4.11). Für jede Probe wurden mindestens drei Wells mit und eines ohne BrdU für eine komplette Färbung vorgesehen sowie ein Well mit BrdU für die Zweitantikörperkontrolle.

2.3.2.9 Diffusionsanalysen an Gewebeschnitten

Die Gewebeschnitte wurden nach Herstellung 1-2h vorkultiviert und mit 30µM eines Diffusions- und Lebendsystemfarbstoffs „5-(und-6)-carboxyeosin diacetat, succinimidyl ester“ (Molecular Probes, Invitrogen) 3h bis 15h im Dunkeln inkubiert. Es handelt sich um ein 0,87 kDa schweres Eosinderivat, das passiv durch die Zellen hindurch diffundiert. Von in den Zellen befindlichen aktiven Esterasen werden die beiden

Acetat-Gruppen abgespalten, wodurch der Farbstoff unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 488nm bis 524nm Wellenlänge im grünen Bereich fluoresziert. Nach erfolgter Inkubation mit dem Farbstoff wurden die Schnitte in flüssigem Stickstoff konserviert. Anschließend wurden mit einem Kryostaten möglichst rasch 5µm-dicke Querschnitte der Gewebeschnitte hergestellt, auf Glasobjektträgern mit 3,7% (w/v) Formaldehyd in Methanol 15min fixiert und die Zellkerne mit einer in D-PBS 1:10.000-verdünnten Hoechst 33342-Lösung angefärbt. Die Objektträger wurden mit wässrigem Eindeckmedium Fluoromount G (Southern Biotech; Birmingham, AL, USA) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.3.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

aus Gewebe

Die Gesamt-RNA wurde sowohl aus Gewebestücken gewonnen, die als Referenzgewebe direkt nach den Operationen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, als auch aus kultivierten bzw. behandelten Gewebeschnitten, die ebenfalls nach Ablauf der zu analysierenden Zeitspanne in flüssigem Stickstoff konserviert wurden. Sie wurde mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi ^[86] und – wie in Spruessel et al. ^[87] beschrieben – isoliert. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

aus Zellen

Die Gesamt-RNA wurde aus kultivierten Zelllinien und primären Zellen (s. 2.3.2.2 und 2.3.2.3) gewonnen, indem jeweils das Medium vorsichtig, ohne die Zellen abzulösen, aus den Kulturgefäßen entfernt wurde. Die Gesamt-RNA wurden direkt in den Kulturgefäßen aus den Zellen isoliert. Sie wurde auf die zur Isolation aus Gewebe beschriebene Vorgehensweise gewonnen und gelagert.

2.3.3.2 cDNA-Synthese

cDNA-Synthese für DualChip™-Microarray (Eppendorf)

Die cDNA-Synthese für die Messung von DualChip™-Microarrays von Eppendorf wurde mit der „indirekten Labeling“-Methode durchgeführt. Eine Menge von 5µg Gesamt-RNA, zuvor aufgereinigt (s. 2.3.3.4), wurde verwendet und nach dem Handbuch „DualChip™ microarrays Instruction Manual Version 1.0“ (Eppendorf,

Hamburg) mit den Nukleotiden Biotin-11-dCTP und Biotin-11-dATP und dem Kit „cMasterR RT Labeling“ (Eppendorf, Hamburg) zu cDNA transformiert. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

cDNA-Synthese für Affymetrix-Microarray

Zur cDNA-Synthese für Affymetrix-Microarrays wurden jeweils ca. 3µg Gesamt-RNA, zuvor gereinigt (s. 2.3.3.4), verwendet. Die Erststrang- und anschließende Zweitstrangsynthese fand nach dem in Spruessel et al. ^[87] beschriebenen Protokoll statt. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss ebenfalls aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

2.3.3.3 cRNA-Synthese

Die cRNA-Synthese wurde durch „*In vitro* transcription“ (IVT) unter Einbau von Biotin-markierten Nucleotiden (Biotin-11-CTP und Biotin-16-UTP) zur Microarray-Analyse (Affymetrix, s. 2.3.3.8) verwendet. Zur Synthese wurde je Probe die Hälfte der gewonnenen und aufgereinigten cDNA benutzt (s. 2.3.3.2 und 2.3.3.4). Das Volumen von ca. 12µl cDNA-Lösung wurde in 0,2ml-PCR-Röhrchen überführt. Hierfür wurde das „IVT Labeling Kit“ („GeneChip[®] One-Cycle Target Labeling and Control Reagents“, Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet und die Synthese wie im Handbuch angegeben durchgeführt. Die synthetisierte cRNA wurde im Anschluss aufgereinigt und die Konzentration und Qualität bestimmt.

2.3.3.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Aufreinigung von RNA

Die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Kits „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen). Die Aufreinigung erfolgte nach Vorgabe des Handbuches (Qiagen). Anschließend wurde die Konzentration bestimmt.

Aufreinigung von cDNA

Die doppelsträngige cDNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde mit Hilfe des Kits „Phase Lock Gel™“ (PLG) (Eppendorf) nach Vorgaben des Handbuches durchgeführt. Die hierdurch isolierte cDNA wurde durch Ethanol-Präzipitation weiter gereinigt. Es wurden $\frac{1}{2}$ Ansatzvolumen einer 7,5M Ammoniumacetatlösung und $\frac{5}{2}$ Ansatz-

volumen 100% eiskalten (-20°C) Ethanols hinzugegeben. Zur besseren Präzipitation wurde 1µl (5µg/µl) Glykogen zugegeben und bei 14.000 x g 20min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 500µl 80% (v/v) kaltem (-20°C) Ethanol bei 14.000 x g 5min gewaschen. Das Pellet wurde anschließend an der Luft getrocknet und danach in ca. 12µl RNase-freiem H₂O (Qiagen) resuspendiert. Die cDNA-Lösung wurde danach bei -80°C aufbewahrt.

Aufreinigung von cRNA

Zur Aufreinigung der synthetisierten cRNA (s. 2.3.3.3) wurde das Kit „Sample Cleanup Module“ entsprechend des „GeneChip[®] Expression Analysis Technical Manual“ (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet. Die cRNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.3.3.5 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von RNA, cRNA, DNA oder cDNA in einer wässrigen Lösung wurden mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Nukleinsäuren haben eine hohe optische Dichte (OD) bei 260nm Wellenlänge. Bei der Wellenlänge von 260 und 280nm eines polarisierten Laserstrahls wurde die Extinktion oder OD (der Quotient aus einfallender und ausfallender Lichtintensität) gemessen. Bei 280nm weisen Proteine eine hohe optische Dichte auf, weshalb diese Messung zur Reinheitsbestimmung verwendet wurde.

Nach Bestimmung des Leerwertes (dH₂O) wurden beide Wellenlängen vermessen. Die Proben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen gemessen und die Konzentration nach folgenden Formeln bestimmt:

Konzentration der DNA

$$\text{Konzentration in } \mu\text{g/ml} = \text{OD}_{260} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Konzentration der RNA

$$\text{Konzentration in } \mu\text{g/ml} = \text{OD}_{260} \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der Nukleinsäuren wird durch das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ (Nukleinsäuremenge/Proteinmenge) beschrieben. Dieses sollte für DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen, für RNA waren auch Werte von 1,6 akzeptabel.

2.3.3.6 Qualitätskontrolle der RNA / cRNA-Qualität mittels Agilent-Chips

Die Qualität und die Quantität von RNA- und cRNA-Proben wurden mittels des Agilent RNA 6000 Nano Kits nach Vorgaben des Handbuches bestimmt.

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde in ng/µl angegeben. Die Berechnung erfolgte hierbei über die Intensitäten der 18S- und 28S-RNA-Banden. Die Verdünnungen der Proben wurden anschließend eingerechnet. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde über die „RNA Integrity Number“ (RIN) angegeben. Diese bezieht sich auf eine möglichst saubere Trennung der 18S- und 28S-RNA-Peaks und kann einen maximalen Wert von 10,0 erreichen. Ab einer RIN von $\geq 7,0$ wurde die Qualität der Gesamt-RNA als gut beurteilt und für weitere Analysen verwendet.

Die Konzentration der cRNA wurde wie die der Gesamt-RNA in ng/µl angegeben. Die Berechnung erfolgte hierbei über die Fläche unter dem Graphen. Die Verdünnungen der Probe wurden ebenfalls anschließend eingerechnet. Die Qualität der cRNA wurde über die RNA-Länge beurteilt. Ab einem Kurvenmaximum von ≥ 1000 Nukleotiden wurde die Qualität der cRNA als gut bewertet und für weitere Analysen verwendet.

2.3.3.7 Real-time PCR

Die Real-time PCR bietet die Möglichkeit der Quantifizierung, die Mengen der eingesetzten cDNA absolut oder in Relation zueinander zu identifizieren. Es werden sense- und antisense-Primer verwendet sowie eine dritte an einen Fluoreszenzmarker gekoppelte Probe. In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan[®]-Proben verwendet, an die der Fluoreszenzmarker Fluorescein und ein Quencher (Tamra) gebunden waren. Die TaqMan[®]-Proben binden auf dem sense-Strang zwischen den PCR-Primern. Wird durch die hitzestabile Polymerase im Verlaufe der PCR von einem Primer aus die TaqMan[®]-Probe erreicht, baut die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Polymerase die TaqMan[®]-Probe ab, und die so frei gewordene Fluoreszenz wird durch eine Kamera nach jedem Amplifikationsschritt festgehalten. Durch den Ct-Wert (Threshold-Cycle), den Zyklus, bei dem die Kurve den Schwellenwert überschreitet, wird unter Verwendung eines Referenzgens die Menge der eingesetzten cDNA bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen *PPIA* (Cyclophilin A) verwendet. Als weitere Gene wurden *FOS* (c-fos) und *HIF1A* (HIF-1 α) vermessen (Pipettierschema s. Tab. 10). Für jedes in der Real-time PCR verwendete Gen und die Wasserkontrollen wurden Doppelbestimmungen vermessen.

Tab. 10: Pipettierschema für Real-time PCR

Cyclophilin A / c-fos / HIF-1 α (20 μ l): mit jeweils spezifischen Primern und TaqMan[®]-Probe

2,5 μ l 10x PCR-Puffer Gold

4 μ l / 3 μ l / 3 μ l 25 mM MgCl₂ (Cyclophilin A / c-fos / HIF-1 α)

2 μ l 10 mM dNTPs

3 μ l 7,5 pmol/ μ l sense-Primer (s. 2.1.7, Tab. 5)

3 μ l 7,5 pmol/ μ l antisense-Primer (s. 2.1.7, Tab. 5)

2 μ l 2,5 pmol/ μ l Fam-TaqMan[®] (s. 2.1.7, Tab. 5)

3,25 μ l / 4,25 μ l / 4,25 μ l dH₂O (Cyclophilin A / c-fos / HIF-1 α)

0,25 μ l AmpliTaq Gold

In jedes verwendete Well einer 96Well-PCR-Platte wurden 20 μ l des jeweiligen Ansatzes pipettiert und anschließend 5 μ l cDNA (cDNA-Erststrangansätze mindestens 1:10 verdünnt) hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer selbstklebenden durchsichtigen Folie bedeckt und kurz zentrifugiert. Danach wurde die PCR im iCycler unter Verwendung des Programmes "iCycler" (beides von BIO-RAD) mit folgendem Protokoll (s. Tab. 11) durchgeführt.

Tab. 11: PCR-Protokoll

Zyklus	Schritt	Temperatur	Zeit [min]
1 (1x)	1	95°C	5:00
2 (60x)	1	95°C	0:30
	2	58°C	0:30
	3	72°C	0:30
3 (1x)	1	15°C	∞

Die Wasserkontrolle sollte keine Fluoreszenz zeigen bzw. den Schwellenwert nicht überschreiten. Wenn die Wasserkontrolle mindestens 15 Ct-Werte von den Probenwerten entfernt lag und die Doppelbestimmungen maximal 1,0 voneinander abwichen, wurden die relativen Expressionen mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode von Livak und Schmittgen^[88] berechnet.

2.3.3.8 Microarray

Die Microarray- oder Mikrochipanalyse basiert auf dem Hybridisierungsvermögen von Nukleinsäuren mit übereinstimmender Sequenz. Sie wird allg. zur Sequenzierung bestimmter Nukleinsäureabschnitte oder, wie im vorliegenden Fall, zur Genexpressionsanalyse verwendet. Auf einem Glas- oder Silizium-Chip sind cDNA oder Oligonukleotide in definierter Anordnung gekoppelt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen basieren zum einen auf der DualChip™-Methode von Eppendorf (Hamburg) und auf der von Affymetrix (Santa Clara, USA) entwickelten Methode.

DualChip™ (Eppendorf)

Die "DualChip™ human breast cancer version 1.0 low-density DNA" Chips (Eppendorf, Hamburg) wurden zur Genexpressionsanalyse und zum Vergleich von primären Zellen in Langzeit-Kultur mit geringer und hoher Passagenzahl verwendet. Auf jedem Chip sind 223 Gene repräsentiert, die bekannt sind für ihre Beteiligung an der Tumorbildung und -entwicklung. Als Material wurden die für diese Analyse hergestellten Biotin-markierten cDNA-Proben („indirektes Labeling“) verwendet (s. 2.3.3.2 *cDNA-Synthese für DualChip™-Microarray (Eppendorf)*). Die Hybridisierung der Proben auf den Chips, die Waschschrte, die Detektionsreaktionen mit Biotinspezifischen Cy3- und Cy5-gekoppelten Antikörpern (Dianova, Hamburg) sowie das Scannen der Chips mit dem Gerät „ScanArray® Lite“ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) mit drei Photomultiplier-Einstellungen (niedrig, mittel, hoch) und einer Auflösung von 10µm erfolgte nach den Vorgaben des Handbuchs „DualChip™ microarrays Instruction Manual Version 1.0“ (Eppendorf, Hamburg). Die Datenanalyse inklusive Rohdaten-Transformation, Daten-Selektion, Mittelwertberechnung und Zweischritt-Normalisierung, basierend auf der mittleren Intensität von unveränderten Haushaltsgenen, wurde mit der Software „DualChip evaluation software 1.1.0“ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Analysenproben zu bestimmen, wurde eine Schätzung der erwarteten Abweichungen und Ermittlung eines 95%-Vertrauensintervalls - wie von de Longueville et al. ^[89] beschrieben - vorgenommen.

HG-U133A Plus 2.0 (Affymetrix)

Die „high-density“ Chips HG-U133 Plus 2.0 von Affymetrix wurden zur Genexpressionsanalyse von Kurzzeit-kultivierten primären Zellkulturen und Gewebeschnitten

verwendet. Auf jedem Chip sind ca. 1.300.000 Genfragmente in 54.120 Proben-sätzen gekoppelt. Diese repräsentieren 38.572 Gene des Menschen und insgesamt 47.401 Transkriptionsvarianten mit 6.285 nicht eingeordneten Genen, wobei jeweils beide komplementären Sequenzen eines Fragments und Fragmente mit Punktmuta-tionen vorhanden sind. Jedes verwendete Gen wird durch Oligonukleotide von 25 bp Länge repräsentiert.

Zur Detektion der Expressionsraten wurde die cRNA verwendet, die während der nach Handbuch erfolgenden Synthese (s. 2.3.3.3 *cDNA-Synthese für Affymetrix-Microarray*) mit Biotin markiert wurde. Die cRNA-Fragmentierung, die Mikrochip-Beladung und Messung sowie die Rohdaten-Analyse wurde vom RZPD (Berlin) durchgeführt. Verwendet wurde hierfür die „GeneSpring“-Software (Affymetrix). Die statistischen Auswertungen wurden mit der „ArrayAssist“-Software (Statagene), Gen-Ontologie-Analysen mit „OntoExpress“ sowie „Pathway-Express“ der Wayne State University^[90, 91] durchgeführt.

2.3.4 Proteinbiochemische Methoden

2.3.4.1 Extraktion von Proteinen

Zur Aufarbeitung und Extraktion der Proteine aus Zellkulturen und Gewebeschnitten wurde ein Lysispuffer (s.u.) verwendet und auf Eis gearbeitet.

Lysispuffer (Lagerung bei -80°C):

20 mM Tris; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% (v/v) Triton X-100; 1% (v/v) Protease-Inhibitor (CompleteTM mit EDTA; Roche); 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor 1 (Sigma); 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor 2 (Sigma); pH 7,5

Zellkulturen

Zur Extraktion der Proteine aus Zellkulturen wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Wachstumsoberfläche entfernt, in D-PBS gewaschen und anschließend auf Eis lysiert. Im Falle des Medikamententests wurden die primären Zellen in 96Well-Platten kultiviert. Zur Extraktion der Proteine wurde der Mediumüberstand vorsichtig abgesaugt und 20µl Lysispuffer pro Well direkt zugegeben, kurz geschüttelt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden durch Kratzen und Auf- und Abpipettieren mit einer kleinen Pipettenspitze die Zellen vollständig aufgeschlos-

sen und das Lysat in 1,5ml-Röhrchen überführt. Hierbei wurden die Lysate von 3-8 Wells (eine Probe) vereint.

Gewebeschnitte

In dickwandige 2ml-Röhrchen (SafeSeal; Eppendorf) wurden 200µl Lysispuffer und eine rostfreie Stahlkugel von 4mm Durchmesser vorgelegt. Je Probe wurden drei in flüssigem Stickstoff konservierte Gewebeschnitte hinzugefügt und durch Rütteln bei 30Hz 2min in der Schwingmühle MM300 Retsch® (Qiagen) vollständig homogenisiert. Nach der Homogenisation wurde ggf. noch Lysispuffer hinzugegeben, die Proben 30min auf Eis inkubiert.

Alle Proteinlysate wurden nach der Inkubation auf Eis bei 16.000 x g und 4°C 10min zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde in neue 1,5ml-Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (s. 2.3.4.2) bestimmt. Die Proben wurden entweder sofort für weitere Analysen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.4.2 Proteinkonzentrationsmessung mittels BCA-Assay

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) ist eine Abwandlung des Lowry-Assays^[92]. Statt des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz wird BCA verwendet, das ebenfalls mit Cu⁺-Komplexen einen starken Farbkomplex ausbildet. Dieser Test wurde verwendet, da er nicht so störanfällig gegenüber anderen Reagenzien ist wie der Lowry-Assay und in kurzer Zeit in einer 96Well-Platte durchgeführt werden kann. Das Reagenz A (Sigma) und das Reagenz B (4% (w/v) CuSO₄) wurden verwendet und die Messung nach Standard-Protokoll^[92] durchgeführt. Als Eichreihe dienten BSA-Verdünnungen von 1,5 – 1,2 – 0,8 – 0,5 – 0,2 und 0,1mg/ml. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3.4.3 Messung des ATP-Gehaltes

Die Messung des ATP-Gehaltes in Zellen und Gewebe fand mit dem „ATPlite™ Luminescence Kit“ nach den Vorgaben des Handbuchs „ATPlite™ 1step Luminescence Assay System“ (PerkinElmer) statt, das die Chemilumineszenzerzeugung einer Luziferase in Abhängigkeit der aus Zellen oder Gewebe bereitgestellten ATP-Moleküle misst. Da ATP ein essentieller Faktor für fast alle Zellfunktionen von Zellzyklus über Metabolismus bis hin zu Überlebenssteuerungen ist, stellt ATP ein messbares Indiz für die Vitalität jeder einzelnen Zelle dar.

Im Gegensatz zu Zellen, die direkt im Kulturmedium lysiert und vermessen werden konnten, mussten Gewebestücke bzw. -schnitte zunächst zu Homogenaten aufgearbeitet werden. Drei in flüssigem Stickstoff eingefrorene Gewebeschnitte von 400µm-Dicke bzw. Gewebestücke ähnlicher Größe wurden mit 100µl Homogenatlösung A (70% (v/v) Methanol, 2mM EDTA) und einer Stahlkugel in 2ml-Röhrchen (SafeSeal; Eppendorf) 2min bei 30Hz in einer Schwingmühle (Retsch[®], Qiagen) homogenisiert. Nach Zugabe von 900µl Homogenatlösung B (0,1M Tris, 2mM EDTA) und kurzem Mischen wurden die Gewebehomogenate zur vollständigen Lyse und Messung des ATP-Gehaltes verwendet.

Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte nach RLU („relative light units“) mit dem ELISA-Gerät FluoSTAR Optima (BMG) in 96Halbwell-Platten, so dass sämtliche Volumina halbiert werden konnten. Vermessen wurden jeweils mindestens Dreifachbestimmungen. Behandlungsunterschiede wurden durch relative Änderungen zu den Behandlungskontrollen berechnet. Bei der Verwendung von Gewebe wurde der gemessene ATP-Gehalt zuvor auf den Proteingehalt des Homogenates durch BCA-Bestimmung (s. 2.3.4.2) abgeglichen.

2.3.4.4 Messung des Gehaltes von aktiver Caspase 3/7

Die Messung der aktiven Caspase 3/7 in Zellen und Gewebe fand nach den Vorgaben des Herstellerhandbuches mit dem „Caspase-Glo 3/7-Kit“ (Promega) statt, das ebenfalls die Chemilumineszenzerzeugung einer Luziferase misst. Die Abhängigkeit zur Aktivität der Caspasen 3/7 wird hierbei durch ein Caspase-Substrat erzeugt, das mit einem Luziferin-Derivat gekoppelt ist. Erst wenn ein aktives Caspase 3- oder 7-Molekül das Substrat vom Luziferin abspaltet, kann dieses von der Luziferase unter Freisetzung von Chemilumineszenz umgesetzt werden.

Im Gegensatz zu Zellen, die direkt im Kulturmedium lysiert und vermessen werden konnten, mussten auch hier wie zur ATP-Bestimmung (s. 2.3.4.3) Gewebestücke bzw. -schnitte zunächst zu Homogenaten aufgearbeitet werden. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte nach RLU mit dem ELISA-Gerät FluoSTAR Optima (BMG) in 96Halbwell-Platten, so dass sämtliche Volumina halbiert werden konnten. Die Behandlungsunterschiede wurden – wie bei der Analyse des ATP-Gehaltes – errechnet. Bei der Verwendung von Gewebe wurde der gemessene Gehalt an aktiver Caspase 3/7 zuvor auf den Proteingehalt des Homogenates durch BCA-Bestimmung (s. 2.3.4.2) abgeglichen. Es wurden jeweils mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gelen (Invitrogen) nach zugehörigem Protokoll durchgeführt. Verwendet wurden Gele mit 10% Bis-Tris und Gradientengele von 4-12%. Die aufzutragenden Proben (50-100µg Gesamtprotein) wurden mit 4x reduzierendem Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und 10min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden sie auf ein Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand mit dem MES-Puffer (Invitrogen) 30min bei 200V in einer „XCell SureLock™“-Laufkammer (Invitrogen) statt, der eine besonders gute Auftrennung von Proteinen kleinerer Massen ermöglicht.

2.3.4.6 Western Blot

Der Western-Blot wurde mit der Tank-Blot-Methode des „XCell IITM Blot Module“ (Invitrogen) und der „XCell SureLock™“-Laufkammer (Invitrogen) durchgeführt. Vor dem Blot wurde eine PVDF-Membran (Millipore; Billerica, MA, USA) für jedes Gel kurz (2s) in Methanol, dann 5min in ddH₂O und anschließend 1min in 1x Transferpuffer (Invitrogen) äquilibriert. Nach der Gelelektrophorese wurde der Transfer gemäß Invitrogen-Protokoll mit Transferpuffer, der 20% (v/v) Methanol enthielt, durchgeführt.

2.3.4.7 Immunprinting von Western Blots

Nachdem die Proteine aus dem Gel im elektrophoretischen Transfer auf die Membran übertragen wurden, wurden die gesuchten Proteine mittels Immundetektion auf der Membran analysiert. Das Immunprinting erfolgte nach Standardmethoden, wobei der Waschpuffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,3% (v/v) Tween 20) sowie der Blockierungspuffer (5% (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer) verwendet wurde und die Erstantikörper bei 4°C ü.N., die Zweitantikörper 2h bei RT inkubiert wurden (Verdünnungen s. 2.1.5). Die Detektion erfolgte mit der Chemilumineszenz-Methode. Als Chemilumineszenz-Substrat wurde das SuperSignal® West Dura Trial Kit (Pierce) verwendet. Die Chemilumineszenz wurde entweder im Dunkeln durch Belichtung eines Röntgenfilms detektiert, der bei Rotlicht entwickelt (GBX-Entwickler; Kodak), fixiert (GBX-Fixierer; Kodak) und nach kurzem Waschen in dH₂O an der Luft getrocknet wurde, oder im Geldokumentationssystem mit einer Lichtsensitiven Kamera (Diana II, raytest®, Straubenhardt), die direkte Fotoaufnahmen von den Membranen produziert.

2.3.4.8 Multi-funktionaler ELISA

Um in geringen Volumina und Proteinmengen möglichst viele Proteine bestimmen zu können, wurde die folgende Methode von Meso Scale Discovery (MSD) verwendet.

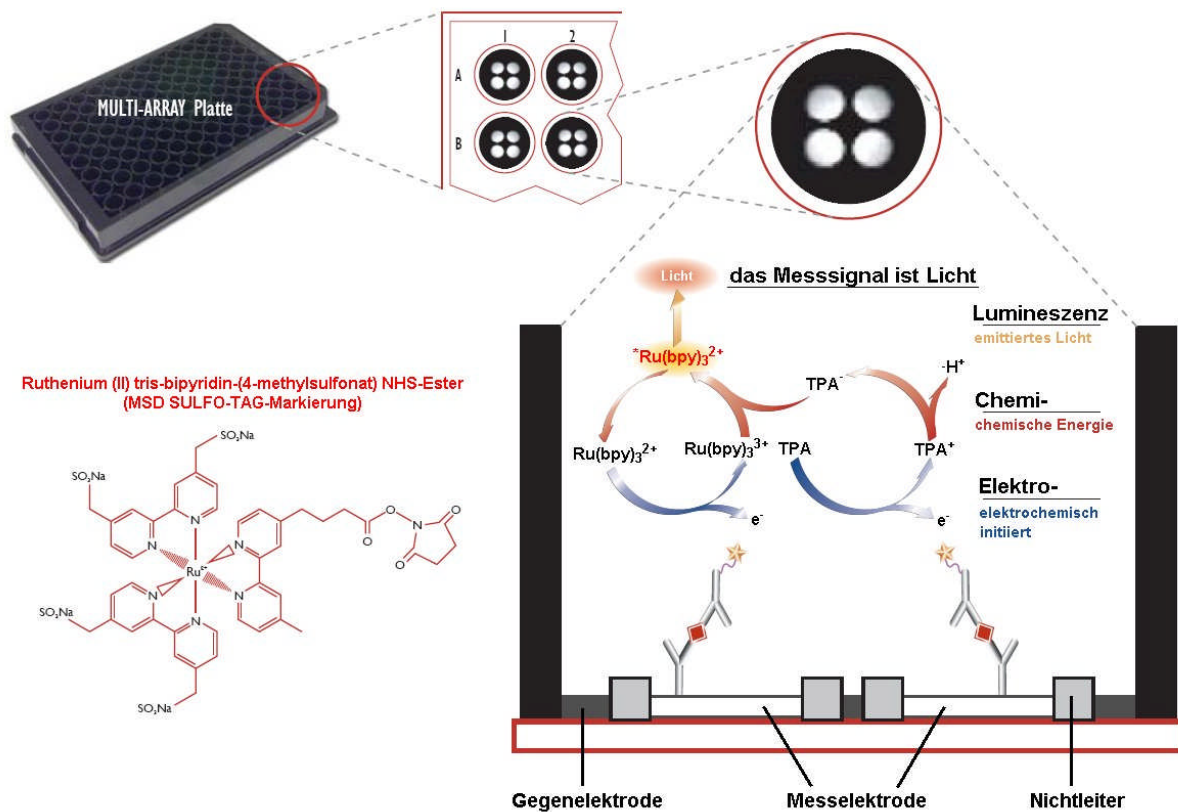


Abb. 3: Schema des multi-funktionalen ELISA (modifiziert nach Meso Scale Discovery)

Es handelt sich hierbei um ein ELISA-System von an Multiwellplatten gekoppelten „Fänger-Antikörpern“ (1. „Sandwich“-Schicht), die aus den aufgetragenen Lysaten die entsprechenden Antigene binden (2. „Sandwich“-Schicht). Diese werden im Folgenden von „Erkennungs-Antikörpern“ in einer speziellen Antikörper-Lösung erkannt und gebunden (3. „Sandwich“-Schicht). An diese Antikörper der dritten Schicht ist ein aromatischer Komplex, ein Ruthenium(II)-tris-bipyridin-(4-methylsulfonat)-NHS-ester („SULFO-TAGTM“), gekoppelt. Da der Boden der Multiwellplatten aus einer Karbonbeschichteten Folie besteht, wird der Strom, der vom MSD Sector Imager 6000 angelegt wird, zu den einzelnen Wells geleitet und erreicht den aromatischen Komplex, dessen Elektronen daraufhin angeregt werden und beim Zurückfallen in ihren ursprünglichen Energiezustand Licht abstrahlen (s. Abb. 3). Dieses Licht wird von einer sensitiven Kamera eingefangen und in RLU vermessen. Je mehr Protein-Antigen gebunden werden konnte, desto mehr aromatische Komplexe sind über die „Erkennungs-Antikörper“ vorhanden und desto mehr Licht wird abgestrahlt. Der

Vorteil dieser Methode liegt darin, dass in einem Well einer 96Well-Platte bis zu zehn einzelne Karbonfelder liegen können, auf denen jeweils ein anderer Antikörper gegen ein anderes Protein gekoppelt werden kann. Pro Well reichen ein Volumen von 25µl Proteinlösung und eine Proteinmenge von ca. 3-5µg, um gleichzeitig bis zu zehn unterschiedliche Proteine semi-quantitativ bestimmen zu können.

Zur Vermessung von Proteinlysaten wurden die in 2.1.9 aufgeführten Kits der Herstellerfirma MSD verwendet und die Messung nach den jeweiligen Protokollen durchgeführt. Zunächst wurden die benötigten Wells der 96Well-Platte ausgewählt und die nicht benötigten abgeklebt. Von den zu vergleichenden Proben wurden gleiche Proteinmengen (3-5µg) verwendet und mit dem Lysispuffer jeweils auf 25µl aufgefüllt. Es wurden von jeder Probe Doppelbestimmungen vermessen. Die Behandlungsunterschiede wurden anhand der relativen Änderungen im Vergleich mit den Behandlungskontrollen bestimmt.

2.3.4.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde dazu verwendet, den Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR an der Oberfläche der Zellen sichtbar zu machen und seinen quantitativen Anteil an den Zellpopulationen festzustellen. Hierfür wurden für jede Probe $1-5 \times 10^5$ Zellen benötigt. Die Zellen wurden auf Eis mit einem anti-EGFR-Antikörper, einem anti-Maus-Antikörper, Fluoreszein-gekoppelt, (Verdünnungen s. 2.1.5) inkubiert, gewaschen, bis zur Messung in 500µl FACS-Puffer (1% (w/v) BSA in D-PBS) aufgenommen und im Dunkeln und auf Eis gelagert. Die Durchflusszytometrie-Messungen fanden mit einem FACS Calibur Gerät (BD Biosciences) und mit den entsprechenden Puffern statt. Es wurden jeweils die Parameter des „Forward Scatters“ und des „Side Scatters“ anhand von unbehandelten Zellen eingestellt. Für die eigentlichen Messungen wurden jeweils 10.000 Zellen gezählt, die Fluoreszein-Intensität bei 488nm mittels des Argonlasers vermessen und mit der Software CellQuest Pro (BD Biosciences) analysiert.

2.3.4.10 Histologie

HE-Färbung

HE-Färbung steht für Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Hämatoxylin färbt die Zellkerne blau an, wohingegen Eosin die restlichen Bereiche der Zellen und der Zellzwischenräume im Gewebe rosa anfärbt. Die Färbung dient dazu, die Gewebestrukturen erkennbar zu machen und Aussagen über Bereiche mit Tumorzellen, die Vitalität und

Zusammensetzung treffen zu können. HE-Färbungen wurden an in Paraffin eingebettetem Gewebe, an Kryogewebe sowie an Sphäroiden durchgeführt.

Von den Paraffinblöcken wurden 5µm-dicke Schnitte mit Hilfe eines Microtoms, von Kryogewebe 5µm-dicke Schnitte mittels Kryostat hergestellt und auf Objektträger aufgetragen. Das in Paraffin konservierte Gewebe wurde entparaffiniert und rehydriert. Das Kryogewebe wurde in Aceton fixiert.

Um Sphäroidschnitte herzustellen, wurden die im "hängenden Tropfen" kultivierten Sphäroide abgespült und in D-PBS gewaschen. Das anschließend durch nochmalige Zentrifugation erhaltene Pellet aus Sphäroiden wurde in wenigen Mikrolitern D-PBS aufgenommen, mit Kryoklebstoff „Tissue-Tek®; O.C.T.™ Compound“ (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) vermischt und bei -20°C eingefroren. Im Kryostaten wurden diese Mischungen in 5µm-dicke Schnitte zerteilt und ebenfalls auf Objektträger gezogen. Mit einem Durchlicht-Mikroskop wurde kontrolliert, ob die Sphäroide tatsächlich angeschnitten wurden.

Die Objektträger-Schnitte wurden anschließend mittels histologischer Standardprozedur mit Hämatoxylin und Eosin Y (mit Phloxin) morphologisch angefärbt, dehydriert und die Objektträger nach dem letzten Xylole Schritt mit dem Einschlussmittel Roti®-Histokitt II (Roth) eingedeckt und mit Deckgläsern versehen.

Immunhistochemie

Immunhistologische Färbungen wurden an in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt. Es wurden wie zuvor beschrieben (s. 2.3.4.10 *HE-Färbung*) 5µm-dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf Objektträger gezogen.

Die Färbungen wurden mit dem Gerät „Discovery XT“ inkl. „Discovery XT Staining Module“ und Standardreagenzien und Steuerungssoftware „NexES v9.30“ (sämtlich von Ventana; Tucson, AZ, USA) durchgeführt. Die Färbung der Zielproteine erfolgte mit der indirekten LSAB-Methode („Labelled Streptavidin-Biotin“-System). Dies beinhaltete zunächst die Entparaffinierung und die Demaskierung mit dem EDTA-haltigen Puffer CC1-s („Cell Conditioner 1“; Ventana; Tucson, AZ, USA). Anschließend wurde wegen der aus dem Pferd stammenden Zweitantikörper eine Blockierung unbesetzter Bindungsstellen mit 1:50 verdünntem Pferdeserum („Horse Serum“; Biozol, Eching) durchgeführt. Die Kopplungsreaktionen mit den Erst- und Zweitantikörpern (s. 2.1.5), angesetzt in „Antikörper-Verdünnungs-Lsg.“ (DCS, Hamburg), fanden jeweils 60min bei 37°C statt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des „DAB Map™ Kit“ (Ventana; Tucson, AZ, USA), das zunächst eine Bindungsreaktion von Streptavidin-

HRP an die biotinylierten Zweitantikörper und anschließend die chromogene Farbentwicklung (braun) von DAB mit H₂O₂ durch das Enzym HRP beinhaltet. Danach wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin angeschlossen. Nach der Kernfärbung wurden die Schnitte mit Roti[®]-Histokitt II und Deckgläsern eingedeckt.

Immunfluoreszenz

Für die immunhistologische Anfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoffen wurden adhärenente Zellen verwendet, die in schwarzen 384Well-Platten mit durchsichtigem Boden kultiviert wurden, 5µm-dicke Kryogewebeschnitte und Kryoschnitte von Sphäroiden, die beide – wie für die HE-Färbung beschrieben (s. 2.3.4.10 *HE-Färbung*) – hergestellt wurden.

Bei der Färbung von Zellen wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe das Kulturmedium vorsichtig aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit 30µl 2% (w/v) Paraformaldehyd pro Well 20min fixiert. Kryogewebeschnitte und Sphäroidschnitte wurden kurz mit D-PBS gewaschen und ebenfalls mit 2% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Im Weiteren erfolgte die Behandlung dieser Schnitte ebenso wie bei den Zellen, nur wurden ggf. größere Volumina für die einzelnen Färbeschritte benötigt.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Wells mit 30µl D-PBS gewaschen. Wurde die Inkorporation von BrdU gefärbt, wurde eine Inkubation 10min mit 30µl 2M HCl und anschließendem viermaligen Waschen in D-PBS angeschlossen. Ansonsten wurde mit folgendem Schritt die Prozedur fortgesetzt:

Um die Zellen porös zu machen, wurden sie 5min mit 0,2% (v/v) Triton X-100 inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit D-PBS folgte zum Blockieren freier Bindungsstellen eine Inkubation mit 3% (w/v) BSA-Lösung 20min, gefolgt von zweimaligem Waschen mit D-PBS. Die Erstantikörper wurden in 0,05% (v/v) Tween 20 in D-PBS wie angegeben verdünnt (s. 2.1.5). Die Wells, die der Zweitantikörperkontrolle dienten, wurden mit D-PBS belegt, die restlichen wurden mindestens 1h bei RT mit den Erstantikörper-Lösungen inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit D-PBS wurden alle Wells mit Zweitantikörper-Lösung wiederum mindestens 1h bei RT und im Dunkeln inkubiert. Bei den Zweitantikörpern handelte es sich entweder um einen anti-Maus-Antikörper, der an AlexaFluor-Farbstoff der Fluoreszenzwellenlänge 488nm (grün) gekoppelt ist, oder einem anti-Kaninchen-Antikörper, der an AlexaFluor-Farbstoff der Fluoreszenzwellenlänge 647nm (dunkelrot) gekoppelt ist. Beide wurden wie angegeben (s. 2.1.5) in 0,05% (v/v) Tween 20 in D-PBS-Lösung verdünnt. Nach der Zweitantikörperinkubation wurden die Wells zweimal mit D-PBS

gewaschen. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit 1:10.000 in D-PBS verdünntem Hoechst 33342 10min im Dunkeln. Nach weiterem zweimaligem Waschen in D-PBS wurden die Zellen pro Well mit D-PBS plus Ca/Mg bedeckt, umliegende Wells gegen Austrocknung mit D-PBS gefüllt und bis zur Fluoreszenzmikroskopie bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die gefärbten Gewebe- und Sphäroidschnitte wurden nach dem letzten Waschen mit wässrigem Eindeckmedium Fluoromount G (Southern Biotech; Birmingham, AL, USA) und Deckgläsern versehen und ebenfalls bis zur Mikroskopie im Dunkeln gelagert. Für die statistischen Auswertungen wurden für Zellkulturen mindestens drei Wells für eine Probe gefärbt, bei Gewebeschnitten lagen mindestens zwei verschiedene Gewebeschnitte zugrunde.

2.3.4.11 Mikroskopie / Aufnahmen von Zellen und Gewebeschnitten

Zur Beurteilung von Zellkulturen und der Analyse der verschiedenen Färbeversuche wurden verschiedene Mikroskope und Aufnahmesysteme benötigt.

Durchlicht

Um das Wachstum, die Vitalität und die Morphologie von Zelllinien, primären Zellen und Sphäroiden beurteilen und Zellzählungen durchführen zu können, wurden die jeweiligen Kulturoberflächen unter sterilen Bedingungen unter einem Axiovert 25-Mikroskop (Zeiss, Jena) begutachtet. Zum Herstellen von Fotos wurden entweder eine Canon-Kamera (Canon, Tokio, Japan) mit einem Adapter für das Mikroskop oder eine „AxioCam ICc 1“ und das Programm AxioVision 6.0 (Zeiss, Jena) verwendet.

Immunhistologische und Immunfluoreszenzfärbungen / Auszählung der Zellen

Die HE-Färbungen von Zellen und Sphäroiden sowie jegliche Fluoreszenzfärbungen von Zellen, Sphäroiden und Gewebeschnitten wurden mit einem Mikroskop „Axio Observer.Z1“ und „AxioCam MRc Rev.3“ und der Software AxioVision 6.0 (Zeiss, Jena) analysiert und fotografiert. Für die Bestimmung der absoluten Zellzahlen sowie für die Zählung der spezifisch gefärbten PanCytokeratin-, Vimentin- und BrdU-positiven Zellen einer Kultur wurden 5-9 möglichst zufällig positionierte Fotos bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen, die Zellen mit jeweils spezifisch erstellten Masken des „Commander“-Moduls der AxioVision Software ausgezählt und durch die Zahl der Fotos gemittelt. Im Falle der Medikamententestplattform wurden mindestens

drei Wells einer 384Well-Platte mit je drei Fotos aufgenommen, so dass die Werte aus neun Fotos gemittelt wurden.

Zur Zellzählung wurde mit der Software „AxioVision 6.0“ und dem zugehörigen „Commander-Modul“ (Zeiss) eine Maske geniert, die durch Setzen von Graustufen-Schwellenwerten die einzelnen Kerne erkennt und durchnummeriert. Dieses musste manuell geschehen und verlangte ausgeprägte Übung im Mikroskopieren von primären Zellkulturen. Mit diesen Masken wurde im blauen Kanal (Hoechst 33342-Färbung der Zellkerne) die Gesamtzahl und im grünen Kanal (BrdU-gefärbte Zellkerne) die Zahl der Zellen mit BrdU-Inkorporation bestimmt. Sie gaben den Anteil der Zellen in Kultur an, die innerhalb der letzten 24h vor der Färbung (Zeitraum der BrdU-Inkubation) ihre DNA synthetisiert haben und sich demnach in Proliferation befanden.

Durch die PanCytokeratin-Färbung wurde der prozentuale Anteil der Epithelzellen und durch die Vimentin-Färbung der der Fibroblasten in der Kultur bestimmt.

Scannen von Objektträgern

Die immunhistologischen Färbungen und HE-Färbungen der Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Gerätes „Mirax-Scan“ und der Software „Mirax-Scan Gerätesteuerung 1.9“ (Zeiss, Jena) eingescannt. Von diesen Bildern wurden mit Hilfe der Software „Mirax Viewer 1.10“ (Zeiss, Jena) repräsentative Fotos hergestellt und zur Analyse verwendet.

3 Ergebnisse

Die Entwicklung einer Medikamententestplattform für eine Anwendung am kolorektalen Karzinom beinhaltete zunächst die Identifizierung geeigneter *In vitro*-Kultursysteme. Geeignet sind solche Systeme, die eine Übertragbarkeit der auf ihrer Basis erhaltenen Daten auf das jeweilige Ursprungssystem zulassen. Generell gilt, die Übertragbarkeit der erhaltenen Daten auf klinische Studien am Menschen ist dann am besten, wenn die präklinisch angewendeten *In vitro*-Kultursysteme dem Zustand und Verhalten eines Originaltumors möglichst genau entsprechen.

3.1 Etablierung von *In vitro*-Kultursystemen für kolorektale Tumore

Für präklinische Analysen am kolorektalen Karzinom stehen verschiedene sekundäre *In vitro*-Kulturen zur Verfügung. Durch selektive Passagierung und Immortalisierung wurden diese Zelllinien an die künstlichen *In vitro*-Bedingungen angepasst und in den überwiegenden Fällen reine Epithelzellkulturen durch Klonierung isoliert. Verschiedene Studien beschreiben allerdings mittlerweile, dass einzelne Zelllinien, wie die in dieser Arbeit verwendeten HT29, die Verhältnisse der Ursprungstumore nur in sehr eingeschränktem Maße repräsentieren ^[93, 94]. Als Möglichkeit zur Umgehung dieser Einschränkungen wird diskutiert, verschiedene Zelllinien für ein- und dieselbe Analyse parallel zu verwenden, um in Summe das Bild und die Verhaltensweisen eines Karzinoms widerzuspiegeln. Inwieweit dies möglich und welche Zelllinien einsetzbar wären, ist jedoch nicht genügend untersucht. Es wäre die Entwicklung von neuen Zelllinien extrem wichtig, um der hohen Individualität der Tumore gerecht zu werden. Zur Herstellung von Zelllinien werden primäre Zellkulturen benötigt, die in Langzeit-Kultur bzw. durch Passagierung eine nachfolgende Klonierung ermöglichen. Die auftretenden Veränderungen durch solche Selektionen in Langzeit-Kulturen und Klonierungen sind jedoch ebenfalls nur wenig untersucht. Die Kultivierung derartiger Langzeit-Kulturen und einzelner Klone zur Herstellung von neuen Zelllinien verlangt eine molekulare und proteinbiochemische Charakterisierung.

3.1.1 Passagenvergleiche der Langzeit-Kultur A413

Es wurden primäre Zellen des Patienten A413 gewonnen und diese Mischkultur aus Epithelzellen und Fibroblasten durch Passagierung in Langzeit-Kultur kultiviert. Die Aufarbeitung der A413 erfolgte nach der grundlegenden Methode, die ebenfalls zur optimierten Herstellung von primären Zellen in Kurzzeit-Kultur angewendet wurde und im entsprechenden Abschnitt gezeigt ist (s. 3.1.2.1).

Die A413 wurden nach verschiedenen Kulturperioden auf Gen- und Protein-Ebene untersucht, um Unterschiede zwischen „frühen“ und „späten“ Passagen dieser Kultur zu analysieren und festzustellen, wie stabil diese Kultur hinsichtlich dieser Parameter kultiviert werden kann. Die Zellpopulationen „früher“ Passagen (Passagennummer 6-9) sind 3-8 Wochen alt, die der „späten“ Passagen (Passagennummer 19-23) 2,5-3 Monate älter. Für Wiederholungsversuche und verschiedene Analysen wurden möglichst kurz aufeinander folgende Passagen verwendet.

Um Verschiebungen der Zellzusammensetzung innerhalb der Zellpopulationen zu analysieren, wurde der Kulturverlauf mikroskopisch verfolgt. Hierbei wurde eine Abnahme und letztendlich der Verlust des Fibroblastenanteils und ein Anstieg der Proliferation beobachtet.

Um parallel die molekularen Expressionsveränderungen zu untersuchen, wurden zunächst Microarray-Analysen mit dem DualChip™ (Eppendorf) an biotinylierter cDNA durchgeführt. Nach Normalisierung der gemessenen Expressionsintensitäten mit dreizehn Haushaltsgenen wurden 35 Gene identifiziert – 16,7% der 210 auf dem Chip befindlichen Gene –, die in der „späten“ Passage (Passagennummer 6) im Vergleich mit der „frühen“ (Passagennummer 19) eine signifikante (≥ 2 -fach; $p \leq 0,05$) Expressionsveränderung aufwiesen. Abb. 4 A zeigt einen Ausschnitt der vermessenen Chips, die Umrahmungen verweisen auf einzelne Expressionsunterschiede zwischen den Messungen. In der Tabelle B der Abb. 4 sind neun für das kolorektale Karzinom relevante Gene und die Expressionveränderung exemplarisch aufgelistet. Dazu gehörten der Tumormarker *CEACAM5* (CEA) [8], der häufig überexprimierte und überaktivierte Wachstumsfaktor *EGFR* [9] sowie *TP53* (p53), das maßgeblich an der Reparatur von DNA-Schäden und der Steuerung der Apoptose beteiligt ist [95, 96]. Ebenfalls aufgelistet waren *CDKN1A* (p21), das bei der Apoptose- und Zellzyklus-Regulation involviert ist [96], das Onkogen *STMN1* (Stathmin 1) [97] sowie die an der Angiogenese beteiligten Gene *CTNNB1* (Catenin β) [98], *VEGFA* [99], *FLT4* [100] und *PLAUR* (uPAR) [101, 102], das ebenfalls an der Regulation der Zelladhäsion und den Zell-Zell-Kontakten involviert ist.

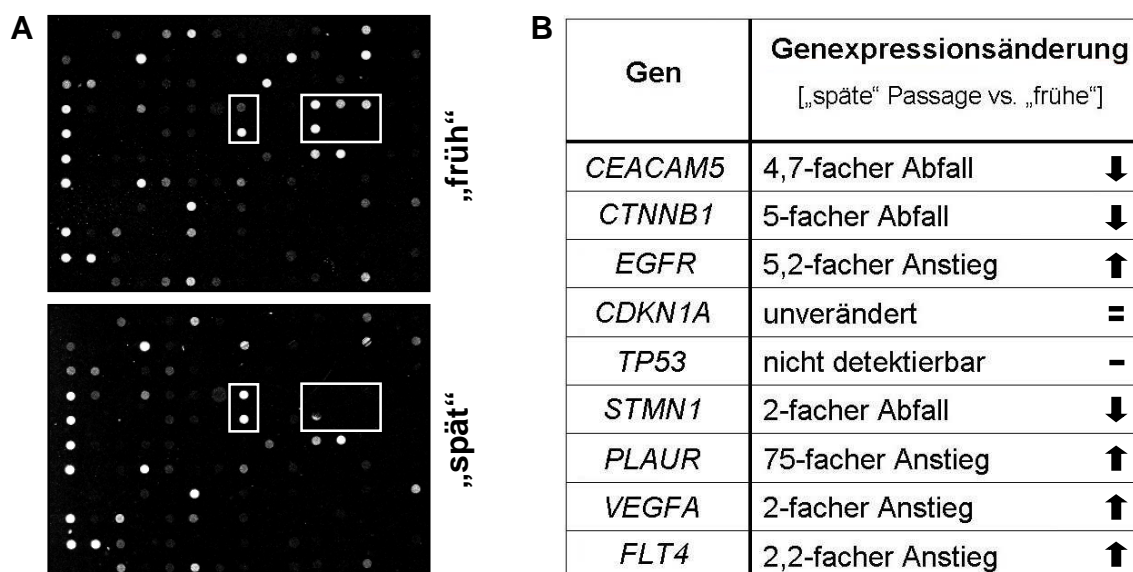


Abb. 4: Genexpressionsänderungen in den primären Langzeit-Kulturen A413

Angegeben ist (A) ein Ausschnitt des Microarrays DualChip™ (Eppendorf) nach Genexpressionsbestimmung (Rohdaten) der „frühen“ (Passagenummer 6) und „späten“ Passage (Passagenummer 19) der A413. Je heller ein Signal (weiße Punkte), desto höher war die Signalintensität, ein Maß für die Expression des jeweiligen Gens. B Exemplarische Auflistung von neun Genen und den Expressionsänderungen der „späten“ Passage gegenüber der „frühen“.

Da verschiedene an der Angiogenese beteiligte Gene signifikante Änderungen aufwiesen und vorherige Untersuchungen gezeigt hatten, dass ischämische Bedingungen sehr schnell maßgeblichen Einfluss auf Angiogenese-regulierende Gene wie *HIF1A* (*HIF-1 α*) sowie den ubiquitären Transkriptionsfaktor *FOS* (*c-fos*) haben [87], wurde die Genexpressionsanalyse mittels Real-time PCR auf diese beiden Gene ausgeweitet. Verglichen wurde wiederum die „späte“ Passage der A413 gegen die „frühe“, wobei cDNA ohne Biotin-Kopplung verwendet wurde.

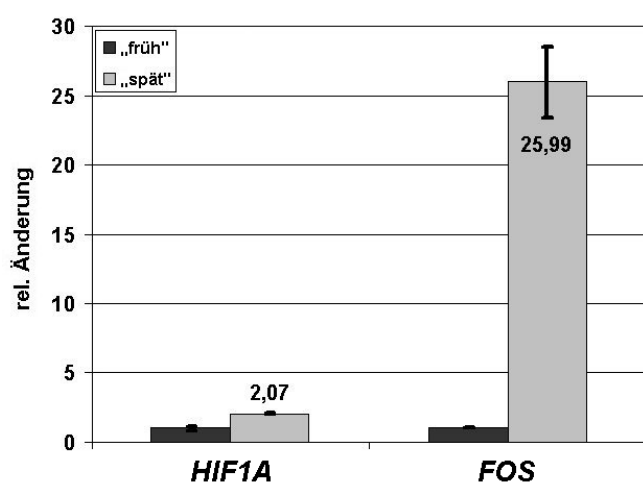


Abb. 5: Real-time PCR der Gene *HIF1A* und *FOS* in Langzeit-kultivierten A413

Verglichen wurden die Genexpression von *HIF1A* und *FOS* in „frühen“ (Passagenummer 6) und „späten“ Passagen (Passagenummer 19) der Langzeit-kultivierten primären Zellen A413. Die Werte der „frühen“ Passage sind jeweils als Referenz (= 1) gesetzt. Die Real-time PCR erfolgte mit TaqMan™-Sonden und die Auswertung mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen Cyclophilin A verwendet.

Wie in der vorhergehenden Studie festgestellt werden konnte [87], besteht ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Genexpression von *HIF1A* und *FOS*

mit ischämischen Einflüssen. Durch Passagierung und lange Kulturdauer der A413 war bei beiden Genen ebenfalls eine Steigerung zu verzeichnen. *FOS* erreichte hierbei einen sehr starken, 26-fachen Anstieg (Abb. 5).

Nachdem deutliche Expressionsveränderungen auf Gen-Ebene festgestellt werden konnten, die verschiedene zelluläre Prozesse betrafen, wurde untersucht, ob sich diese Änderungen auf Protein-Ebene fortsetzen. Es sind exemplarisch die Proteine EGFR und CEA gezeigt, da sie im kolorektalen Karzinom häufig überexprimiert vorliegen und ihre Expressionslevel somit bei der Reaktion auf Medikamente Einfluss haben können [9, 26, 103, 104].

Aus A413 „früher“ und „später“ Passage (Passagenummer 9 und 23) wurden Proteinlysate hergestellt und zunächst im Western Blot der absoluten Proteinlevel von EGFR und CEA analysiert. Das Haushaltsprotein GAPDH diene als Ladungskontrolle. Das Protein EGFR (Abb. 6 A) wurde wie auf Gen-Ebene (Microarray-Analyse) in „späten“ Passagen in höherem Maße exprimiert. Der Tumormarker CEA erfuhr hingegen auf Gen- und Protein-Ebene einen starken Expressionsrückgang und kann als Protein nach mehrfacher Passagierung fast nicht mehr nachgewiesen werden.

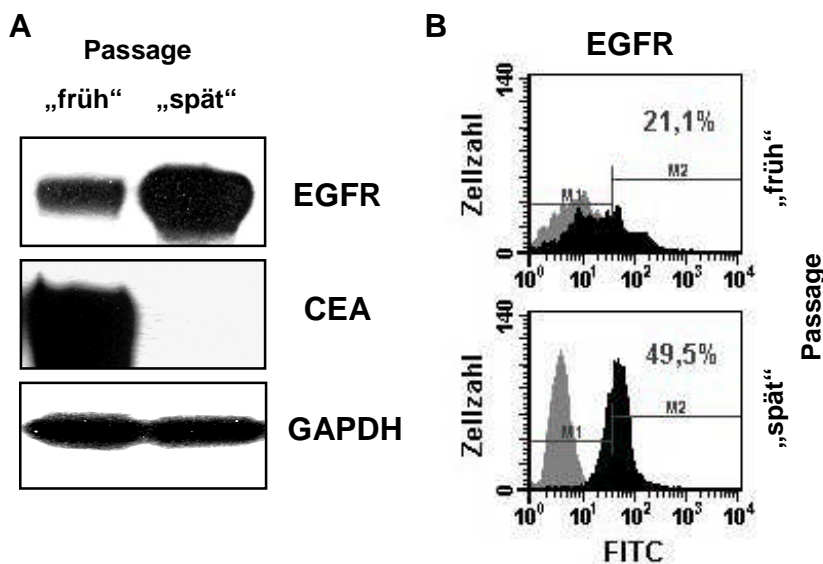


Abb. 6: Western Blot und Durchflusszytometrie mit Langzeit-Kulturen der A413

Die Analyse der Proteinlevel von EGFR und CEA, der Vergleich von „früher“ (Passagenummer 9) und „später“ Passage (Passagenummer 23) der A413, erfolgte mittels Western Blot (**A**) und Durchflusszytometrie (**B**). **A** Chemilumineszenz-Entwicklung der Western Blots. **B** Durchflusszytometrie von EGFR-markierten Zellen (schwarz) und ungefärbten Kontrollzellen (grau). Der Bereich M2 stellt die positive EGFR-Fluoreszenz dar, M1 den durch die Kontrollzellen vorgegebenen negativen Bereich.

Da es sich beim EGFR um einen Oberflächenrezeptor der Zellen handelt, wurde zusätzlich zum absoluten Level im Western Blot seine Expression auf der Oberfläche

der A413-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten von jeweils 10.000 gezählten Zellen in Abb. 6 B zeigten, dass der Anteil der Zellen mit dem Rezeptor auf ihrer Oberfläche ebenfalls anstieg. Ebenso wie in den Western Blots wurde EGFR in „späten“ Passagen (Passagennummer 23) in mehr als doppelt so großen Mengen als in den „frühen“ Passagen (Passagennummer 9) translatiert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Die „späte“ Passage der A413 zeigte darüber hinaus in Größe und Granularität der Zellen sowie im Anteil des Membran-ständigen EGFR ein homogeneres Signal, während in der „frühen“ Passage alle drei Parameter stärker streuten. Die Heterogenität der Zellzusammensetzung nahm demnach durch die selektive Passagierung und durch die Kulturdauer ab.

Zusammenfassend wiesen diese Gen- und Proteinexpressionsanalysen darauf hin, dass die primären Zellen A413 bei Langzeit-Kultivierung instabil waren:

- Es traten signifikante Änderungen in diversen Tumor-relevanten und verschiedene zelluläre Prozesse betreffenden Genen auf, u.a. verantwortlich für die Wachstumseigenschaften und mit Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit auf Medikamente.
- Die veränderte Expression der Gene *EGFR* und *CEACAM5* konnte auf Proteinebene bestätigt werden.

Aus diesen Gründen wurden diese und andere Langzeit-kultivierte primäre Zellen nur für methodische Etablierungsversuche verwendet. Diese beschriebenen Ergebnisse machten eine Etablierung und entsprechende Kontrolle von *In vitro*-Systemen erforderlich, die individuelle Tumore besser repräsentieren.

3.1.2 Etablierung weiterer kolorektaler *In vitro*-Kulturen

Da die vorhergehenden Ergebnisse eine hohe molekulare Instabilität durch die Langzeit-Kultur ergab, wurden im Folgenden zur Vermeidung dieser Einflüsse primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur (ohne Passagierung) verwendet. Ihre Herstellung und Kultivierung wurde optimiert und die Kulturen zunächst dahingehend analysiert, ob sie in ausreichenden Mengen gewonnen werden können und ihre Kulturcharakteristika eine Verwendung in multiplen Analysen zulassen.

3.1.2.1 Primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur

Um die Gewinnung und Kultivierung solcher Kurzzeit-kultivierten primären Zellen zu etablieren, wurde das von der Firma Indivumed GmbH standardisierte Verfahren,

Tumormaterial zu gewinnen, genutzt. Nach der operativen Entfernung des Tumors erhielt zunächst der Pathologe genügend Gewebematerial, dann erfolgte die Proben-sammlung für die Gewebedatenbank der Firma Indivumed GmbH. Anschließend konnte Gewebematerial für *In vitro*-Kulturen entnommen werden. Pro Woche konnten so durchschnittlich 1-2 verwertbare Patientengewebe erhalten werden, um an ihnen die Methode der Aufarbeitung und Kultur, die u.a. für die A413 genutzt wurde, weiter zu optimieren. Ziel der Optimierung war es, möglichst viele und vitale Zellen aus einem Gramm Tumorgewebe zu isolieren, um eine Vielzahl an Parametern, wie sie für Medikamententests benötigt werden, vermessen zu können. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem in Abb. 7 dargestellten grundlegenden Schema, dessen einzelne Schritte der Lagerung und des Transports, der mechanischen und enzymatischen Zerkleinerung sowie der Kulturbedingungen optimiert wurden.

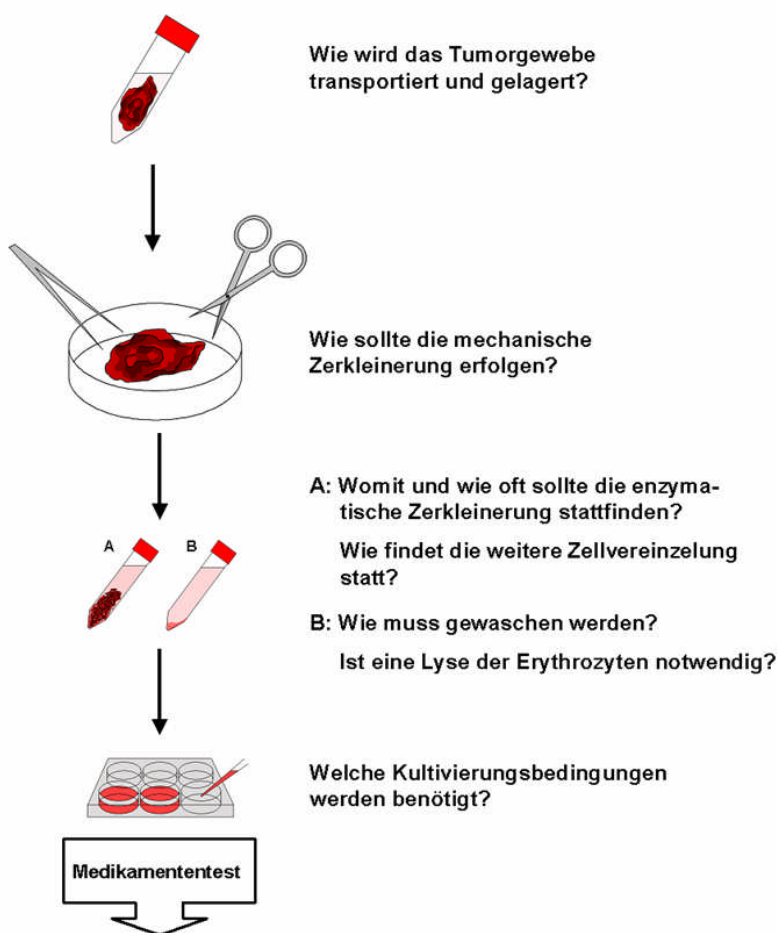


Abb. 7: Schema zur Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen

Das Schema beschreibt die grundlegenden Schritte der Aufarbeitung und Kultivierung sowie die zu klärenden Fragen, um möglichst viele und möglichst lange vital kultivierbare primäre Zellen zu gewinnen. Durch Vergleichsanalysen wurden die einzelnen Schritte im Detail ausgetestet.

Hierfür wurde eine Vielzahl aufeinander folgender Vergleichsanalysen, jeweils an Gewebematerial mehrerer Patienten, durchgeführt. Die stattgefundenen Vergleiche, ihre Details sowie die daraus extrahierten optimierten Bedingungen sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Durchgeführte Vergleichsanalysen zur Etablierung der Kultur von primären Zellen

Aufgelistet sind Vergleichsanalysen und ihre Details zur Aufarbeitung und Kultivierung von primären Zellen sowie die daraus resultierenden optimierten Bedingungen, um möglichst viele und vitale Zellen aus einem Gramm Tumorgewebe zu isolieren.

durchgeführte Vergleiche	Details	Ergebnisse / optimierte Bedingungen
Aufarbeitung		
Lagerung vor Aufarbeitung	<ul style="list-style-type: none"> • bei 4°C, RT oder 37°C • innerhalb von 2-4 Stunden nach OP oder nach Lagerung ü.N. • Lagerungsmedium 	<ul style="list-style-type: none"> → bei 4°C / auf Eis → innerhalb von 2-4 Stunden nach OP → Vollmedium (s.u.) mit 3-fach konzentrierten Antibiotika und Fungizid
Collagenasen	<ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Hersteller und Herkunft • Konzentrationen 	<ul style="list-style-type: none"> → Collagenase NB6 → 0,2% (w/v)
Collagenase-Behandlung	<ul style="list-style-type: none"> • einfache oder mehrfache enzymatische Behandlung kombiniert mit unterschiedlichen Konzentrationen der Collagenase(n) 	<ul style="list-style-type: none"> → je nach Beschaffenheit des Gewebes bis zu 3-fach hintereinander erfolgende enzymatische Behandlung (0,2%) der jeweils verbliebenen Gewebestücke → anschließendes Vereinen aller gewonnenen Zellen
Vereinzelung durch Siebe und Filter	<ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Porengrößen in Sieben und Filtern; • unterschiedliche Kombinationen von verschiedenen Sieben und Filtern 	<ul style="list-style-type: none"> → 1. Sieb mit 0,4mm Maschenweite → 2. 100µm-Filter, ggf. mehrfach → 3. 70µm-Filter
Waschschritte	<ul style="list-style-type: none"> • Erythrozytenlyse notwendig? 	<ul style="list-style-type: none"> → ja, um in unterschiedlich blutigen Geweben die Zahl der Erythrozyten so gering wie möglich zu halten
Kultivierung		
Oberflächenbeschichtung	<ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Collagene, Fibronectin, Mischungen und Konzentrationen 	<ul style="list-style-type: none"> → Collagen I mit 5µg/cm²
Medium	<ul style="list-style-type: none"> • D-MEM, D-MEM-F12, McCoys, RPMI, Epithelzellmedium, Tumorzellmedium 	<ul style="list-style-type: none"> → D-MEM-F12
Mediumzusätze	<ul style="list-style-type: none"> • Serum, Hormone, Vitamine • Antibiotika/Fungizid etc. gegen Kontaminationen • Hydrocortison, Dexamethason, Triiodothyronin 	<ul style="list-style-type: none"> → Vollmedium s. 2.3.2.1 → 1% (v/v) Pen/Strep, 0,2% (v/v) Gentamicin, 0,75µg/ml Amphotericin B → keine weiteren Zusätze
Begasung und Mediumdurchmischung	<ul style="list-style-type: none"> • Begasung mit 5% CO₂ in 95% Luftfeuchtigkeit oder erhöhter O₂-Zufuhr 	<ul style="list-style-type: none"> → Begasung mit 5% CO₂ in 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C
Aussaatdichte	<ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Wellgrößen • verschiedene Zelldichten pro cm² 	<ul style="list-style-type: none"> → alle Größen an Kulturgefäßen möglich → 5 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ pro cm²

Zur Etablierung und Optimierung der Herstellung und Kultivierung primärer Zellkulturen und für die in Tab. 12 aufgeführten Vergleiche wurde Tumormaterial von insgesamt mehr als 100 Patienten mit kolorektalem Karzinom aufgearbeitet (optimierte Bedingungen s. 2.3.2.3). So wurde durch die zwei- bis dreimalige aufeinander folgende Anwendung der 0,2% (w/v) Collagenase eine Steigerung der vitalen Zellzahlen pro Gramm Gewebe von $4,1 \times 10^6$ auf $1,14 \times 10^7$ erreicht (Abb. 8).

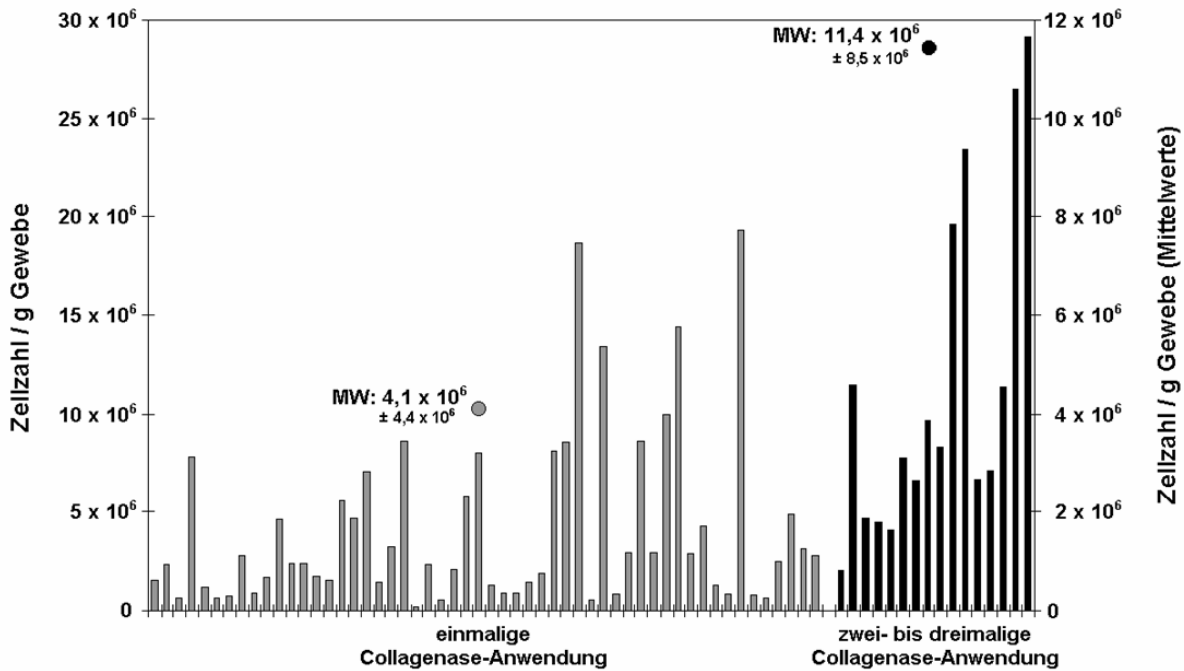


Abb. 8: Vergleich von einmaliger und mehrfacher Collagenase-Anwendung

Abgebildet sind die vitalen Zellzahlen pro g Gewebe. Das Gewebe von 54 Patienten wurde einmalig mit 2% (w/v) Collagenase behandelt (graue Säulen), von 16 Patienten wurde es zwei- bis dreimal nacheinander behandelt und die in diesen Schritten gewonnenen Zellen vereint (schwarze Säulen) (x-Achse). Die y-Achse links skaliert die durch die verschiedenen Collagenase-Behandlungen gewonnenen absoluten Zellzahlen pro Patient, die y-Achse rechts die Mittelwerte (MW) der gewonnenen absoluten Zellzahlen der zwei verschiedenen Collagenase-Anwendungen.

Zusammenfassend konnten mit dieser optimierten Prozedur zur Aufarbeitung und Kultivierung primärer Zellen die in Abb. 9 statistisch erfassten Zellzahlen, Vitalitätsraten sowie Anwachsrate erreicht werden.

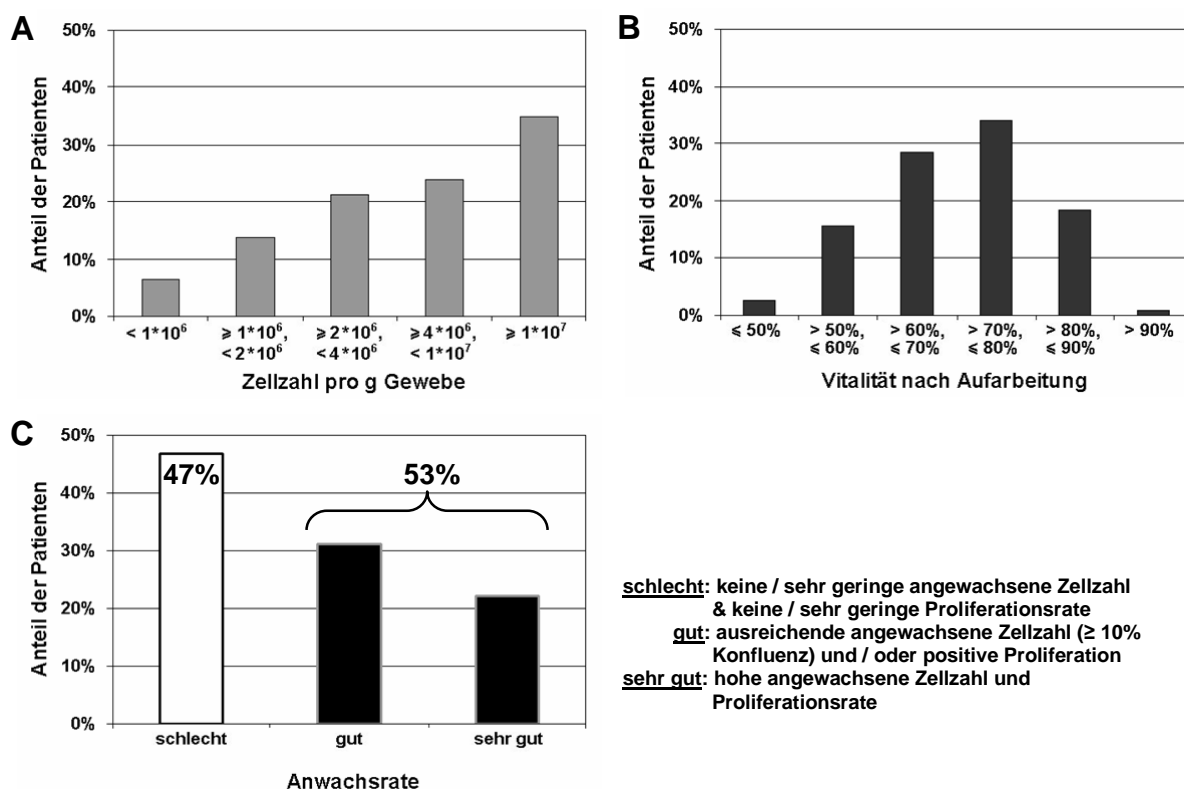


Abb. 9: Statistik zur Isolierung und Kultivierung primärer Zellen

Dargestellt sind die statistischen Auswertungen zur Isolierung und Kultivierung von mit der optimierten Prozedur aufgearbeiteten primären Zellen. Abgebildet ist jeweils der prozentuale Anteil der aufgearbeiteten Patientengewebe. **A** Zellzahl pro g Gewebe. **B** Vitalität nach Aufarbeitung. **C** Anwachsrate. In die Einteilung „schlecht“, „gut“ und „sehr gut“ fließen die Zahl der nach 24h angewachsenen Zellen sowie die Proliferationsrate nach weiteren 24-48h ein (s. Legende).

Im Mittel wurden 5×10^6 vitale Zellen pro Gramm Gewebe erhalten, was bei durchschnittlich 3g Gewebe eine für umfangreiche Vergleichsanalysen ausreichende Anzahl darstellte. Die statistische Verteilung der erhaltenen Zellzahlen ist in Abb. 9 A gezeigt. Die Vitalität der aufgearbeiteten Zellen (Abb. 9 B) betrug nach Aufarbeitung durchschnittlich 73%, beeinflusste jedoch nicht die Kultivierbarkeit. Eine Aussaatdichte von 5×10^5 bis 1×10^6 vitalen Zellen pro cm^2 führte zu den besten Anwachsrate von durchschnittlich 22% nach 24h, was durch mikroskopische Zählung der Zellen ermittelt wurde.

Eine gesamt erreichte Zellzahl von 1×10^7 stellte die kritische Grenze dar, um eine Vielzahl an zu analysierenden Parametern und Vergleichen für einen Medikamententest durchführen zu können. Gleichzeitig musste die Proliferation der Kultur gegeben sein, eine mikroskopisch sichtbare Vermehrung der Zellen, um die zytostatischen Wirkungen von Medikamenten analysieren zu können. Aufgrund dieser Parameter wurden in Abb. 9 C keine oder sehr geringe Anwachsrate sowie keine oder sehr geringe Proliferation als „schlecht“ bezeichnet. Bei ausreichender Zahl angewachsener Zellen, mindestens 10%ige Konfluenz, und / oder deutlicher Prolife-

ration wurden die Kulturen als „gut“ bzw. „sehr gut“ eingeteilt. Solche primäre Zellkulturen wurden aus 53% aller Gewebe gewonnen und konnten überwiegend bis 96h vital kultiviert werden.

Um festzustellen, ob die primären Zellen in solchen Zeiträumen methodisch vielfältig verwendbar waren, mussten das Wachstum, die Vitalität sowie die Zellzusammensetzungen Kulturen über eine Kulturdauer von mehreren Tagen und maximal bis zur Konfluenz der Zellen analysierbar sein. Dies erfolgte mikroskopisch, durch ATP-Messung und Immunfluoreszenzmethoden. Abb. 10 zeigt beispielhaft mikroskopische Bilder und Fluoreszenzfärbungen einer repräsentativen Kultur des Patienten A1687.

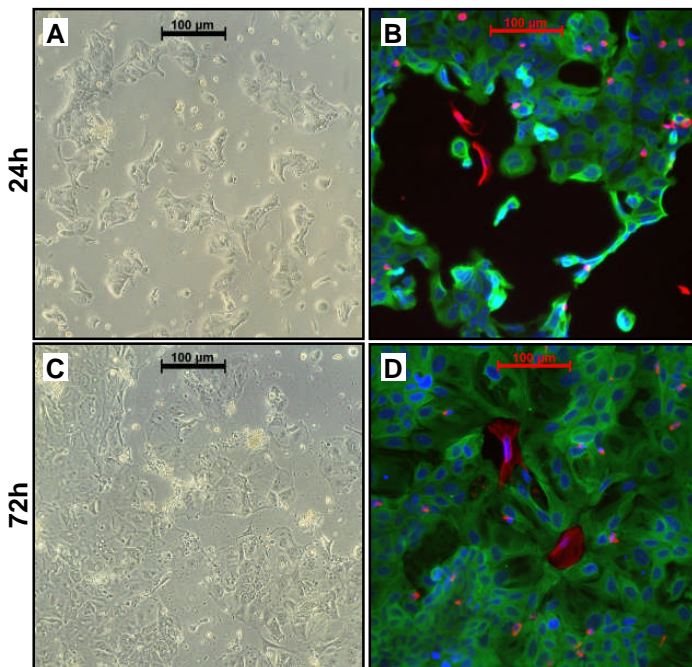


Abb. 10: Mikroskopie der primären Zellen des Patienten A1687

Gezeigt sind Durchlicht- (A, C) und Fluoreszenzbilder (B, D) der kolorektalen primären Zellkultur des Patienten A1687, 200-fache Vergrößerung, 100µm-Maßstab. Die adhärenenten und heterogenen Zellpopulationen bestanden aus Epithelzellen (grün) und weniger als 8% Fibroblasten (rot). Von 24h in Kultur (A, B) bis 72h (C, D) wurde mindestens eine Verdopplung der Zellzahl festgestellt.

Das Wachstum der Kultur der A1687 ist von 24h (A und B) bis 72h (C und D) deutlich zu erkennen. Die Kultur besteht aus morphologisch heterogenen Epithelzellen (grün) und Fibroblasten (rot). Im Gegensatz zu Langzeit-Kulturen primärer Zellen mit einem typischen einschichtigen Wachstum wachsen die Zellen teilweise übereinander.

Im Schnitt enthielten alle primären Zellkulturen weniger als 8% Fibroblasten und bestanden ansonsten aus Epithelzellen. Um zu verhindern, dass Fibroblasten die epithelialen Tumorzellen der verschiedenen Kulturen überwuchsen, durfte keine Passagierung der Kulturen vorgenommen werden. Dennoch wurde keine komplette Eliminierung der Fibroblasten angestrebt, da Fibroblasten des Tumorstromas eine wichtige Rolle in der Interaktion der verschiedenen Tumorbereiche und in der Metastasierung spielen ^[105, 106]. Die primären Zellkulturen verschiedener Patienten

unterschieden sich in ihrer heterogenen Zellzusammensetzung erheblich. Dies unterstrich wiederum die Individualität der Patienten, die in entsprechenden *In vitro*-Kultursystemen berücksichtigt werden sollte.

Die Vorteile dieses *In vitro*-Kultursystems waren demnach:

- Deutlich heterogene Zellzusammensetzung aus Epithelzellen und Fibroblasten, die direkt dem Tumor entstammen.
- Es wurde ein durch Passagierung verursachter Zellverlust bzw. Verschiebung der Zellzusammensetzung von Populationen vermieden.
- Es stand genügend Material für eine Vielzahl an Analysen zur Verfügung. Methoden wie RNA-Aufarbeitungen, quantitative Proteinanalysen mit sensitiven ELISA-Systemen sowie immunhistologische Analysen waren möglich und sind in den folgenden Abschnitten der Arbeit näher beschrieben (s. 3.1.3 und 3.2).

3.1.2.2 Etablierung dreidimensionaler organoider Kulturen

Wie Lerche-Langrand ^[75] und Baranczewski ^[107] zeigen konnten, ist der dreidimensionale Aufbau von Karzinomen ein wichtiges Kriterium, das ausschlaggebend für die physiologischen Reaktionen auf Medikamente ist. Zur besseren Repräsentation kolorektaler Tumore wurden daher parallel dreidimensionale organoide *In vitro*-Kulturen aufgebaut. Nachdem die Vorteile der Kurzzeit-kultivierten primären Zellen dargelegt werden konnten, war der nächste Schritt, diese in ein dreidimensionales System zu integrieren. Hierfür wurde zunächst die Kultur von Sphäroiden etabliert.

Sphäroide

Sphäroide sind Zusammenlagerungen von Zellen, die aus adhärent wachsenden *In vitro*-Zellkulturen hergestellt werden ^[72, 73]. Die Herstellung von Sphäroiden erfolgte in dieser Arbeit mit der Methodik des „hängenden Tropfens“ (Abb. 11 A und s. 2.3.2.4). Hierbei bildeten die Kulturen stabile Sphären, indem Zellen andere Zellen als Wachstumsoberfläche nutzen (Abb. 11 B).

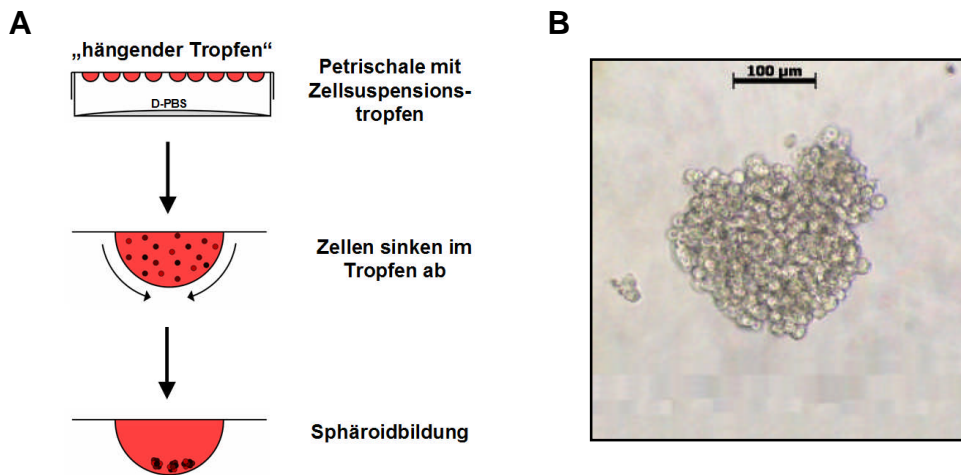


Abb. 11: Schema zur Herstellung von Sphäroiden mit der Methode des „hängenden Tropfens“

Das Schema (A) beschreibt die Aufarbeitungsmethode des „hängenden Tropfens“ zur Herstellung von Sphäroiden aus Zellkulturen. Die dreidimensionale Sphärenstruktur der primären Langzeit-Zellkultur B352 ist in einer Durchlichtaufnahme, 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab, in B zu sehen.

Erste Versuche mit der Zelllinie HT29 und den Langzeit-kultivierten primären Zellen A413 ergaben stabile Sphäroide verschiedenster Größe (wenige µm bis 0,5mm im Durchmesser). Diese konnten in Vitalitätsanalysen verwendet sowie durch immunhistologische Färbungen im morphologischen Aufbau untersucht werden (Abb. 12).

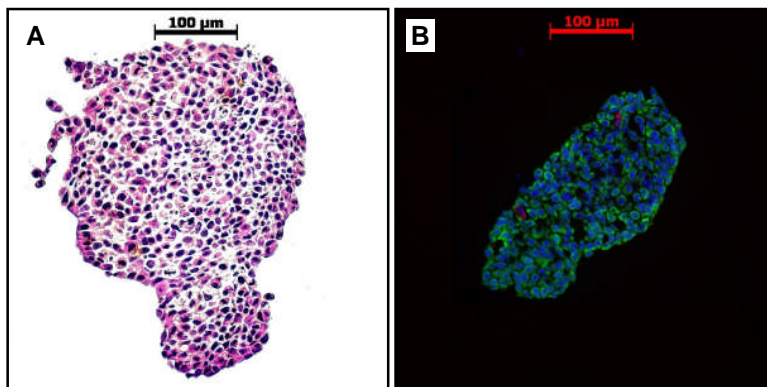


Abb. 12: Mikroskopische Aufnahmen von Sphäroid-Querschnitten

Aus den Langzeit-kultivierten primären Zellkulturen B352 (A) und A413 (B) wurden Sphäroide hergestellt und zwei Tage kultiviert, anschließend in Kryoklebstoff eingefroren und mit dem Kryostaten in 5µm-dicke Schnitte geteilt. In der HE-Färbung (A), 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab, ist der kompakte Zellaufbau erkennbar. Die Immunfluoreszenz-Aufnahme (B), 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab, zeigt den heterogenen Aufbau aus Epithelzellen (grün) und Fibroblasten (rot) sowie die Hoechst 33342-gefärbten Kerne (blau).

Ein Nachteil dieses Systems war, dass sich die einzelnen Zellen, die die Sphäroide bildeten, künstlich zusammenlagerten. In den Sphäroiden waren nicht die Epithelzell-Fibroblasten-Verhältnisse der Ausgangssuspensionen vertreten. In der Zellsuspension für die A413-Sphäroide (Abb. 12 B) wurden z.B. zu einem Drittel Fibroblasten (rot) eingesetzt, die Sphäroide bestanden aber überwiegend aus

Epithelzellen (grün). Darüber hinaus blieben die Versuche, Sphäroide aus frisch aufgearbeiteten primären Zellen herzustellen, ohne Erfolg. Die Vorteile der primären Kurzzeit-Kulturen konnten somit nicht auf dieses dreidimensionale organoide System ausgedehnt werden. Daher wurde dieses Kultursystem nicht weiter verfolgt.

Um die organo-typischen Gewebestrukturen, den Patienten-spezifischen Aufbau aus unterschiedlichen Zelltypen und Strukturanordnungen zu berücksichtigen und in einem dreidimensionalen *In vitro*-Kultursystem nutzen zu können, wurde daher die Kultivierung von Gewebeschnitten entwickelt.

Kultivierte Gewebeschnitte

Die Kultivierung von Tumorgewebe direkt in Form von Gewebeschnitten umgeht sowohl den Verlust von Zellen durch die Aufarbeitung als auch das Aufgeben des originalen dreidimensionalen Gewebeverbandes mit seiner individuellen Struktur aus verschiedenen Zelltypen. Für die Herstellung von Gewebeschnitten wurde ebenso wie für die primären Zellen frisch gewonnenes Tumorgewebe benötigt. Beim Erhalt des Ausgangsmaterials für diese Etablierungsversuche galten daher dieselben Grundvoraussetzungen (s. 3.1.2.1).

Möglichst viele und vitale Gewebeschnitte mussten aus einem Gramm Tumorgewebe gewonnen und die vitale Kultivierbarkeit gewährleistet sein, um an ihnen eine Vielzahl an Parametern für Medikamententests vermessen zu können.

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem in Abb. 13 dargestellten grundlegenden Schema, wobei die Schritte der Lagerung, des Transports, der Schnitttechniken sowie der Kulturbedingungen optimiert wurden.

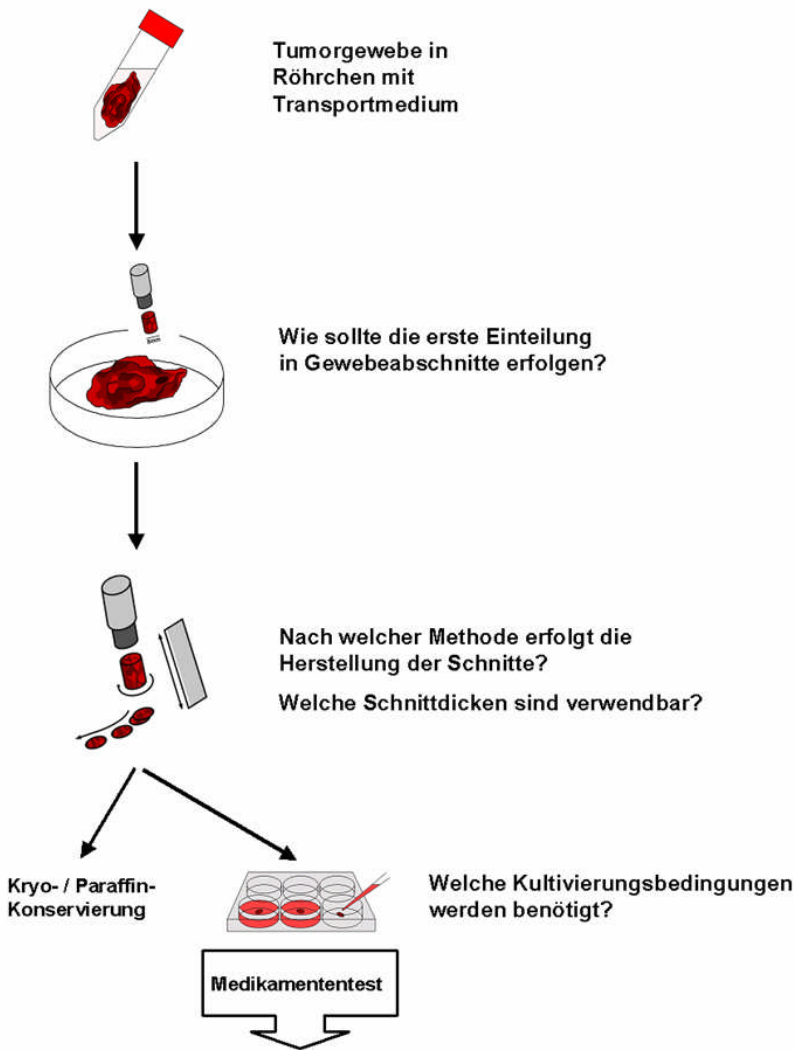


Abb. 13: Schema zur Gewinnung und Kultivierung von Gewebeschnitten

Das Schema beschreibt die grundlegenden Schritte der Aufarbeitung und Kultivierung sowie die zu klärenden Fragen, um möglichst viele und möglichst lange vital kultivierbare Gewebeschnitte zu gewinnen. Durch Vergleichsanalysen wurden die einzelnen Schritte im Detail ausgetestet.

Hierfür mussten eine Vielzahl an aufeinander aufbauender Vergleichsanalysen, jeweils an Gewebematerial mehrerer Patienten, durchgeführt werden. Die stattgefundenen Vergleiche, ihre Details sowie die daraus extrahierten optimierten Bedingungen sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Durchgeführte Vergleichsanalysen zur Etablierung der Kultur von Gewebeschnitten

Aufgelistet sind Vergleichsanalysen und ihre Details zur Aufarbeitung und Kultivierung von Gewebeschnitten sowie die daraus resultierenden optimierten Bedingungen, um möglichst viele und vitale Zellen aus einem Gramm Tumorgewebe zu isolieren.

durchgeführte Vergleiche	Details	Ergebnisse / optimierte Bedingungen
Aufarbeitung		
Lagerung vor Aufarbeitung	<ul style="list-style-type: none"> • bei 4°C, RT oder 37°C • innerhalb von 2-4 Stunden nach OP oder nach Lagerung ü.N. • Lagerungsmedium 	→ bei 4°C / auf Eis → innerhalb von 2-4 Stunden nach OP → Vollmedium (s.u.) mit 3-fach konzentrierten Antibiotika und Fungizid
Schneidemethoden	<ul style="list-style-type: none"> • per Hand, Vibrations-Mikrotome, Krumdieck-Tissue-Slicer 	Krumdieck-Slicer: Gewebe und Schnitte in D-PBS gekühlt

durchgeführte Vergleiche	Details	Ergebnisse / optimierte Bedingungen
Schnittdicke und -fläche	<ul style="list-style-type: none"> • 3x3mm, 5x5mm, 8x8mm • 200µm, 400µm, 600µm, 800µm, 1mm 	<ul style="list-style-type: none"> → ≥ 5x5mm → 400µm
Waschschritte	<ul style="list-style-type: none"> • gegen Kontamination mit Bakterien Vorbehandlung nötig? 	<ul style="list-style-type: none"> → ja, 20min mit 6,5% Pen / Strep und 2% Gentamicin
Lokalisation und Schnittvergleich	<ul style="list-style-type: none"> • unterschiedliche Bereiche des Stückes (Morphologie und Vitalität) • Schnitte in unterschiedlichem Abstand zueinander (Morphologie und Vitalität) 	<ul style="list-style-type: none"> → sehr starke Morphologie- und Vitalitätsunterschiede → deutliche Morphologie- und Vitalitätsunterschiede ⇒ gute Durchmischung und Mehrfachbestimmungen (s.u., Abb. 16)
Vorbehandlung gegen Kontamination	<ul style="list-style-type: none"> • Konzentrationsreihen von Antibiotika in Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) 	<ul style="list-style-type: none"> → 6,5% (v/v) Pen/Strep und 2% (v/v) Gentamicin
Kultivierung		
Oberflächenbeschichtung bzw. Well-Einsätze	<ul style="list-style-type: none"> • Oberflächenbeschichtung wie für primäre Zellen (s. 3.1.2.1)? • Membraneinsätze, die eine Mediumbenetzung von unten zulassen 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → keine Einsätze: Schnitte liegen leicht auf dem Boden auf
Medium	<ul style="list-style-type: none"> • D-MEM, D-MEM-F12, McCoys, RPMI, Epithelzellmedium, Tumorzellmedium 	<ul style="list-style-type: none"> → D-MEM-F12
Mediumzusätze	<ul style="list-style-type: none"> • Serum, Hormone, Vitamine • Antibiotika/Fungizid etc. gegen Kontaminationen • Hydrocortison, Dexamethason, Triiodothyronin 	<ul style="list-style-type: none"> → s. primäre Zellen 3.1.2.1 → s. primäre Zellen 3.1.2.1 → s. primäre Zellen 3.1.2.1
Begasung und Mediumdurchmischung	<ul style="list-style-type: none"> • 5% CO₂ in 95% Luftfeuchtigkeit / erhöhter O₂-Zufuhr • Schütteln zur Mediumdurchmischung nötig? 	<ul style="list-style-type: none"> → Begasung mit 5% CO₂ in 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C → nein
Aussaatdichte	<ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Wellgrößen • verschiedene Schnitzzahl pro Well 	<ul style="list-style-type: none"> → 12Well- oder 24Well-Platten mit 2ml Medium / Well → 1 Schnitt pro Well
Kontrolle der Durchlässigkeit	<ul style="list-style-type: none"> • In welcher Zeit durchdringt ein passiv diffundierender Vitalfarbstoff einen Gewebeschnitt? 	<ul style="list-style-type: none"> → in durchschnittlich 9h (s.u., Abb. 17)

Zur Etablierung und Optimierung der Herstellung und Kultivierung von Gewebeschnitten und für die in Tab. 13 aufgeführten Vergleiche wurde Tumormaterial von insgesamt mehr als 50 Patienten mit kolorektalem Karzinom aufgearbeitet (optimierte Bedingungen s. 2.3.2.1).

Zusammenfassend konnten mit der optimierten Prozedur zur Aufarbeitung und Kultivierung von Gewebeschnitten die in Abb. 14 präsentierten statistisch erfassten Schnitzzahlen, Vitalitätsraten sowie Kultivierbarkeiten erreicht werden.

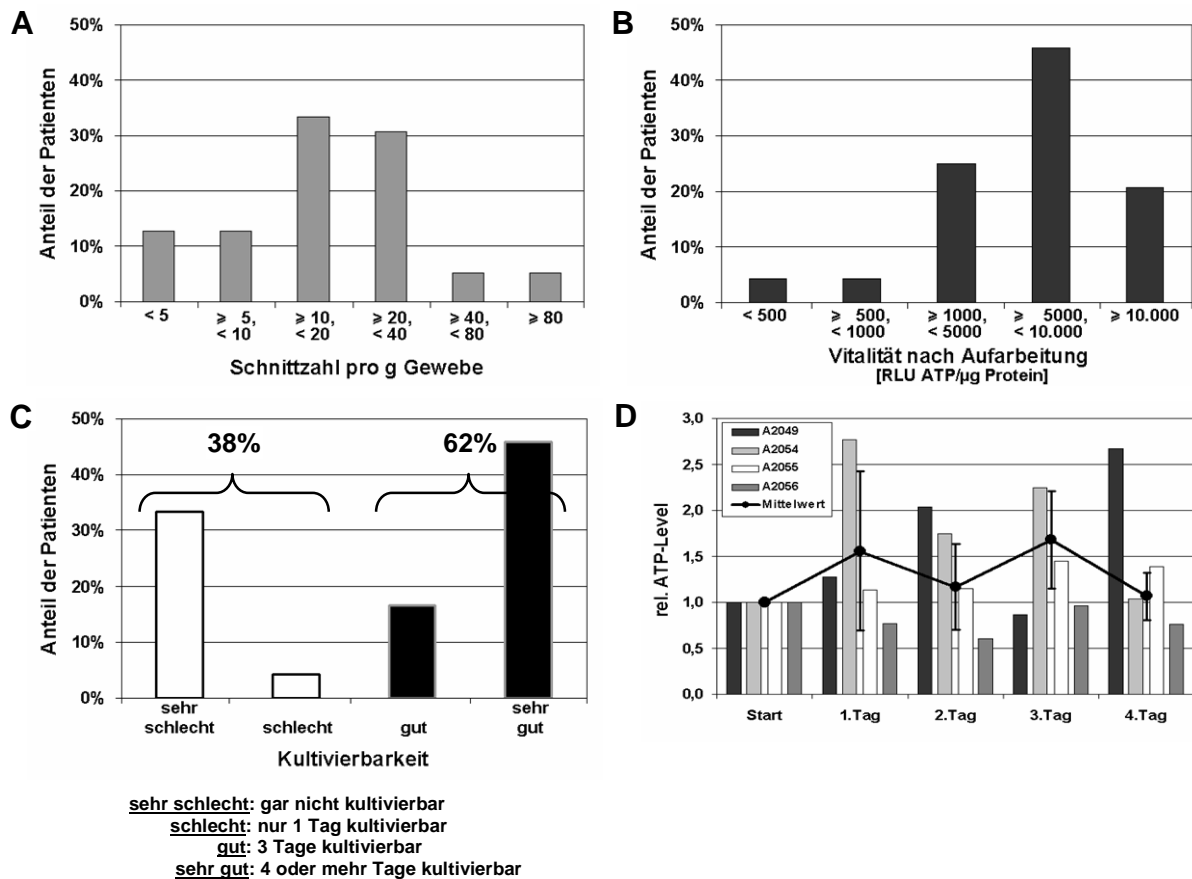


Abb. 14: Statistik zur Gewinnung und Kultivierung von Gewebeschnitten

Es sind die statistischen Auswertungen zur Gewinnung und Kultivierung von mit der optimierten Prozedur aufgearbeiteten Gewebeschnitten gezeigt. Abgebildet ist jeweils der prozentuale Anteil der aufgearbeiteten Patientengewebe. **A** Schnitzzahl pro g Gewebe. **B** Vitalität nach Aufarbeitung. **C** Kultivierbarkeit. Für die Einteilung „sehr schlecht“, „schlecht“, „gut“ und „sehr gut“ wurde die Anzahl der erfolgreich und vital kultivierbaren Tage herangezogen (s. Legende). **D** Gezeigt sind die ATP-Messungen von vier Gewebeschnittkulturen, die „gut“ und „sehr gut“ bis zum 4. Tag kultiviert werden konnten sowie die Mittelwerte.

Im Mittel konnten 20 Schnitte pro Gramm Gewebe hergestellt werden (statistische Verteilung in Abb. 14 A). Aus einem durchschnittlich 4g schweren Tumorstück wurden somit 80 und mehr solcher Schnitte gewonnen, was eine für multiple Analysen ausreichende Zahl darstellte. Mit Gewebeschnitten von 400µm-Dicke konnte die größte Zahl an Schnitten pro Gewebe gewonnen und eine vitale Kultivierung erreicht werden. Die Vitalität der Gewebeschnitte wurde mittels ATP-Messung bestimmt, wobei der grundlegende ATP-Level der verschiedenen Tumorgewebe sehr unterschiedlich hoch war (Abb. 14 B). Die Höhe des ATP-Levels beeinflusste jedoch nicht die Kultivierbarkeit der Gewebeschnitte. Dieser wurde bis

maximal sieben Tage ermittelt, indem direkt nach Aufarbeitung und nach unterschiedlicher Kulturdauer an mehreren Schnitten der ATP-Level vermessen wurde. In Abb. 14 C sind als „sehr schlecht“ solche Gewebeschnittkulturen eingeordnet, die sich gar nicht kultivieren ließen, als „schlecht“ diejenigen, die nur einen Tag vital blieben. „Gut“ und „sehr gut“ hingegen waren alle Kulturen, die drei, vier oder mehr Tage mit stabiler Vitalität kultiviert werden konnten (ATP-Level bezogen auf den ersten Wert nach Aufarbeitung). Abb. 14 D zeigt hierzu beispielhaft an vier Gewebeschnittkulturen, die als „gut“ und „sehr gut“ eingeordnet wurden, den relativen Vitalitätsverlauf vom Start der Kultivierung als Referenz (= 1). Bis zum vierten Tag vital kultivierbare Gewebeschnittkulturen konnten somit aus 62% der aufgearbeiteten Gewebe hergestellt werden.

Um festzustellen, ob diese Gewebeschnittkulturen in solchen Zeiträumen methodisch vielfältig verwendbar waren, mussten die Morphologie, die Proliferation sowie die Zellzusammensetzungen der Gewebeschnitte analysierbar sein. Dies erfolgte mikroskopisch, durch HE- und IHC-Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 ^[108] und durch Immunfluoreszenzfärbung der Epithelzellen und Fibroblasten. Abb. 15 zeigt beispielhaft mikroskopische Bilder der HE- und IHC-Färbung (Ki67) von verschiedenen Schnitten des repräsentativen Patientengewebes A2041.

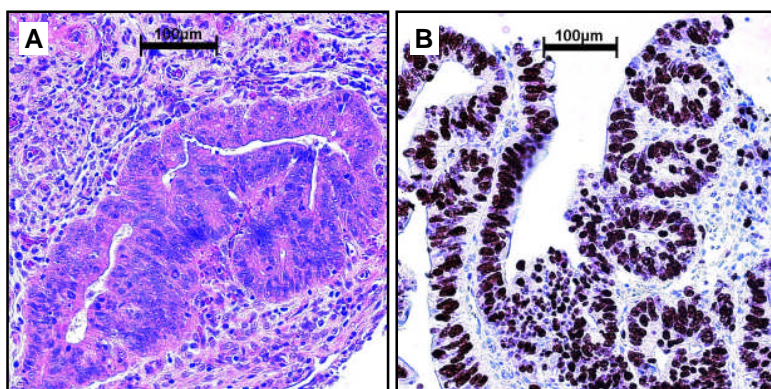


Abb. 15: Mikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten

Gezeigt sind in Formalin fixierte und quer geschnittene Gewebeschnitte des Patienten A2041, 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab. Die HE-Färbung (A) zeigt Tumor- und Stromabereiche. Die IHC-Kernfärbung des Markers Ki67 (B) zeigt proliferierende Tumorzellen (braun) und negativ gefärbte Stromabereiche.

Die heterogene Morphologie der Gewebeschnitte ist deutlich zu sehen. Durch die positive Ki67-Kernfärbung (braun) sind darüber hinaus proliferierende Zellen nachweisbar, eine Voraussetzung, um Zytostatika- Wirkungen analysieren zu können.

Wie Vergleiche zwischen den gesamten Patientengeweben zeigten, sind die Morphologien, Proliferationsraten und der ATP-Level der Ursprungsgewebe individuell unterschiedlich. Durch Vitalitätsanalysen und Immunfluoreszenzfärbungen wurde zusätzlich die Heterogenität zwischen einzelnen Schnitten desselben Patienten analysiert. Es wurden sowohl Schnitte aus verschiedenen Streifen als auch

die eines einzelnen Streifens verglichen (s.o. bzw. Herstellung in 2.3.2.1). Die Morphologie- und Vitalitätsanalysen zeigten, dass sich Schnitte in einem Abstand von 3-4mm zueinander sichtbar in Struktur und ATP-Gehalt unterscheiden konnten, die Unterschiede zwischen unterschiedlichen Gewebestreifen waren noch größer. Abb. 16 A zeigt bei zwei Patienten und jeweils drei Zeitpunkten die ATP-Mittelwerte und Abweichungen von drei Schnitten im 10er-Abstand (3-4mm). Die Kurven beider Patienten zeigen zum einen die deutliche Heterogenität zwischen den einzelnen Schnitten, was Mehrfachbestimmungen bzw. das Vereinen mehrerer Schnitte in einer Probe notwendig machte. Zum anderen weisen sie einen extrem unterschiedlichen Grundlevel an ATP auf, was mit den zuvor erhaltenen Daten individueller Grundlevel korrespondiert. Dies machte separate Analysen einzelner Patientengewebe notwendig, um auch die Individualität der Patienten zu berücksichtigen.

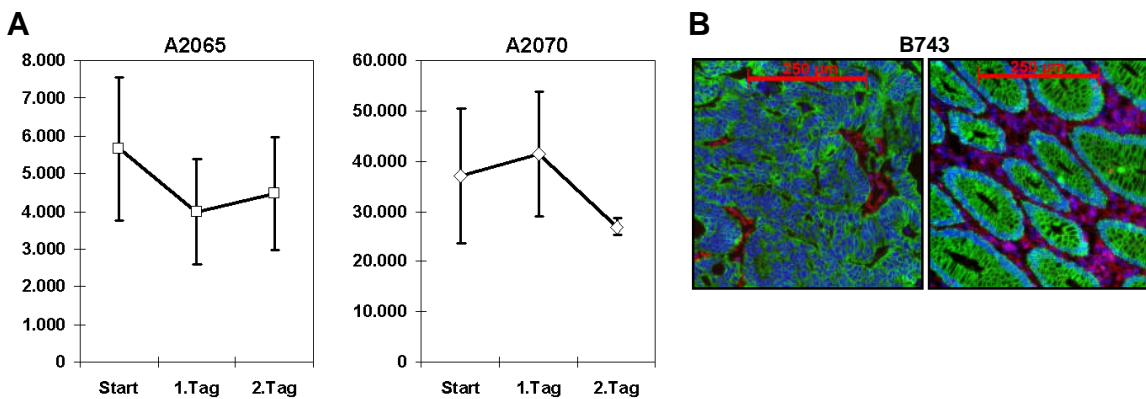


Abb. 16: ATP-Bestimmung und Vergleich verschiedener Schnitte

Aus dem Gewebematerial der Patienten A2065 und A2070 wurden Gewebeschnitte hergestellt und bis zum 2. Tag kultiviert. Das Gewebe des Patienten B743 wurde direkt nach Resektion in Formalin konserviert. Die ATP-Bestimmung (**A**) von je drei Gewebeschnitten pro Zeitpunkt und Patient (Mittelwerte und Standardabweichungen), die zehn Schnitte (3-4mm) auseinander lagen, zeigt sowohl die unterschiedlichen ATP-Level der verschiedenen Schnitte einer Probe als auch die extrem unterschiedlichen Grundlevel verschiedener Patienten. Die Immunfluoreszenzfärbung (**B**), 200-fache Vergrößerung mit 250µm-Maßstab, zeigt den unterschiedlichen morphologischen Aufbau aus Tumor- (links), Stromabereichen (links und rechts) und normalem Epithel (rechts) innerhalb des Gewebes. Epithelzellen sind grün, Fibroblasten des Stromas rot und die Zellkerne blau (Hoechst 33342) gefärbt.

Der Patient B743 repräsentiert stellvertretend die morphologischen Unterschiede des Gewebematerials zwischen sehr kompakten Tumorbereichen (Abb. 16 B links) und normalen Krypten und Stromaanteilen (Abb. 16 B rechts). Um Gewebe-interne Inhomogenitäten auszugleichen und repräsentative Analysen und Vergleiche am individuellen Gewebe einzelner Patienten zu ermöglichen, müssen daher mindestens drei Schnitte für eine einzelne Analyse vereint werden.

Die Verwendung von dreidimensionalen *In vitro*-Kulturen musste darüber hinaus unbedingt das Durchdringen von Nährstoffen des Mediums, der Begasung als auch weiterer Substanzen wie Medikamente unabhängig von einer Blutversorgung gewährleisten. Um dies zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte mit einem passiv durch Gewebe diffundierenden 0,8kDa Vitalfarbstoff (C22803, Molecular Probes) inkubiert. Dieser färbte nur lebende Zellen und war im Fluoreszenzmikroskop bei 488nm sichtbar.

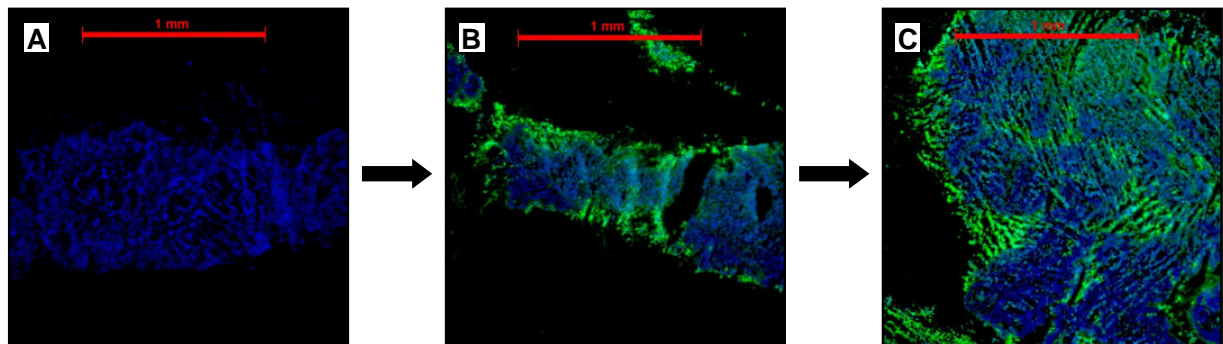


Abb. 17: Zeitabhängige Diffusion eines Vitalfarbstoffs durch 400µm-dicke Gewebeschnitte

Aus dem kolorektalen Karzinom des Patienten A2307 wurden Gewebeschnitte hergestellt und zwei Stunden nach Kulturbeginn mit dem Diffusions- und Vitalfarbstoff C22803 (Molecular Probes) in der Konzentration 30µM für 3h, 6h, 9h, 12h und 15h behandelt. Nach Kryokonservierung wurde die Diffusion auf Objektträgern durch Mikroskopie kontrolliert. Die Zellkerne sind blau (Hoechst 33342), der Diffusions- und Vitalfarbstoff C22803 ist grün gefärbt, 200-fache Vergrößerung mit 1mm-Maßstab. **A** Zugabezeitpunkt = 0h. **B** 9h Diffusion, hochkant. **C** 12h Diffusion, flach.

Die Analysen zeigten (Abb. 17), dass der Farbstoff durchschnittlich innerhalb von 9h bis ins Zentrum eines 400µm-dicken Schnittes diffundierte und somit die essentielle Durchdringung gegeben ist.

Der Vorteil dieses *In vitro*-Kultursystems war demnach:

- Die Verwendung der originalen heterogenen Zellzusammensetzung und der dreidimensionalen Struktur von individuellen Tumoren ohne Verlust von Zellen durch die Isolierung.
- Durch Vereinen mehrerer Schnitte konnten morphologische und in der Vitalität repräsentative Probenansätze gewonnen werden.
- Es stand genügend Material für eine Vielzahl an Analysen zur Verfügung. Methoden wie RNA-Aufarbeitungen, quantitative Proteinanalysen mit sensitiven ELISA-Systemen sowie immunhistologische Analysen waren möglich und sind in den folgenden Abschnitten der Arbeit näher beschrieben (s. 3.1.3 und 3.2).

3.1.3 Genexpressionsanalysen von Kurzzeit-Kultur primärer Zellen und Gewebeschnitten

Im vorherigen Abschnitt konnte erfolgreich dargelegt werden, dass primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur und Gewebeschnitte in ausreichenden Mengen gewonnen und für genügend lange Zeit kultiviert werden können, um auf ihrer Basis eine Vielzahl an Analysen durchzuführen. Inwieweit diese beiden Kultursysteme den Zustand eines Ursprungstumors widerspiegeln und somit in Medikamententests verwendbar sind, ist bislang nur wenig erforscht. Um dies festzustellen, wurden Vergleichsanalysen beider *In vitro*-Kultursysteme mit dem Originalgewebe notwendig.

Es wurden hierfür Genexpressionsanalysen durchgeführt, um folgende nachstehende Fragen zu klären:

- Welchen Einfluss hat die Kurzzeit-Kultur über wenige Tage auf die Genexpressionsmuster? (3.1.3.1)
- Wie stabil sind die Genexpressionsmuster und die einzelner Tumor-revanter Gene im Vergleich zum Ursprungsgewebe? (3.1.3.2)

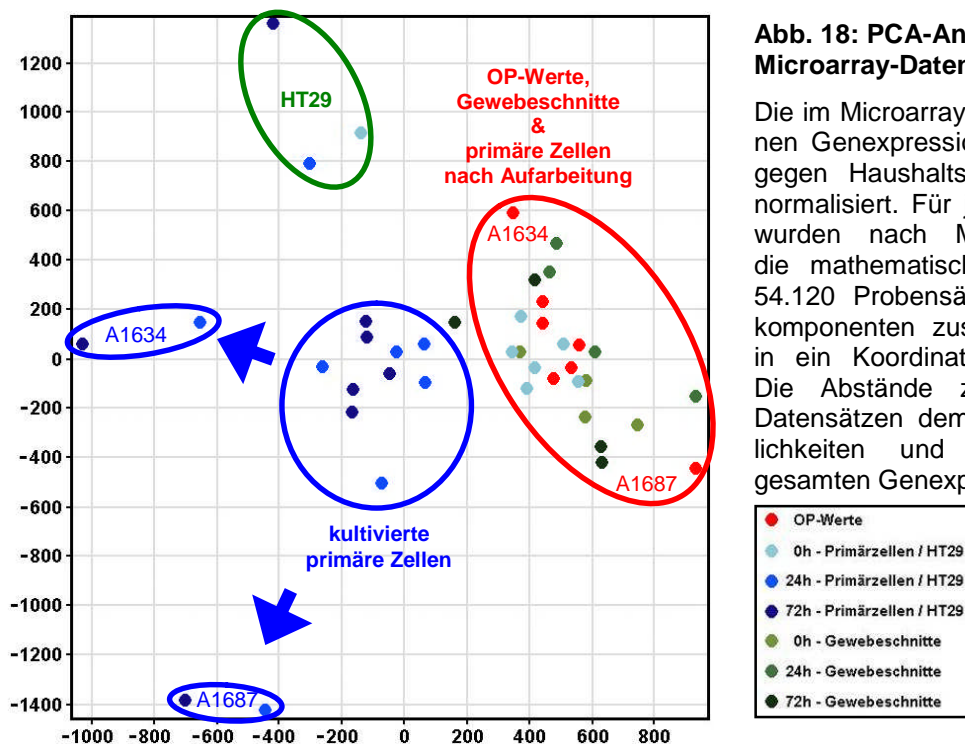
Hierfür wurden von folgenden sieben Patienten mit kolorektalem Karzinom Tumorgewebe entnommen und direkt nach der Operation Gewebe als Referenz eingefroren: A1234, A1313, A1634, A1659, A1687, B593 und B640. Von allen Patientengeweben wurden anschließend primäre Zellen isoliert und bei vier der sieben Patienten (A1234, A1634, A1659, A1687) zusätzlich Gewebeschnitte zur Kultivierung hergestellt. Von den primären Zellen und Gewebeschnitten wurden Proben direkt nach der Aufarbeitung zur Analyse verwendet sowie nach Kurzzeit-Kultur über 24h und 72h. Als Referenzvergleich für Zelllinien wurden HT29 direkt vor der Aussaat, nach 24h- und 72h-Kultivierung eingesetzt. Aus diesen Proben wurde die Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zu biotinylierter cRNA amplifiziert. Diese wurde anschließend für Microarray-Analysen mit dem »„high-density“ Chip HG-U133 Plus 2.0« (Affymetrix) verwendet, der in einem 54.120 Proben umfassenden Datensatz 38.572 Gene mit 47.401 Transkriptvarianten und 6.285 nicht eingeordnete Gene beinhaltet.

3.1.3.1 Vergleich der primären Zellen, Gewebeschnitte und der Zelllinie HT29

Um festzustellen, wie sich die primären Zellen, Gewebeschnitte und die Zelllinie HT29 in ihren Genexpressionsmustern unterscheiden und ob sich diese durch die Kultivierung bis 72h veränderten, wurde – nach Normalisierung und Varianz-

stabilisierung – eine Hauptkomponentenanalyse / „Principal Component Analysis“ (PCA) durchgeführt. Hierbei wurden sämtliche Messwerte der Affymetrix-Chips herangezogen. Es wurden zwei Hauptfaktoren ermittelt, bezüglich derer die Messwerte die größten Varianzen aufwiesen. Anschließend wurden die Daten der analytischen Proben jeweils auf einen Koordinatenpunkt in Relation zu den zwei Hauptkomponenten projiziert. Durch diese Faktorenanalyse konnten ähnliche Proben – je ähnlicher, desto enger benachbart – zusammengefasst werden, um einen Überblick über mögliche Probengruppen zu erhalten. Analysen über die Zahl und Qualität einzelner auftretender Genexpressionsänderungen sind hieraus jedoch nicht zu ermitteln und fanden im nachfolgenden Abschnitt (3.1.3.2) statt.

Die PCA-Analyse in Abb. 18 zeigt, dass die Ursprungsgewebe (OP-Werte) aller sieben Patienten (rote Punkte) über einen großen Bereich streuen (rote Umrandung). Diese sehr weit gefasste Population der verschiedenen Patienten ist ein Indiz für die Individualität der Tumor-spezifischen Genexpressionsmuster.



Die Gewebeschnitte (grüne Punkte) konnten in dieselbe Population eingeordnet werden. Sie entfernten sich hinsichtlich der Ähnlichkeiten ihrer Genexpressionsmuster sowohl nach Aufarbeitung als auch nach Kultivierung bis 72h nur wenig vom Zustand der Originaltumore.

Durch Aufarbeitung und Isolierung der Zellen aus dem Gewebeverband (hellblaue Punkte in roter Umrandung) wurden die Ähnlichkeiten zum Ursprungsgewebe

ebenfalls nur geringfügig beeinflusst. Durch die Kultivierung der primären Zellen hingegen (blaue und dunkelblaue Punkte) entstanden in den Ursprungsgeweben separate und benachbarte neue Populationen (blaue Umrandungen). Die primären Zellen der Patienten A1634 und A1687 zeigten hierbei unterschiedliche und jeweils sehr große Abweichungen ihrer Muster.

Die HT29 bildeten deutlich abseits der primären Zellen eine separate Population (grüne Umrandung). Sie ähnelten den anderen Proben und Ursprungsgeweben der sieben Patienten nur wenig. Sie präsentierten sich auch aufgrund des Fehlens von Vergleichs- und Ursprungsgewebe als unabhängige und individuelle Population.

Wie viele Gene sich jeweils durch die Kultivierung in primären Zellen, Gewebeschnitten und der Zelllinie HT29 signifikant veränderten, wurde im Folgenden analysiert.

Es konnte eine Anzahl von 8175 Genen ermittelt werden, die in sämtlichen Proben durchgehend detektiert wurden. Ausgehend von dieser Gengruppe wurden die weiteren Analysen durchgeführt. Um sämtliche Änderungen der Zeitreihen (24h und 72h) bezogen auf die Proben nach Aufarbeitung (= 0h) als Referenz einzeln analysieren zu können, wurden Zweiervergleiche (unpaariger t-Test) durchgeführt. Hierbei wurden alle Werte ≥ 3 -fach und $p \leq 0,05$ (Benjamini-Hochberg Korrektur ^[109]) als signifikant angenommen, um die Zahl der falsch-positiven Daten zu verringern. Insgesamt konnten 568 signifikant veränderte Gene identifiziert werden. Die primären Zellen wiesen anteilig die meisten Genexpressionsänderungen auf (384 Gene). In den Gewebeschnitten hingegen waren nur 54 Gene verändert. Die HT29 zeigten 130 Gene mit geänderter Expression. Wiederum demonstrierten die Gewebeschnitte die geringsten Änderungen bis 72h.

Die folgende hierarchische Clusteranalyse bildete die Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Proben in einer Gruppenunterteilung („Cluster“) ab. Die Proben wurden hinsichtlich ihrer Expressionsmuster schrittweise zu immer größeren Clustern zusammengefasst, wobei ähnliche Proben früh bzw. in der Distanzberechnung der Ähnlichkeitsmerkmale enger gruppiert wurden. Die Clusteranalyse wurde in einem Dendrogramm visualisiert, einer hierarchischen Baumstruktur mit Distanzberechnung der Ähnlichkeitsmerkmale.

Das in Abb. 19 dargestellte Dendrogramm basiert auf den 8175 in sämtlichen Proben detektierten Genen. Es wurden die Mittelwertberechnungen der einzelnen Zeitpunkte und *In vitro*-Kultursysteme verwendet, um mit dem 0h-Wert der Zelllinie HT29 als

Referenz die dem hierarchischen Cluster zugrunde liegenden Expressionsdaten zu berechnen.

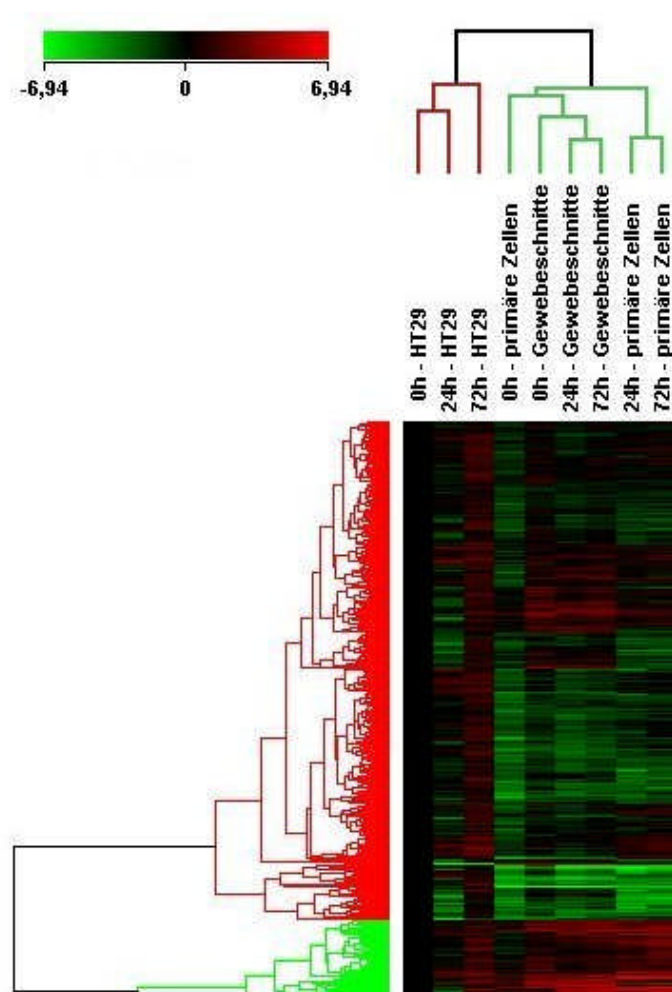


Abb. 19: Hierarchisches Cluster der Microarray-Daten (Affymetrix) nach Mittelwertberechnung

Es wurden diejenigen 8175 Gene der Microarray-Daten verwendet, die in allen Probandensätzen zuverlässig detektiert wurden. Es wurden Mittelwertberechnungen der Zeitpunkte 0h, 24h und 72h der Zelllinie HT29, der primären Zellen bzw. der Gewebeschnitte gebildet. In der Clusteranalyse ist der 0h-Wert der HT29 als Referenz gewählt, und sowohl die 8175 Gene als auch die gemittelten Datensätze sind als Ähnlichkeits-Stammbaum dargestellt. Rot dargestellte Gene zeigen im Vergleich zum 0h-Wert der HT29 bis 6,94-fach höher exprimierte, die grünen bis 6,94-fach niedriger exprimierte Gene.

Um im Überblick der gemittelten Proben die größten Ähnlichkeiten zwischen den Expressionen jedes einzelnen der 8175 Gene festzustellen, wurde die obere Stammbaumverteilung betrachtet. Diejenigen Probengruppen mit der größten Ähnlichkeit gruppieren am engsten zusammen. Die kultivierten Gewebeschnitte zeigten die meisten Gemeinsamkeiten und bildeten anschließend mit ihrem 0h-Wert ein gemeinsames Cluster. Diese Analyse bestätigte nochmals die geringen Veränderungen in den Gewebeschnitten.

Die primären Zellen hingegen wiesen wie in der PCA-Analyse deutlichere Änderungen auf. Den Gewebeschnitten am ähnlichsten waren die 0h-Werte, primäre Zellen direkt nach Isolierung aus dem Gewebe. Die durch die Kultivierung verursachten Veränderungen waren deutlich größer.

Die HT29 standen wie schon in der PCA-Analyse abseits der primären Zellen und der Gewebeschnitte. Sie gruppieren allein und waren erst dann als solches Cluster

beiden Kurzzeit-kultivierten *In vitro*-Systemen zuzuordnen. Die HT29 blieben auch dann eine eigene Gruppe, wenn die Patienten einzeln und nicht nach Mittelwertberechnung zu einer entsprechenden Clusteranalyse verwendet wurden.

Es konnte festgehalten werden:

- Die HT29 wiesen als seit langem etablierte Zelllinie spezifische Genexpressionsmuster auf, die sich von den sieben individuellen Kurzzeit-Kulturen deutlich unterschieden.
- Die einzelnen Patiententumore demonstrierten sehr individuelle Muster.
- Die primären Zellen entfernten sich durch die Kultivierung von dem Zustand des Ursprungsgewebes individuell unterschiedlich und waren in ihrer Genexpression weniger stabil als die Gewebeschnitte.

3.1.3.2 Vergleich der primären Zellen und Gewebeschnitte in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe

Um nun zu analysieren, wie umfangreich die aufgetretenen Änderungen waren, um welche Gene es sich handelte und ob sie die Verwendung der *In vitro*-Kulturen für Medikamententests einschränkte, wurde im folgenden Abschnitt sowohl der Einfluss der Aufarbeitung als auch der der Kurzzeit-Kultivierung auf die Genexpression der primären Zellen und der Gewebeschnitte untersucht.

Ein zunächst durchgeführter Vergleich der Expressionsmuster der Ursprungsgewebe beruhte auf einer Korrelationsanalyse. Wie schon die Population der OP-Werte der Abb. 18 (rote Umrandung) zeigte, waren die individuellen Unterschiede hinsichtlich der kompletten Genexpressionsmuster deutlich erkennbar (Abb. 20). Die Farbabstufungen von rot über schwarz zu grün verwiesen auf zunehmend geringere Korrelation der Expressionsmuster der Ursprungsgewebe (OP-Werte).

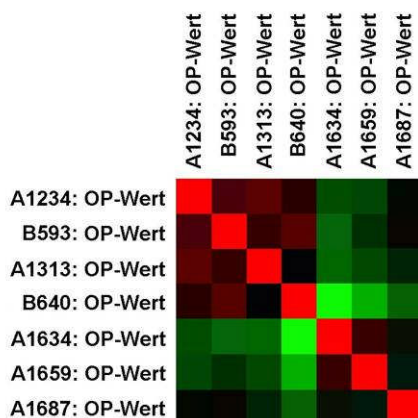


Abb. 20: Korrelationsanalysen der OP-Werte

Für die Korrelationsberechnung wurden die normalisierten Daten der 54.120 Probensätze herangezogen. Die Berechnung erlaubt einen Vergleich der OP-Werte und stellt ihre Korrelation farblich dar. Helles rot bedeutet absolute Korrelation, dunkleres rot bis schwarz und schwarz bis hellgrün zunehmend geringere Korrelation der Datensätze.

Wie schon bei den OP-Werten zu sehen, bestanden auch bei den weiteren Proben Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten. Die Individualität der Genexpressionsmuster der einzelnen Patienten machte es notwendig, Analysen nicht nur innerhalb von Patientengruppen sondern auch für jeden Patienten separat durchzuführen. Bei Analysen, die auf Gruppen basierten, wurden daher die individuellen Ergebnisse eines jeden Patienten grundsätzlich auf Abweichungen kontrolliert. Es wurden jedoch keine Abweichungen festgestellt, die auf Gruppen basierende Aussagen oder mögliche Interpretationen beeinflussten. Daher wurde im Folgenden auf die Nennung Patienten-individueller Ergebnisse verzichtet und die Daten von Gruppenanalysen verwendet.

Um nun die Effekte der Aufarbeitung von primären Zellen und Gewebeschnitten mit in die Analysen einzubeziehen, wurden die Ursprungsgewebe (OP-Werte) als Referenz genommen. Die Messergebnisse nach Aufarbeitung (= 0h), 24h- und 72h-Kultur wurden auf die entsprechenden OP-Werte der Patienten bezogen und Zweiervergleiche berechnet (unpaariger t-Test, Benjamini-Hochberg-Korrektur ^[109]). Als signifikante Änderung galten wiederum alle Werte ≥ 3 -fach und $p \leq 0,05$.

Ausgehend von 9837 in allen Patientenproben durchgehend detektierbaren Genen konnten in den primären Zellen 327 und in den Gewebeschnitten 74 signifikant veränderte Gene identifiziert werden. Die Zahl der veränderten Gene war bei beiden *In vitro*-Kulturen durch die Aufarbeitung sehr gering, stieg aber mit zunehmender Kulturdauer. Es traten demnach Genexpressionsveränderungen auf, die über die Zeit verfolgbar waren.

Welche Relevanz diese Änderungen für die Qualität der beiden *In vitro*-Kultursysteme besaßen, um welche Änderungen es sich im Einzelnen handelte und welche relevanten Gengruppen daran beteiligt waren, wurde im nächsten Schritt durch Untersuchungen zur Gen-Ontologie geklärt. Die jeweils als signifikant verändert identifizierten Gene wurden hierfür mittels „OntoExpress“-Software analysiert. Diese ordnet die einzelnen Daten aufgrund ihrer KEGG-Einteilung (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ^[110]) Gruppen der „biologischen Prozesse“, der „zellulären Komponenten“ und der „molekularen Funktionen“ zu. Hierbei wurden nur diejenigen Ontologie-Gruppen verwendet, die mit $p \leq 0,05$ signifikant zugeordnet wurden. In welche „biologischen Prozesse“ diese Gene eingruppiert werden konnten, zeigt die Abb. 21.

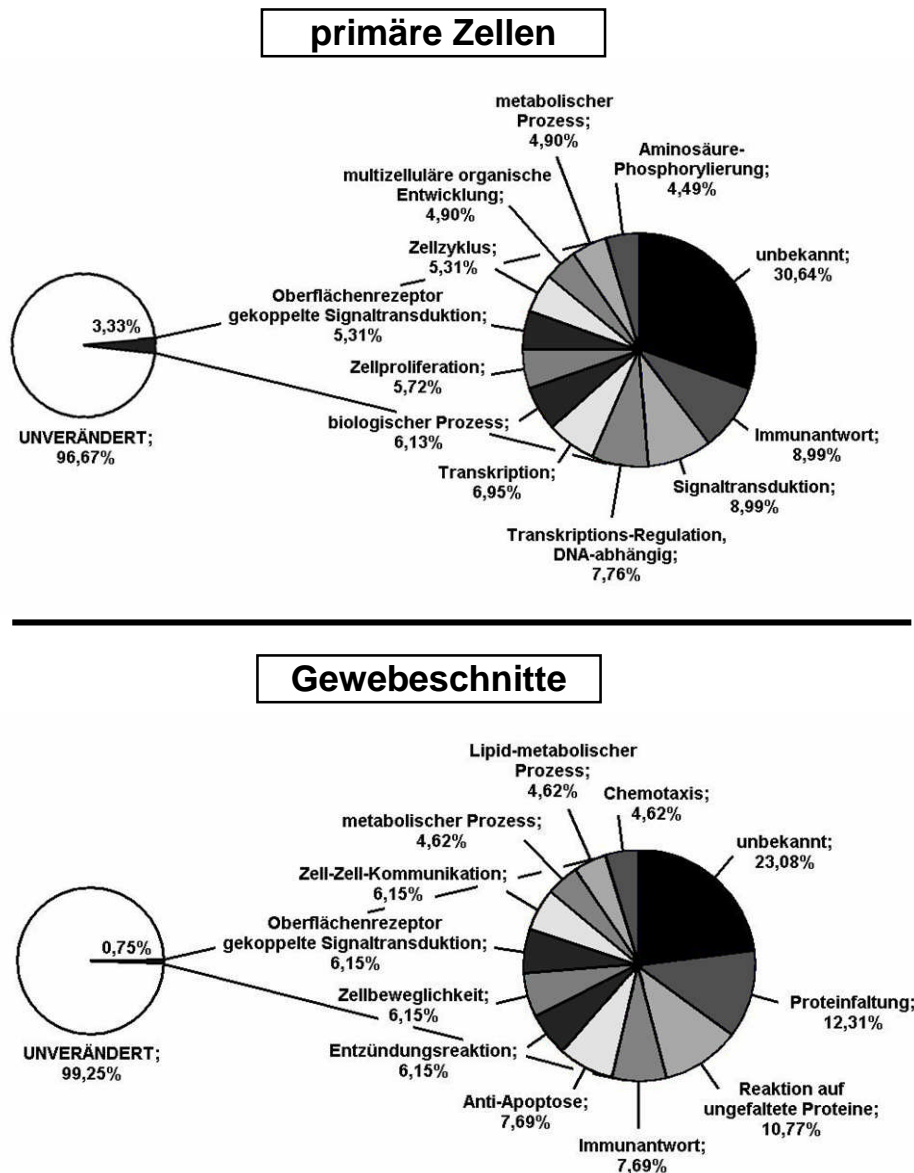


Abb. 21: Einordnung der signifikant veränderten Gene in Gengruppen (Gen-Ontologie-Analyse)

Die 327 in primären Zellen und 74 in Gewebeschnitten signifikant veränderten Gene wurden mit der Software Onto-Express hinsichtlich ihrer Verteilung und Zugehörigkeit ($p \leq 0,05$) zu Gengruppen des „biologischen Prozesses“ analysiert. Die Daten der primären Zellen (oben) und die der Gewebeschnitte (unten) wurden getrennt untersucht. Die linken Diagramme geben jeweils das tatsächliche Verhältnis von unveränderten und veränderten Genen innerhalb der Gesamtheit der 9837 detektierten Gene an. Die rechten Diagramme präsentieren den jeweiligen Ausschnitt der veränderten Gene im Detail. Sie zeigen die identifizierten Gengruppen und ihre prozentualen Anteile an der Gesamtheit der jeweils signifikant veränderten Gene.

In beiden *In vitro*-Kultursystemen konnten beteiligte Gengruppen identifiziert werden, die eine hohe Relevanz für Kultur- und Verhaltenscharakteristika solcher Kulturen besitzen. Die Prozentangaben stellen die Anteile an den jeweils veränderten Genen dar. Expressionsveränderungen an solchen Gengruppen könnten die Verwendbarkeit der *In vitro*-Kulturen einschränken. Da aber von einer Grundgesamtheit von 9837 detektierbaren Genen ausgegangen werden musste, stellten die 327 in primären Zellen signifikant veränderten Gene nur einen Anteil von 3,33% dar, die 74 Gene in

Gewebeschnitten sogar nur 0,75%. Dadurch erreichten die diesen verschiedenen „biologischen Prozessen“ zugeordneten Gene tatsächlich nur Anteile zwischen <1% und <0,2% aller detektierten Gene.

Um zu klären, um welche Gene es sich handelte, wurden die Listen der signifikant veränderten Gene im Detail analysiert. Hierbei wurden wiederum die Listen der einzelnen Patienten kontrolliert, um einmalige Genexpressionsänderungen zu berücksichtigen. Tab. 14 zeigt eine nach Abschluss der Untersuchungen getroffene Auswahl an Genen, die sich in primären Zellen und / oder Gewebeschnitten in ihrer Expression änderten oder unverändert blieben.

Tab. 14: Beispielgene und ihre Genexpressionsänderungen zum Ursprungsgewebe (OP-Werte)

Aufgelistet sind ausgewählte Gene und ihre Genexpressionsveränderungen zum Ursprungsgewebe. Angegeben sind die Tendenzen der Veränderungen. Abgebildet sind die Kurzzeit-Kulturen von primären Zellen und Gewebeschnitten (Microarray, Affymetrix; mittlere Spalten) sowie die Änderungen der entsprechenden Gene in den Langzeit-kultivierten primären Zellen A413 (DualChip, Eppendorf; rechte Spalte). Gene mit „-“ sind nicht bestimmt worden.

Gen (Kürzel)	Kurzzeit-Kultur				Langzeit-Kultur	
	primäre Zellen		Gewebeschnitte		primäre Zellen	
<i>AKT</i>	unverändert	=	unverändert	=	-	
<i>FOS</i>	unverändert	=	unverändert	=	erhöht	↑
<i>CTNNB1</i>	unverändert	=	unverändert	=	erniedrigt	↓
<i>FAS</i>	unverändert	=	unverändert	=	-	
<i>CEACAM5</i>	unverändert	=	unverändert	=	erniedrigt	↓
<i>ERBB2</i>	unverändert	=	unverändert	=	erniedrigt	↓
<i>EGFR</i>	unverändert	=	unverändert	=	erhöht	↑
<i>MAPK1</i>	unverändert	=	unverändert	=	-	
<i>GSK3B</i>	unverändert	=	unverändert	=	-	
<i>HIF1A</i>	unverändert	=	unverändert	=	erhöht	↑
<i>CDKN1A</i>	unverändert	=	unverändert	=	unverändert	=
<i>CDKN1B</i>	unverändert	=	unverändert	=	-	
<i>TP53</i>	unverändert	=	unverändert	=	unverändert	=
<i>STMN1</i>	unverändert	=	unverändert	=	erniedrigt	↓
<i>VEGFA</i>	unverändert	=	unverändert	=	erhöht	↑
<i>FLT4</i>	unverändert	=	unverändert	=	erhöht	↑
<i>ANXA1</i>	unverändert	=	erhöht	↑	-	
<i>HSPA1A / B</i>	unverändert	=	erhöht	↑	-	
<i>IL8</i>	erhöht	↑	erhöht	↑	-	
<i>IL18</i>	erhöht	↑	unverändert	=	-	
<i>PLAUR</i>	erhöht	↑	unverändert	=	erhöht	↑

Sowohl in primären Zellen als auch in Gewebeschnitten stieg die Expression des Interleukin 8 (*IL8*), ein Faktor in Chemotaxis und Entzündungsreaktion ^[111]. In den primären Zellen stieg zudem Interleukin 18 (*IL18*) ^[112] sowie der uPA-Rezeptor (*PLAUR*) ^[101, 102]. In Gewebeschnitten blieben diese Gene unverändert, im Gegensatz zur gestiegenen Expression von Annexin A1 (*ANXA1*) ^[113] und *HSPA1A/B* ^[114]

(heat shock 70kDa protein 1A / B). Neben diesen wenigen signifikant veränderten Genen waren diverse Tumor-relevante Gene in ihrer Expression unbeeinflusst. Einige dieser Gene, *FOS*, *CEACAM5*, *EGFR*, *HIF1A*, *TP53*, *CDKN1A* und *VEGFA*, veränderten sich in ihrer Expression in der Langzeit-Kultur der primären Zellen A413 deutlich, wohingegen sie in beiden Kurzzeit-Kulturen stabil blieben. Des Weiteren wurden Signaltransduktionskinasen wie *AKT* (Akt), *MAPK1* (ERK 1/2) und *GSK3B* (GSK-3 β) kontrolliert, da in Medikamententests verwendbare *In vitro*-Kulturen in Signalwegen zur Steuerung von Proliferation, Apoptose und Überleben ebenfalls stabil sein müssen. Eine Fortsetzung entsprechender Veränderungen auf Proteinebene könnte die Reaktionsfähigkeit auf Medikamente und die physiologischen Charakteristika verändern [64, 115]. Die Signaltransduktionskinasen blieben jedoch in beiden Kultursystemen in ihrer Genexpression stabil.

Zusammenfassend verdeutlichten diese Vergleichsergebnisse:

- In Kurzzeit-Kulturen primärer Zellen und von Gewebeschnitten traten deutlich weniger Genexpressionsänderungen auf als in den Langzeit-Kulturen primärer Zellen.
- Die auftretenden Änderungen im Vergleich zum Originalgewebe waren sehr gering und wurden vernachlässigt, da diverse Tumor-relevante Gene (s.o.) und Gene von Signaltransduktionsproteinen stabile Expressionsmuster aufwiesen.

Beide *In vitro*-Systeme wurden daher als geeignet eingestuft, um als Grundlage für Medikamententests eingesetzt zu werden.

3.2 Etablierung und Evaluierung einer multi-funktionellen Medikamententestplattform

In diesem Abschnitt wurde eine Medikamententestplattform etabliert und evaluiert. Nachdem im vorherigen Abschnitt die Auswahl von geeigneten *In vitro*-Kultursystemen getroffen wurde, mussten zunächst folgende Parameter erfüllt werden:

- Es wurden Messmethoden gewählt, die eine Verwendung an den identifizierten *In vitro*-Kultursystemen erlaubten und die vielfältigen Wirkungswege von Medikamenten abdeckten: die Beeinflussung des Zellzyklus, der Proliferation, der Vitalität und der Apoptose sowie der großen Zahl an Signaltransduktionsproteinen.

- Es wurden nur solche Messmethoden herangezogen, die parallel und an den in der Menge limitierten *In vitro*-Kultursystemen durchführbar waren (s. 3.1.2).
- Zur Etablierung und Evaluierung wurden Medikamente gewählt sowie ihre Dosierungen und die Messzeiträume ermittelt, mit denen in den *In vitro*-Kultursystemen signifikante Effekte messbar waren.

3.2.1 Etablierung der Medikamententestplattform

Zur Auswahl der geeigneten Messmethoden, Medikamente, Dosierung und Messzeiträume wurde zunächst die Zelllinie HT29 verwendet. Die dadurch gewonnenen Ergebnisse wurden grundsätzlich anhand von Langzeit- und Kurzzeit-Kulturen auf vergleichbare Durchführbarkeit überprüft.

An Langzeit-kultivierten primären Zellen und der Zelllinie HT29 wurde anschließend die Etablierung der Medikamententestplattform durchgeführt und erste Ergebnisse zu Medikamentenwirkung und individuellen Reaktionen der *In vitro*-Kulturen analysiert, um anschließend eine Auswahl der Medikamente für die Evaluierung an Kurzzeit-Kulturen vorzunehmen. Wie zuvor dargelegt (s. 3.1.1), eignen sich die Zelllinie HT29 und die Langzeit-Kulturen primärer Zellen wegen der raschen Kultivierbarkeit großer Zellzahlen gut für methodische Etablierungen.

3.2.1.1 Auswahl der Messmethoden

Zunächst wurden die optimalen Bedingungen verschiedener Messmethoden zur Analyse folgender Parameter ermittelt: Vitalität, Apoptose, Proliferationsrate und Signaltransduktionseffekte (Expressions- und Phosphorylierungslevel von Signalwegproteinen). Die Messung von Signaltransduktionseffekten, die zu einem großen Teil aus Phosphorylierungskaskaden bestehen und den Zellzyklus, die Proliferation, das Überleben und die Apoptose steuern, sollte grundsätzlich zu einer Aufklärung der Wirkungswege von Medikamenten beitragen.

Die Methoden wurden jeweils auf Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit getestet und so angepasst, dass Messungen an sehr geringen Zell- und Gewebeschnittzahlen möglich waren. Im Folgenden sind die mit der Zelllinie HT29 erhaltenen Ergebnisse der angepassten Bedingungen beispielhaft aufgeführt, stellvertretend für die Anwendungen an primären Zellen in Kurzzeit-Kultur und Gewebeschnitten.

Vitalitätsanalyse

Zur Bestimmung der Vitalität von Zellen und Gewebeschnitten wurde als Indiz der ATP-Level mit dem „ATPlite™ Luminescence Kit“ (PerkinElmer, s. 2.3.4.3) gemessen, welches schon zuvor für die Etablierung der Kulturbedingungen beider *In vitro*-Systeme verwendet wurde (s. 3.1.2). Die Zuverlässigkeit sowie die sehr sensitiven und stabilen Eigenschaften, die zur Auswahl dieser Methode geführt haben, sind in Abb. 22 dargestellt. Der Vergleich von unterschiedlich umfangreichen Mehrfachbestimmungen und Wiederholungsversuchen haben gezeigt, dass mindestens drei Wells notwendig waren, um in allen *In vitro*-Kultursystemen reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten.

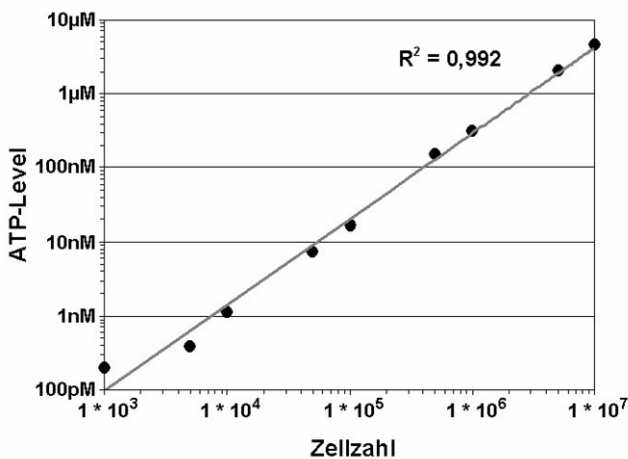


Abb. 22: Empfindlichkeit der ATP-Chemilumineszenzmessung

Aufgetragen ist logarithmisch die Konzentrationsabhängigkeit des anhand einer Standardreihe bestimmten ATP-Levels mit der gemessenen Zellzahl der HT29. Die Trendlinie zeigt mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,992$ die hohe Korrelation der Messungen. In nur 1000 Zellen kann der ATP-Level von minimal 100 pM zuverlässig bestimmt werden.

ATP konnte mit einer Empfindlichkeit von 1000 Zellen und einer Konzentration von 100 pM mit einer 99%igen positiven Korrelation beider Parameter zuverlässig bestimmt werden. Für einen Medikamententest genügten demnach schon wenige Zellen pro Probe und Zeitpunkt, um ATP als Vitalitäts-Indiz zu bestimmen.

Analyse der Proliferationsrate

Die Proliferationsraten von Zellkulturen wurden durch die Zellzahl bestimmt und aus während der DNA-Synthese eingebautem BrdU abgeleitet – abhängig von der BrdU-Konzentration und Inkubationsdauer, die nach Vortests an HT29 und primären Zellen in Kurzzeit- und Langzeit-Kultur auf 20 μM BrdU und 24h festgelegt wurde (s. 2.3.2.8). Um eine Auswertung von sehr geringen Zellzahlen in 384Well-Platten zu ermöglichen, wurde die Zahl der proliferierenden Zellen direkt durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Die Immunfluoreszenzmethoden wurden zunächst etabliert und alle Schritte und Kontrollen so optimiert, dass erstens intensive Färbungen mit möglichst geringem unspezifischem Hintergrund erreicht wurden (s. 2.3.4.10). Zweitens wurden die Mikroskopie und Fotografie sowie die Auszählung der Zellen

mittels der Software „AxioVision 6.0“ und des „Commander-Modul“ (Zeiss) etabliert. In den Graustufenbildern des blauen Farbkanals (Hoechst 33342-Kernfärbung) wurden durch Setzen von Schwellenwerten (Grautöne) die einzelnen Zellkerne mittels einer Maske (gelb) erkannt und quantifiziert (s. Abb. 23).

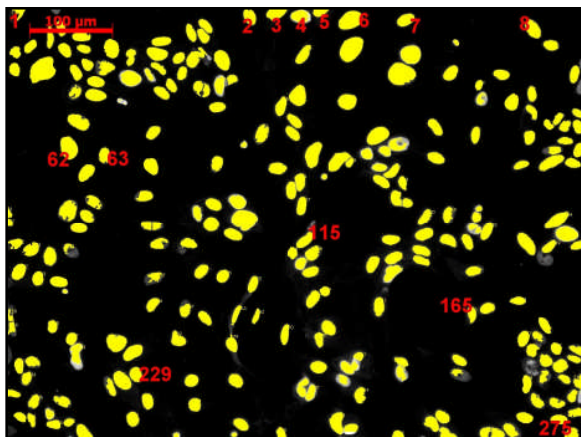


Abb. 23: Maske zur Bestimmung der zellulären Proliferationsrate durch Immunfluoreszenzfärbung

Gezeigt ist das Graustufenbild einer Hoechst 33342-Kernfärbung, 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab. Durch manuelles Setzen von Schwellenwerten (Graustufen) wurde eine Maske (gelb) zur Zählung der einzelnen Zellkerne erstellt. Die Zellkerne wurden nummeriert. Zur besseren Lesbarkeit sind einige Nummern beispielhaft vergrößert (rot).

Um übereinander und dicht aneinander liegende Zellkerne eindeutig identifizieren zu können, was in Kurzzeit-kultivierten primären Zellen häufig notwendig ist (s. 3.1.2.1), wurden für jede Zellkultur aufgrund umfangreicher Erfahrungswerte verschiedene Schwellenwerte (Grautöne) manuell eingestellt. Von einem Probenansatz wurden fünf oder mehr zufällig verteilt aufgenommene Fotos herangezogen, um repräsentative Auswertungen der Zellzahlen zu ermöglichen. Die Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen (grün) und der durch die Hoechst-Kernfärbung identifizierten Gesamtzahl der Zellen (blau) wurde anhand der entsprechenden Graustufenbilder einer Aufnahme durchgeführt. Zur Bestimmung der Proliferation wurde das prozentuale Verhältnis zwischen BrdU-positiven Zellen und der Gesamtzahl der Zellen berechnet.

Proliferierende Zellen in Gewebeschnitten konnten, wie im Abschnitt 3.1.2.2 gezeigt, durch immunhistologische Färbung des Proteins Ki67 sichtbar gemacht werden, das nur im Zellkern von sich in Teilung befindlichen Zellen exprimiert wird.

Bestimmung der Apoptoserate

Zur Detektion der Apoptose wurden die Indikatormoleküle Caspase 3 und Caspase 7 gewählt. Deren Aktivierung (Spaltung) wurde mit dem „Caspase-Glo 3/7-Kit“ (Promega) bestimmt (s. 2.3.4.4). Sensitivität und Spezifität der Methode wurden durch die Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen überprüft. Als Positivkontrolle diente Staurosporin, das ein bekannter Apoptose-Induktor ist ^[116]. Hierzu

wurden für die verschiedenen Zellkulturen in mehreren Zeit- und Konzentrationsreihen die optimalen Bedingungen ermittelt. Als Negativkontrolle diente DMSO. Abb. 24 zeigt die Negativ- (DMSO) und Positiv-Kontrollen der Zelllinie HT29 (15h 0,25µM Staurosporin).

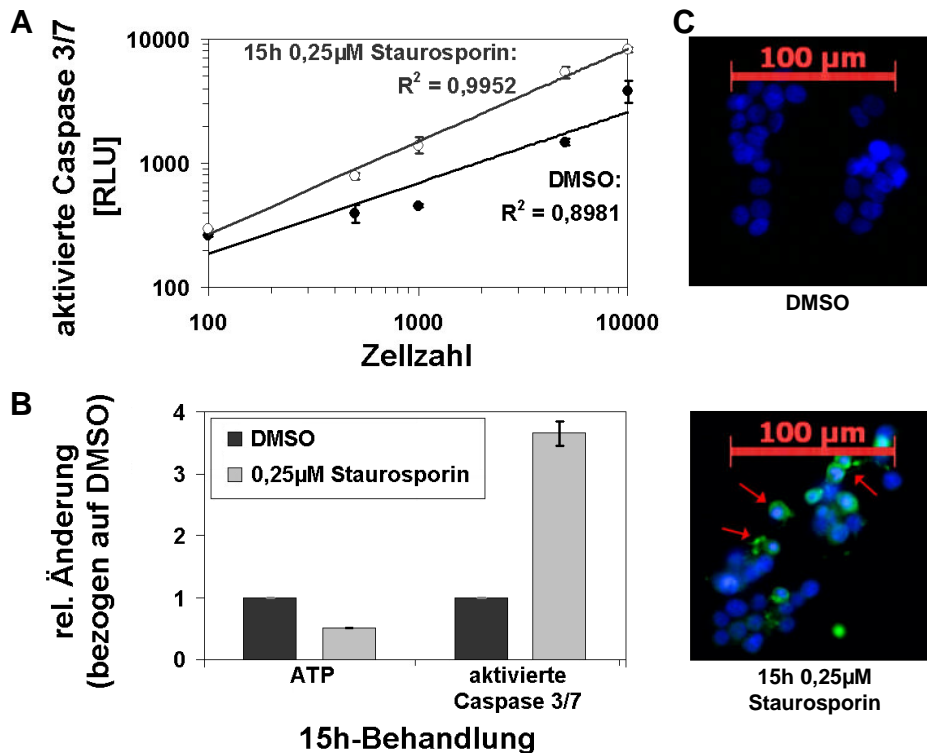


Abb. 24: Empfindlichkeit und Spezifität der Caspase 3/7-Chemilumineszenzmessung

Gezeigt sind die Negativ- (DMSO) und Positivkontrolle (15h mit 0,25µM Staurosporin) für die Apoptose-Induktion in der Zelllinie HT29. Bestimmt wurden (A) die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit bis zu 100 gemessenen Zellen und die Zuverlässigkeit durch die Konzentrationsabhängigkeit der Signale. Die Korrelation zwischen ATP-Level (ATP-Chemilumineszenzassay, links) und der Menge an aktivierter Caspase 3/7 (rechts) ist in B dargestellt. Zur Kontrolle der Spezifität ist eine Immunfluoreszenzfärbung (C) der aktiven Caspase 3 (grün) und der Hoechst 33342-gefärbten Zellkerne (blau) gezeigt, 200-facher Vergrößerung mit 100µm-Maßstab. Sie zeigt apoptotische Zellen (rote Pfeile) inkl. apoptotischen Körperchen.

Eine Messung der Caspase 3/7-Aktivierung konnte bereits an nur 100 Zellen im 384Well-Format erfolgen (Abb. 24 A). Zur Reproduzierbarkeit, zu deren Bestimmung die sehr geringen Standardabweichungen sowie Wiederholungsversuche herangezogen wurden, mussten Dreifachbestimmungen vermessen werden. Parallel zur Aktivierung der Caspasen 3/7 als Apoptose-Signal wurde ein korrespondierender Verlust an ATP als Zeichen abnehmender Vitalität detektiert (ATP-Chemilumineszenzbestimmung, links) (Abb. 24 B). Die Immunfluoreszenzkontrollen bestätigten, dass es sich durch Staurosporinbehandlung um eine Apoptose-Induktion handelte (Abb. 24 C).

Als Alternative zur Apoptose-Bestimmung mittels Chemilumineszenzmethode konnte der Assay „MS6000 Apoptosis Whole Cell Lysate Kit“ im multi-funktionellen ELISA (s. 2.3.4.8) verwendet werden, der ebenso an allen *In vitro*-Kulturen getestet wurde (s.u.). Darin wurden die Apoptose-relevanten Proteine gespaltenes PARP, aktivierte Caspase 3 sowie die p53-Expression und -Phosphorylierung gemessen.

Messungen von Signaltransduktionseffekten

Zur Bestimmung von Signaltransduktionseffekten wurde ein multi-funktioneller ELISA (MSD; Gaithersburg, MA, USA) verwendet (s. 2.3.4.8). Zur Bestimmung der Empfindlichkeit dieser Methode und des linearen Messbereichs wurden zunächst Vergleichsversuche mit dem 96Well-Assay „MS6000 Phospho (Y1173) / Total EGFR Whole Cell Lysate Kit“ durchgeführt, der hier exemplarisch für alle anderen verwendeten Assay-Kits gezeigt wird (s. 2.1.9). Um den Expressions- und Phosphorylierungslevel des EGFR und die Sensitivität des Assays feststellen zu können, wurden Negativ- und Positivkontrollen einer EGFR-Phosphorylierung verwendet. Hierfür wurden eigene Kontrollen mit den HT29 generiert – unbehandelte und für 10min mit 200ng/ml EGF stimulierte Zellen (zusätzlich durchgeführte Western Blot-Analysen) – und diese mit Originalkontrollen des Herstellers (MSD-Kontrollen) verglichen. Es wurden in wiederholten Versuchen die eingesetzten Proteinkonzentrationen variiert, um den linearen Messbereich einzugrenzen. Die Abb. 25 A zeigt eine Messung des Phosphorylierungslevels von EGFR. Bei der Konzentration von 3-5µg Proteinlysat fand die Messung im linearen Bereich sowohl in den eigenen als auch in den MSD-Kontrollen statt (Abb. 25 B). Aufgrund dieser Daten wurde die zu messenden Proteinkonzentrationen auf 5µg pro 96Well festgelegt. Doppelbestimmungen reichten hierbei für die Reproduzierbarkeit aus, da die durchschnittliche Abweichung der Proben deutlich unter 5% lag (s. Standardabweichungen in Abb. 25 A und B). Die EGFR-Kontrolllysate wurden zur methodischen Gegenkontrolle im Western Blot überprüft und ihre Funktion bestätigt (Abb. 25 C).

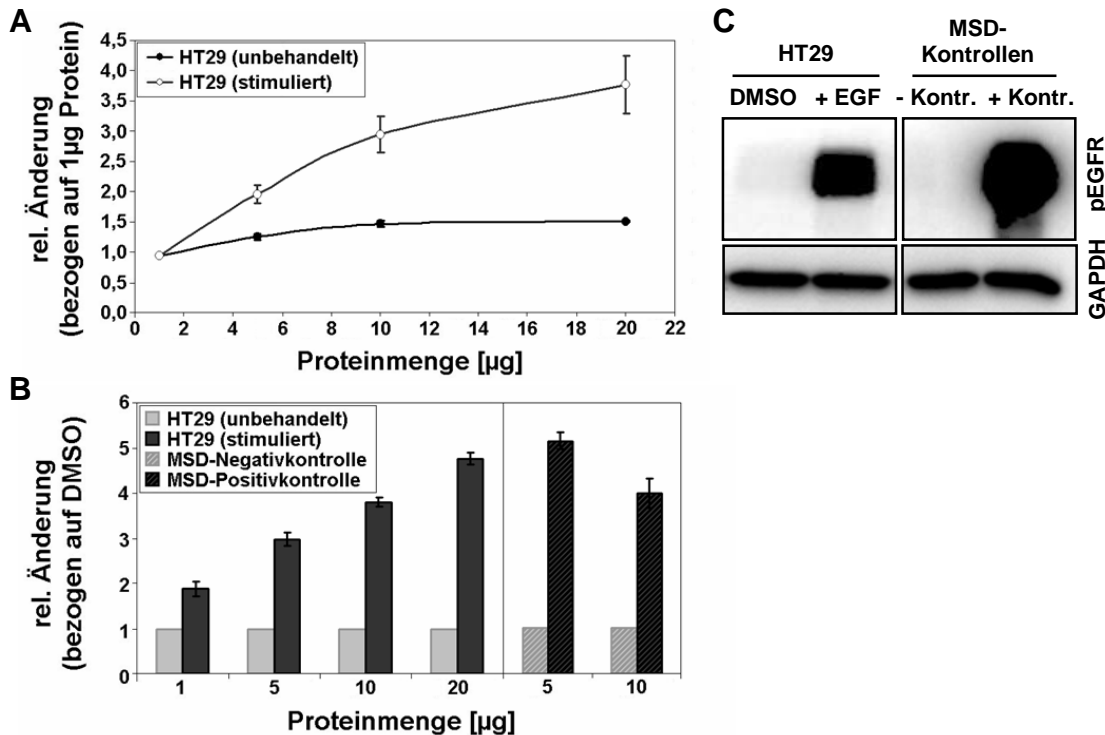


Abb. 25: Empfindlichkeit und Spezifität des EGFR-Assays im multi-funktionellen ELISA

Verwendet wurden HT29-Negativ- (unbehandelt) und HT29-Positivkontrollen (10min mit 200ng/ml EGF behandelt) sowie Kontrollen des Assay-Herstellers (MSD) zur EGFR-Phosphorylierung. Bestimmt wurden **(A)** der lineare Messbereich aufgrund der Proteinkonzentrationen pro 96Well für die HT29-Kontrollen. **B** zeigt die Verhältnissberechnung der HT29-Positiv- gegen die HT29-Negativkontrolle sowie einen entsprechenden Vergleich mit den MSD-Kontrollen. **A** und **B** zeigen jeweils geringe Standardabweichungen als Indiz der Reproduzierbarkeit. Im Western Blot **(C)** sind in den Positivkontrollen („+ EGF“ & „+ Kontr.“) spezifische Banden des pEGFR bei gleicher Beladung abgebildet (GAPDH-Ladungskontrollen).

Andere Assay-Kits und Plattenformate (384Well-Platten) sowie die jeweilige Übertragbarkeit auf Kurzzeit-Kulturen wurde auf vergleichbare Weise überprüft. Die verschiedenen Analysen legten die zu messende Proteinkonzentration für alle *In vitro*-Kulturen und gemessenen Assay-Kits auf 3-5 μg pro 96Well und 1 μg pro 384Well fest. Für die *In vitro*-Kulturen galt wiederum, dass Zellen aus mindestens drei 96Wells einer Kulturplatte bzw. mindestens drei 400 μm -dicke Gewebeschnitte zu einem Lysat vereint werden mussten, um Schwankungen und Heterogenitätseffekte innerhalb der Kulturen, Schnitte und Behandlungen möglichst gering zu halten. Somit ist es durch dieses ELISA-System möglich, mit äußerst geringen Zellzahlen bzw. Gewebemengen parallel mindestens 12-24 verschiedene Protein- und Phosphorylierungslevel zuverlässig zu bestimmen.

3.2.1.2 Auswahl der Medikamente und Verknüpfung der Messmethoden

Zunächst wurden für die endgültige Etablierung und Evaluierung der Plattform Medikamente und Behandlungsvarianten ausgewählt sowie die geeignete Dosierung

und Messzeiträume identifiziert. Die zuvor getesteten Messmethoden wurden anschließend zur Medikamententestplattform verknüpft. Die Assays der Plattform wurden hierbei auf parallele Durchführbarkeit an geringen Zell- oder Gewebeschnittzahlen skaliert.

Auswahl geeigneter Medikamente, Dosierungen und Messzeitpunkte

Für die Etablierung und Evaluierung der Medikamententestplattform wurden folgende klinisch relevanten Medikamente ausgewählt:

Zytostatika:

- 5-Fluorouracil (5-FU)
- Leucovorin (L)
- Oxaliplatin (Oxa)
- Gemcitabin (Gem)

Kombinationen:

- | | | |
|----------|-----|------------------------------|
| - 5-FU/L | aus | 5-FU & Leucovorin |
| - FOLFOX | aus | 5-FU/L & Oxa |
| - IFOX | aus | Iressa [®] & FOLFOX |
| - GOLF | aus | Gem & FOLFOX |

Inhibitor:

- Gefitinib (Iressa[®])

5-FU, Leucovorin und Oxaliplatin gehören einzeln bzw. als Kombinationstherapie zu den Standardtherapeutika in der kolorektalen Tumorthherapie^[13, 117]. Gefitinib (Iressa[®]) – in der Therapie von kolorektalen Karzinomen getestet – wurde stellvertretend für die Gruppe der therapeutischen Kinase-Inhibitoren gewählt^[16]. Gemcitabin ist ein in der Therapie von Pankreaskarzinomen verwendetes Zytostatikum, das aber in ersten präklinischen Studien an kolorektalen Zellkulturen getestet wird^[118].

Es wurde die Dosis ermittelt, mit der eine Wirkung hinsichtlich Vitalität, Proliferation, Apoptose und Signaltransduktionseffekten gemessen werden konnte.

Zunächst wurden die Effekte auf die Vitalität, das Wachstum der Zellen bzw. ihr Absterben in der Zelllinie HT29 analysiert – in Anlehnung an die Publikationen von Caraglia et al.^[118]. Die Medikamenteneffekte wurden ebenfalls an Langzeit-Kulturen primärer Zellen sowie stichprobenhaft an unpassagierten primären Zellen kontrolliert, um die Übertragbarkeit auf diese Kultursysteme zu bestätigen. Die Ergebnisse der Zelllinie HT29 sind im Folgenden repräsentativ – gültig für alle *In vitro*-Kultursysteme – dargestellt.

Es wurden nach Medikamentenzugabe Zeitreihen bis 168h durchgeführt, alle 24h der ATP-Level bestimmt und die Messwerte auf den Zugabezeitpunkt bezogen. Die Analysen wurden an den Zytostatika 5-FU und Oxaliplatin, die als Beispiel aufgeführt sind, sowie Iressa[®] und Leucovorin durchgeführt. Gemcitabin wurde zu einem

späteren Zeitpunkt eingeführt und nicht variiert, sondern die Konzentration von 50µg/ml aus der Arbeit von Caraglia et al. [118] übernommen.

In der linken Graphik (Abb. 26 A) sind die Vitalitätsergebnisse nach 5-FU-Behandlung dargestellt, in der rechten (Abb. 26 B) die nach Inkubation mit Oxaliplatin. Durch Zugabe von DMSO als Lösungsmittelkontrolle zeigten die HT29 keinen eindeutigen Unterschied zu unbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis konnte in primären Zellen in Langzeit- sowie Kurzzeit-Kultur bestätigt werden, weshalb im Folgenden nur die DMSO-Kontrollen aufgeführt und verwendet wurden.

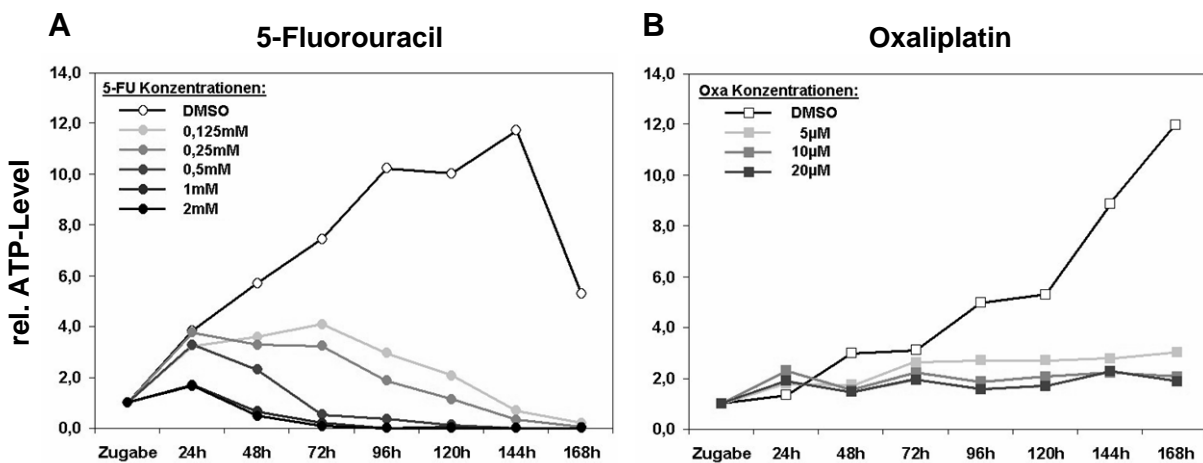


Abb. 26: ATP-Bestimmung zur Feststellung geeigneter Medikamentenkonzentrationen

Gezeigt sind Vergleiche verschiedener Konzentrationen von 5-FU (A) und Oxaliplatin (B) und deren Einfluss auf die ATP-Level der Zelllinie HT29, die in Zeitreihen bis 168h kultiviert wurden. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte HT29 verwendet und sämtliche Werte auf den ATP-Level zum Zugabezeitpunkt (Referenz) abgebildet. A 5-FU weist bei verschiedenen Konzentrationen jeweils einen unterschiedlich schnellen Abfall des ATP-Level auf. B Oxaliplatin zeigt einen stagnierenden ATP-Level, jedoch ohne eindeutige Konzentrationsabhängigkeit.

Bei 5-FU-Behandlung kommt es zu einem Konzentrations-abhängigen Abfall der ATP-Level im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei 0,5mM verursachte 5-FU eine mikroskopisch sichtbare schnelle Wachstumshemmung, ohne die Zellen durch Toxizität grundlegend zu schädigen. Bei höheren Konzentrationen konnten hingegen toxische Effekte mikroskopisch anhand von deutlichen morphologischen Veränderungen bestätigt werden. Daher wurde die Konzentration von 0,5mM für die nachfolgenden Analysen gewählt.

Die verschiedenen Oxaliplatin-Konzentrationen erzielten alle eine annähernde Stagnation des ATP-Level und eine Inhibition des Zellwachstums (mikroskopische Kontrolle), wobei diese keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit aufwies. Die Kombination von 20µM Oxaliplatin mit 0,5mM 5-FU und 100µM Leucovorin (= FOLFOX) erzeugte die stärksten Synergieeffekte. Die Synergie wurde aufgrund von deutlichen additiven Effekten in hier nicht abgebildeten Kontroll- und

Vergleichsanalysen sämtlicher Medikamente und Kombinationen beobachtet. Insgesamt wurden dadurch die folgenden verwendeten Dosierungen ermittelt, die bei Einzel- und Kombinationsbehandlung eingesetzt wurden: 20 μ M Oxaliplatin, 0,5mM 5-FU und 100 μ M Leucovorin, 2 μ M Gefitinib (Iressa[®]) und 50 μ g/ml Gemcitabin.

Zur späteren Anwendung an Kurzzeit-Kulturen, die mindestens 96h stabil kultivierbar waren (s. 3.1.2), sollte die Dosierung messbare Effekte innerhalb dieser Zeit ermöglichen. Die obigen ATP-Bestimmungen bestätigten solche bis 72h. Weitere Analysen zu Apoptose-Induktion sowie Expressions- und Phosphorylierungsänderungen von Signaltransduktionsproteinen in Western Blots zeigten messbare Effekte innerhalb einer 24h- bis 72h-Behandlung. Hierfür wurden die Aktivierung der Caspase 3 als Indiz der eintretenden Apoptose, die Phosphorylierung (Aktivierung) der Kinase ERK 1/2, der Level der Kinase Akt sowie die Menge des Hitzeschockproteins Hsp90 bestimmt, das u.a. mit dem Akt-Signalweg verknüpft ist und verschiedene Signaltransduktionskinasen und EGFR stabilisiert.

Nach 48h-Behandlung mit FOLFOX, Gemcitabin und GOLF im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte der Western Blot (Abb. 27) bei FOLFOX keine Spaltprodukte der aktivierten Caspase 3. Nach Gemcitabin- und noch deutlicher nach GOLF-Behandlung sind jedoch die Spaltprodukte bei 19 und 17kDa deutlich zu erkennen. Gleichzeitig wurde eine ähnliche Zunahme der ERK 1/2-Phosphorylierung (44 und 42kDa) beobachtet. Der Level von Akt (60kDa) wies nur durch GOLF-Behandlung eine Veränderung auf. Nach Abgleich mit den GAPDH-Ladungskontrollen ist ein Expressionsrückgang zu erkennen. Das Protein Hsp90 blieb jedoch, wie anhand der unveränderten Bandenstärke im Vergleich mit der Ladungskontrolle zu sehen, unbeeinflusst.

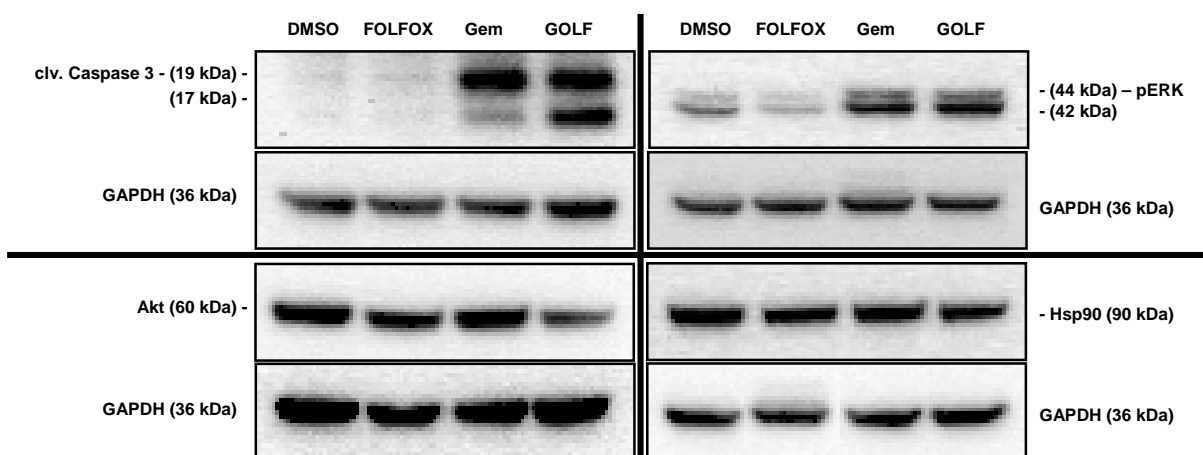


Abb. 27: Western Blot-Analysen nach 48h-Behandlung der Zelllinie HT29

Abgebildet sind Western Blot-Analysen nach 48h-Behandlung mit FOLFOX, Gemcitabin und GOLF. DMSO diente als Behandlungskontrolle. Detektiert wurden die gespaltene / aktivierte („cleaved“ = clv.) Caspase 3, phosphoryliertes ERK 1/2 (pERK), Akt und Hsp90 sowie GAPDH als Ladungskontrolle.

Die gewählten Dosierungen der einzelnen Medikamente und Kombinationen – wie exemplarisch für FOLFOX, Gemcitabin und GOLF gezeigt – ermöglichten demnach die Messung von Effekten innerhalb von 72h und beinhalteten Reaktionen hinsichtlich Vitalität, Apoptose sowie Expressions- und Phosphorylierungslevel von Signaltransduktionsproteinen. Eine Messung der verschiedenen Effekten wurde bei Verwendung dieser Dosierungen und Messzeitpunkte durch entsprechende Vorversuche in Langzeit-Kulturen primärer Zellen bestätigt.

Verknüpfung der Messmethoden

Die Abb. 28 zeigt exemplarisch das Schema der Medikamententestplattform für Kurzzeit-kultivierte primäre Zellen nach Verknüpfung der Messmethoden, die jedoch zunächst an der Zelllinie HT29 und Langzeit-kultivierten Zellkulturen überprüft wurde.

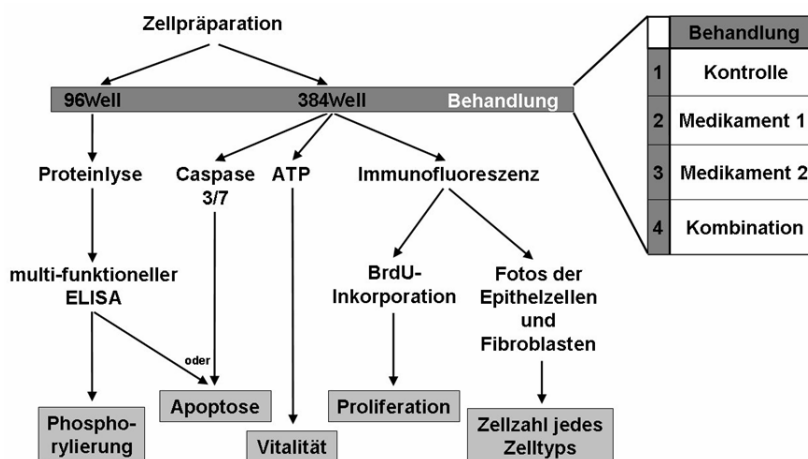


Abb. 28: Schema der Medikamententestplattform am Beispiel von primären Zellkulturen

Gezeigt ist die schematische Reihenfolge von der Zellpräparation primärer Zellen über die Kultivierung bei verschiedenen Behandlungen. Anschließend erfolgt die Integration der Assay-Methoden zur Bestimmung der verschiedenen zellulären Parameter (grau umrahmt).

Die Zellen wurden für jeden Messzeitpunkt (z.B. Behandlung über 24h, 48h und 72h) auf separaten Platten ausgesät. Unter Berücksichtigung mehrerer Behandlungsvarianten (z.B. Kontrolle, Medikament 1, Medikament 2 und Kombination), ausreichender Mehrfachbestimmungen, den benötigten Messmethoden und methodischen Kontrollen erfolgte dies zum einen in 384Well-Platten (Abb. 29, oben) und deckte folgende Messungen ab: ATP- und Caspase 3/7-Messung, BrdU-Inkorporation und Identifizierung von Epithelzell-Fibroblasten-Verhältnis durch Immunfluoreszenz. In 96Well-Platten (Abb. 29, unten) wurden die Zellen ausgesät und behandelt, die zur Herstellung von Proteinlysaten für den multi-funktionalen ELISA benötigt wurden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
384Well-Platte	A			Vitalität (ATP-Lumineszenz)													Proliferation (BrdU-Immunfluoreszenz)									
	B																									
	C																					BrdU-Kontr.				
	D			1	2	3	4											1	2	3	4					
	E																									
	F																									
	G																						2.AK-Kontr.			
	H																									
	I																									
	J																									
	K			Apoptose (Caspase 3/7-Lumineszenz)																						
	L																									
	M			1	2	3	4																			
	N																									
	O																									
	P																									

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
96Well-Platte	A	Proteinlysate für Phosphorylierungsstatus (jeweils 3-8 Wells zu vereinen)												
	B													
	C													
	D					1	2	3	4					
	E													
	F													
	G													
	H													

1: Kontrolle
2: Medikament 1
3: Medikament 2
4: Kombination

Abb. 29: Aussaat- und Pipettierschema am Beispiel von Zellkulturen

Dargestellt ist das Beispiel eines Pipettierschemas für Zellkulturen unter Berücksichtigung aller Messmethoden, Mehrfachbestimmungen sowie notwendigen Behandlungs- und methodischen Kontrollen. Diese Plattenbelegung wird zur Messung eines jeden Zeitpunktes benötigt.

Am folgenden Tag wurden mikroskopisch Güte und Verwendbarkeit der Kulturen eingeschätzt (s. 3.1.2). Nur wenn nach spätestens drei Tagen eine Konfluenz von mindestens 30% erreicht war, wurden die Zellen behandelt.

Im Hinblick auf die eigentliche Zielsetzung, eine Medikamententestplattform mit Anwendbarkeit an Kurzzeit-Kulturen primärer Zellen und Gewebeschnitte zu entwickeln, werden die benötigten Zell- und Schnitzzahlen beider Kultursysteme sowie weitere Parameter zur Durchführung im Abschnitt der Evaluierung näher erläutert (s. 3.2.2).

3.2.1.3 Durchführung der Medikamententestplattform zur Etablierung

Im Folgenden wurde die Durchführbarkeit der Medikamententestplattform zunächst an der Zelllinie HT29 und an Langzeit-Kulturen primärer Zellen (A413, A806 und B429; mit „früher“ Passagennummer 9) kontrolliert, bevor sie zur Evaluierung an Kurzzeit-kultivierten primären Zellen und Gewebeschnitten eingesetzt wurde. Gemessen wurden die Zeitpunkte 24h, 48h und 72h. Die Überprüfung sollte einen

ersten Überblick über die Wirkung der verschiedenen Medikamente und Kombinationen liefern und somit eine weitere Behandlungsauswahl zur Evaluation ermöglichen.

Die Ergebnisse zu Vitalität und Apoptose sind hier repräsentativ für die Langzeitkultur A413 gezeigt. In Abb. 30 sind Beispielmessungen zur Vitalität (ATP) und Apoptose (aktivierte Caspase 3/7) dargestellt.

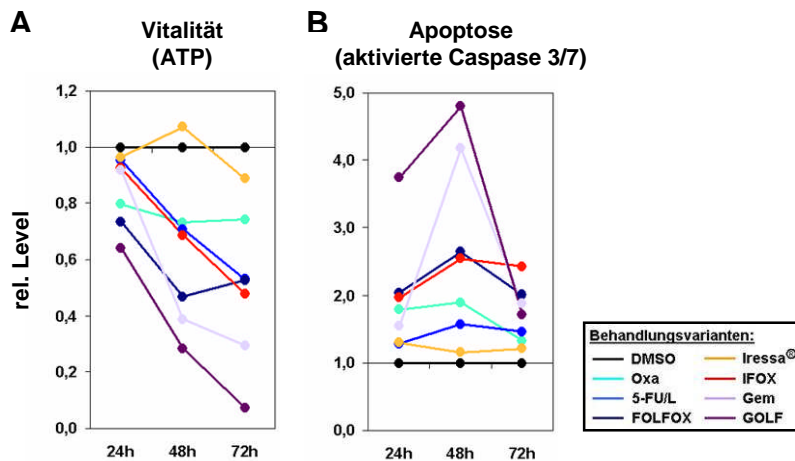


Abb. 30: Analyse der Vitalität sowie Apoptose in Langzeit-kultivierten A413

Die Vitalität wurde durch ATP-Bestimmung (A), die Apoptose durch Messung des Levels an aktivierter Caspase 3/7 (B) bestimmt. Für die acht Behandlungsvarianten sind die Zeitverläufe von 24h, 48h und 72h abgebildet, wobei DMSO jeweils als Referenz (= 1) verwendet wurde.

Im Vergleich mit den DMSO-Kontrollen, die als Referenz (= 1,0) gesetzt wurden (schwarz), zeigte FOLFOX (dunkelblau) im Vergleich mit seinen Einzelkomponenten 5-FU und Oxaliplatin einen Synergieeffekt, der durch den im Vergleich zu den Einzelkomponenten 5-FU/L und Oxaliplatin schnelleren Abfall des ATP-Levels unter das 0,5-fache und den über 2-fachen Anstieg der aktivierten Caspase 3/7 angezeigt wurde. Die stärksten und am schnellsten auftretenden Effekte, ebenfalls synergistisch im Vergleich mit den Einzelkomponenten, zeigte die GOLF-Kombination. Gemessen wurde ein rascher Abfall des ATP-Levels bis 72h auf nur das 0,1-fache der DMSO-Kontrollen sowie eine knapp 5-fache Aktivierung der Caspase 3/7 bis 48h, die anschließend wieder unter das 2-fache abfiel. Der Inhibitor Iressa® (gelb) bewirkte im Gegensatz zu allen anderen Medikamenten und Kombinationen keine deutlich von den DMSO-Kontrollen abweichenden Veränderungen.

Die Medikamenteneffekte auf die Proliferation sind ebenfalls in A413 repräsentativ dargestellt. Nach 48h-Behandlung wiesen die DMSO-Kontrollzellen über 85% proliferierende Zellen auf, durch Behandlung mit Iressa® wurde dies nicht beeinflusst

(Abb. 31). Alle anderen Behandlungen verursachten einen deutlichen Abfall der Proliferation, Anteile proliferierender Zellen von 45% bis 0%. Gleichzeitig waren weniger Zellen, eine geringere Konfluenz der Kulturen, erkennbar. Korrespondierend mit den vorherigen Daten zeigte die FOLFOX-Kombination einen deutlichen Proliferationsabfall auf 40%. In diesem Fall jedoch inhibierte die Einzelbehandlung Oxaliplatin die Proliferation der Zellen stärker (10%iger Anteil) als die Kombination. Nach Behandlung mit GOLF hingegen war keinerlei Proliferation (Proliferationsrate 0%) feststellbar. Ein Vergleich mit den anderen Zeitpunkten und der jeweiligen Gesamtzahl der Zellen zeigte, dass schon nach 24h keine proliferierenden Zellen nachweisbar waren und die Zellen abstarben.

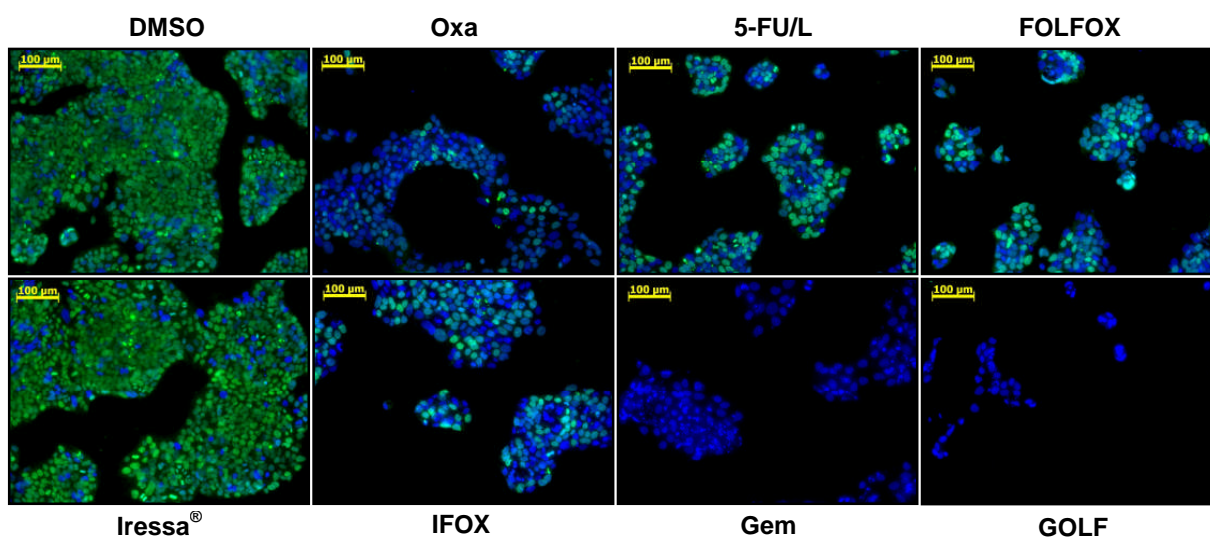


Abb. 31: Bestimmung der Proliferationsrate in Langzeit-kultivierten A413

Gezeigt sind repräsentative Beispielbilder der 48h behandelten A413 nach Immunfluoreszenzfärbung des inkorporierten BrdU, 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab. Die BrdU-positiven Zellen (grün) und die Gesamtzahl der Zellen (Hoechst 33342-Kernfärbung, blau) wurden mittels einer Maske ermittelt und die Proliferationsverhältnisse der verschiedenen Behandlungsvarianten berechnet. DMSO und Iressa® weisen ein hohes Verhältnis proliferierender Zellen auf, über 85%. 5-FU/L, FOLFOX, IFOX und Oxa zeigen zwischen 45% und 10% proliferierende Zellen, während Gem und GOLF keine Proliferation anzeigen.

Die Messungen zur Vitalität, Apoptose und Proliferation in den anderen Langzeit-kultivierten primären Zellen und den HT29 zeigten Medikamenteneffekte, die unterschiedlich stark waren. Gleichzeitig wiesen die verschiedenen Medikamente im Vergleich miteinander dieselben Tendenzen auf. Korrespondierend mit den Daten der A413 zeigte immer GOLF die stärksten und schnellsten Effekte, FOLFOX mäßig ausgeprägte und Iressa® in keinem der Fälle eine erkennbare Wirkung. Die gezeigten Ergebnisse der A413 galten daher als repräsentativ.

Um die Möglichkeit, mit dieser Plattform Reaktionsunterschiede zwischen den verwendeten Zellkulturen festzustellen, und die Art der Unterschiede zu zeigen, sind die

Ergebnisse des multi-funktionellen ELISA zu Expressions- und Phosphorylierungsleveln der Signaltransduktionskinasen Akt und GSK-3 β gezeigt. Die Abb. 32 zeigt den Vergleich der Zellkulturen und der Behandlungsvarianten über die drei Zeitpunkte.

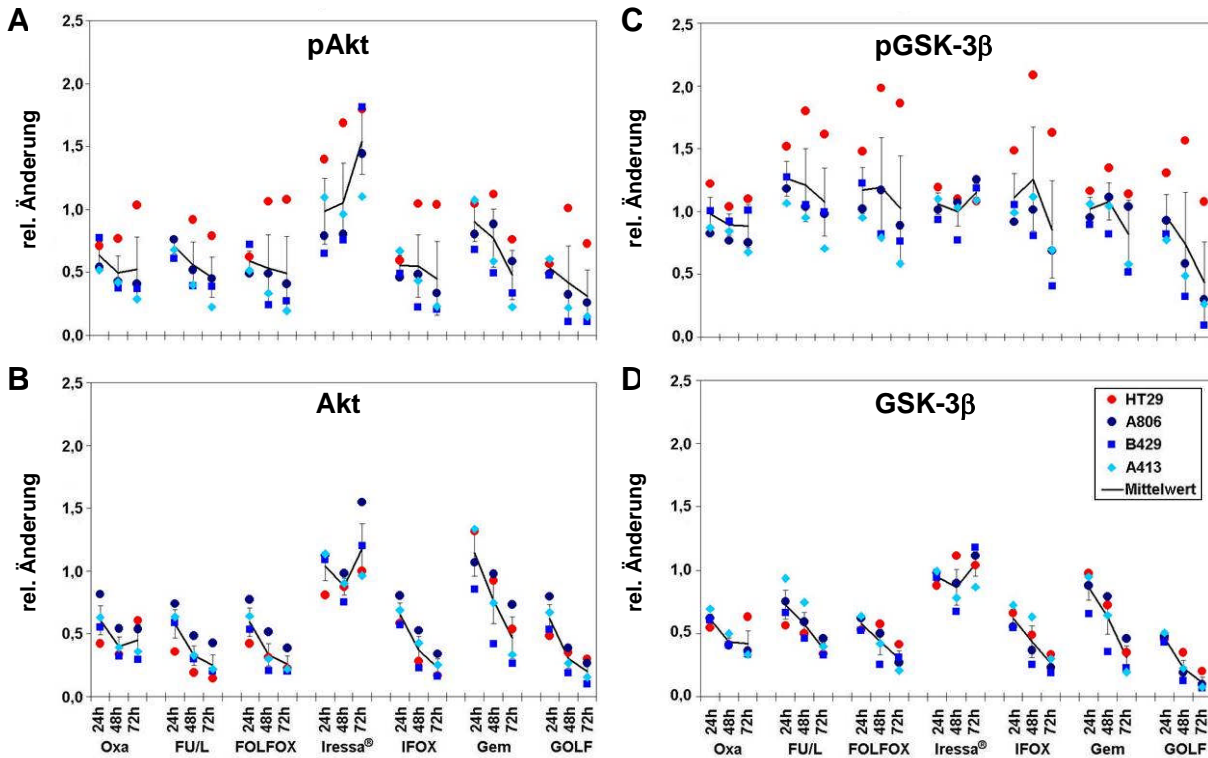


Abb. 32: Expressions- und Phosphorylierungslevel von Signaltransduktionsproteinen

Aufgetragen sind die Ergebnisse der Signaltransduktionskinasen Akt und GSK-3 β (s. 2.3.4.8). **A** pAkt, **B** Akt, **C** pGSK-3 β und **D** GSK-3 β . Die Daten der behandelten Zellkulturen HT29, A413, A806 und B429 wurden auf die jeweiligen DMSO-Kontrollen bezogen (= 1) und der Zeitverlauf dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der vier Zellkulturen sind ebenfalls aufgetragen.

In allen vier Diagrammen wurden die jeweiligen DMSO-Kontrollen der Zellkulturen als Referenzen verwendet und die Messwerte der anderen Behandlungen als relative Änderungen sowie der Mittelwert der vier verschiedenen Zellkulturen aufgetragen. Wie schon in den Analysen zuvor, erzeugte die Behandlung mit Iressa[®] kaum Veränderungen. Der pAkt-Level (s. Abb. 32 A) stieg mit der Zeit in den HT29 und den B429 auf knapp das 2-fache der DMSO-Kontrollzellen. Die Werte von pGSK-3 β sowie der Expressionslevel von Akt und GSK-3 β wichen hingegen nicht von denen der DMSO-Kontrollen ab.

Alle anderen Behandlungen führten bei den Langzeit-kultivierten primären Zellen zu einem erkennbaren Abfall unter das 0,5-fache an Akt und pAkt, wobei GOLF nur einen geringfügig stärkeren Effekt als FOLFOX aufwies. Die Level von GSK-3 β und

pGSK-3 β zeigten als Folge der GOLF-Behandlung hingegen einen deutlich stärkeren Abfall ($\leq 0,1$ -fach) als FOLFOX ($\geq 0,3$ -fach).

Wie in den Genexpressionsanalysen (s. 3.1.3.1) wichen die HT29 in ihrer Reaktion deutlich von primären Zellkulturen ab. Die rot hervorgehobenen Messwerte der HT29 verhielten sich kaum oder nur geringfügig anders als ihre mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Nach Oxaliplatin-, FOLFOX- bzw. IFOX-Behandlung war bei pGSK-3 β hingegen, anders als bei den primären Zellen, ein deutlicher Anstieg auf über das 2-fache zu erkennen. Der steigernde Iressa[®]-Effekt auf den Level von pAkt war ebenfalls in den HT29 am stärksten ausgeprägt.

Zusammenfassend zeigten diese Analysen zur Entwicklung der Medikamententestplattform erstens folgende Medikamentenwirkungen:

- Die FOLFOX-Behandlung wies überwiegend stärkere und synergistische Effekte im Vergleich mit den Einzelkomponenten Oxaliplatin und 5-FU/L auf.
- Iressa[®] verursachte so gut wie nie signifikante Änderungen.
- Gemcitabin erzeugte als Einzelsubstanz größere Veränderungen in Proliferation, Apoptose und verschiedenen Signaltransduktionskinasen als Oxaliplatin und 5-FU/L.
- Die GOLF-Kombination rief die schnellsten und stärksten Synergieeffekte hervor.

Zweitens unterschieden sich die Zellkulturen hinsichtlich ihrer Sensitivität auf die verschiedenen Medikamente und Kombinationen:

- Die A413 und B429 reagierten insgesamt sehr sensitiv.
- Die A806 waren geringfügig weniger empfindlich.
- Die Zelllinie HT29 zeigte die geringsten Reaktionen allen Behandlungen gegenüber und unterschied sich – wie schon die Qualitätsanalysen mit primären Zellen gezeigt haben (Microarray-Analysen, s. 3.1.1) – auch in ihren Reaktionen auf Medikamente deutlich von anderen *In vitro*-Zellkulturen.

An sehr geringen Zellzahlen konnten mehrere Parameter der Medikamentenwirkung auf zelluläre und molekulare Prozesse analysiert sowie verschiedene Medikamente, Kombinationen und der zeitliche Verlauf der Wirkungen getestet werden. Gleichzeitig konnten Unterschiede hinsichtlich Reaktionen auf Medikamente verschiedener Langzeit-Kulturen und der Zelllinie HT29 analysiert werden.

Da die Zielsetzung war, eine Medikamententestplattform mit Anwendbarkeit an Kurzzeit-Kulturen primärer Zellen und Gewebeschnitte zu entwickeln, wurde deshalb die etablierte Plattform im Folgenden an diesen beiden Kultursystemen evaluiert.

3.2.2 Evaluierung der Medikamententestplattform

Zur Evaluierung der Medikamententestplattform wurden primäre Zellen und Gewebeschnitte von jeweils fünf Patienten aufgearbeitet und in Kurzzeit-Kultur behandelt. Primäre Zellen wurden aus den Geweben der Patienten A2223, A2275, A2349, A2359 und A2395 gewonnen, Gewebeschnitte aus den Geweben der Patienten A2275, A2388, A2390, A2398 und A2403.

Aus den zuvor analysierten Medikamenten (Etablierung der Medikamententestplattform; 3.2.1) wurden folgende ausgewählt und über die Zeitpunkte 24h, 48h und 72h analysiert:

<u>Behandlung</u>	<u>Auswahlkriterium</u>
DMSO	- als Kontrolle
FOLFOX	- deutliche Synergieeffekte der Einzelsubstanzen
Iressa®	- als Repräsentant von Kinase-Inhibitoren - zuvor keine eindeutigen Effekte
GOLF	- häufig stärkere und schneller eintretende Wirkung als FOLFOX

Zunächst wurden die benötigten Zell- und Gewebeschnitzahlen ermittelt, die für eine Durchführung der Medikamententestplattform mit diesen vier Behandlungsvarianten und den drei Behandlungszeitpunkten – wie in Abb. 28 und Abb. 29 des Abschnitts 3.2.1.2 beschrieben – benötigt wurden.

Primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur mussten – wie die Optimierung in Abschnitt 3.1.2.1 gezeigt hat – in Zelldichten von 5×10^5 bis 1×10^6 pro cm^2 ausgesät werden. Dies ergab eine Aussaatdichte in 384Wells von $2-4 \times 10^4$, in 96Wells $0,8-1,6 \times 10^5$. Bei einem Aussaat- und Pipettierschema wie in Abb. 29 wurden daher für genau eine Behandlung zu einem Zeitpunkt $0,9-1,8 \times 10^6$ primäre Zellen in Kurzzeit-Kultur benötigt. Für vier Behandlungsvarianten zu jeweils drei Zeitpunkten wurden insgesamt $1-2 \times 10^7$ Zellen ausgesät. Bei der Verwendung von Zellkulturen in der Medikamententestplattform war zu beachten, dass die Messungen zum jeweiligen Zeitpunkt direkt durchgeführt werden mussten.

Gewebeschnitte wurden in 12Well-Platten kultiviert, wobei jeweils ein Schnitt pro Well in 2ml Medium kultiviert und behandelt wurde. Wie die Etablierungs- und

Optimierungsschritte des Abschnittes 3.1.2.2 gezeigt haben, mussten zum Ausgleich der Gewebe-internen Inhomogenitäten und zur Gewinnung von repräsentativen Proben für Analysen mehrere Gewebeschnitte vereint werden. Für die Vitalitäts- und Apoptose-Messung sowie für die Herstellung von Proteinlysaten zur Verwendung im multi-funktionellen ELISA wurden jeweils drei Schnitte vereint. Für immunhistologische Analysen zur Morphologie- und Proliferationsbestimmung mittels HE- und Ki67-Färbung wurden zwei Schnitte berücksichtigt. So wurden pro Behandlung acht Gewebeschnitte zu einem Zeitpunkt benötigt. Bei einer Messung von vier Behandlungsvarianten zu jeweils drei Zeitpunkten wurden insgesamt 96 Schnitte benötigt. Bei der Verwendung von Gewebeschnitten in der Medikamententestplattform bot sich der Vorteil, dass zum jeweiligen Zeitpunkt die Schnitte zunächst kryokonserviert bzw. in Formalin fixiert und sämtliche Messungen später durchgeführt werden konnten.

Durch die im Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Etablierungs- und Optimierungsschritte beider *In vitro*-Kultursysteme standen die hier aufgeführten Zell- und Gewebeschnittzahlen für die folgende Durchführung der Medikamententestplattform zur Verfügung.

Als Beispiel der Proliferationsbestimmung sind in Abb. 33 repräsentative Bilder der BrdU-Färbung von 48h-behandelten Zellen des Patienten A2359 dargestellt.

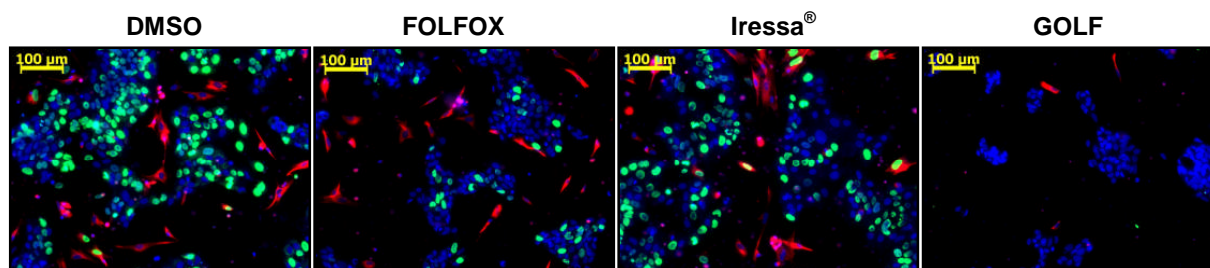


Abb. 33: Proliferationsbestimmung in Kurzzeit-kultivierten primären Zellen

Gezeigt sind repräsentative Bilder der 48h behandelten Kurzzeit-kultivierten primären Zellen des Patienten A2359 nach Immunfluoreszenzfärbung des inkorporierten BrdU, 200-fache Vergrößerung mit 100µm-Maßstab. Die BrdU-positiven Zellen (grün) und die Gesamtzahl der Zellen (Hoechst 33342-Kernfärbung, blau) wurden mittels einer Maske ermittelt und die Proliferationsverhältnisse der verschiedenen Behandlungsvarianten berechnet. Die Vimentin-positiven Fibroblasten (rot) wurden ebenfalls gefärbt und ihr prozentualer Anteil an den proliferierenden Zellen bestimmt. DMSO und Iressa® weisen ca. 50% proliferierende Zellen und 5-8% Fibroblasten auf, die selbst zu 30% positive BrdU-Färbung aufweisen. FOLFOX zeigt knapp 20% proliferierende Zellen und 6% für BrdU negative Fibroblasten. Nach GOLF-Behandlung ist keine Proliferation sichtbar, der Fibroblastenanteil geht auf knapp 3% zurück.

Anhand der DMSO-Kontrollen zeigte sich, dass die Kurzzeit-kultivierten primären Zellen deutlich weniger proliferierende Zellen (hier ca. 50% der Population) als die zuvor verwendeten Langzeit-Kulturen aufwiesen. Die Iressa®-Behandlung erzeugte

wie bei den Vortests keine erkennbare Reaktion. FOLFOX hingegen zeigte eine deutlich geringere Konfluenz der Zellen und nur noch knapp 20% für BrdU positiv gefärbte Zellen. Die GOLF-Behandlung bestätigte den in den vorherigen Untersuchungen festgestellten stärkeren Rückgang der Zellzahl und den kompletten Abfall der Proliferation, wobei zusätzlich ebenfalls der Fibroblastenanteil der Kulturen zurückging.

Beim ATP-Vergleich als Vitalitätsindiz (Abb. 34 A) bewirkte die Behandlung mit Iressa[®] in den primären Zellen wie in allen vorherigen Analysen keine Änderungen. Die kultivierten Gewebeschnitte zeigten hingegen sehr deutliche individuelle Reaktionsmuster und zusätzlich Messschwankungen der ATP-Level. Ein bis zu 8-fach höherer ATP-Level im Vergleich zu den DMSO-Kontrollschnitten wurde hierbei beobachtet. Die FOLFOX- und GOLF-Behandlungen hingegen erzeugten bei beiden *In vitro*-Kultursystemen einen deutlichen Abfall des ATP-Levels bis unter 10% der DMSO-Kontrollen. Dieser Abfall war jedoch bei den primären Zellen gegenüber den Gewebeschnitten etwas stärker und über die Zeit gleichmäßiger.

Der Vergleich der Caspase 3-Aktivierung als Indiz der Apoptose verwies auf einen weiteren Unterschied zwischen beiden Kultursystemen (Abb. 34 B). Beiden gemeinsam war, dass wiederum Iressa[®] keine Wirkung zeigte. Bei FOLFOX und GOLF jedoch waren deutliche Aktivierungen der Caspase 3 zu verzeichnen. Die Caspase 3-Aktivierung war in primären Zellen durch GOLF-Behandlung (knapp 3-fach nach 48h) stärker als durch FOLFOX (2-fach nach 24h). Bei den Gewebeschnitten jedoch unterschieden sich beide Behandlungen mit einer 2-2,5-fachen Aktivierung der Caspase 3 nur wenig voneinander. Allerdings zeigten die primären Zellen überwiegend eine frühe Caspase 3-Induktion (um 24h), die anschließend wieder absank. In den Gewebeschnitten hingegen trat die Wirkung beider Kombinationen zeitlich versetzt auf (erst um 72h).

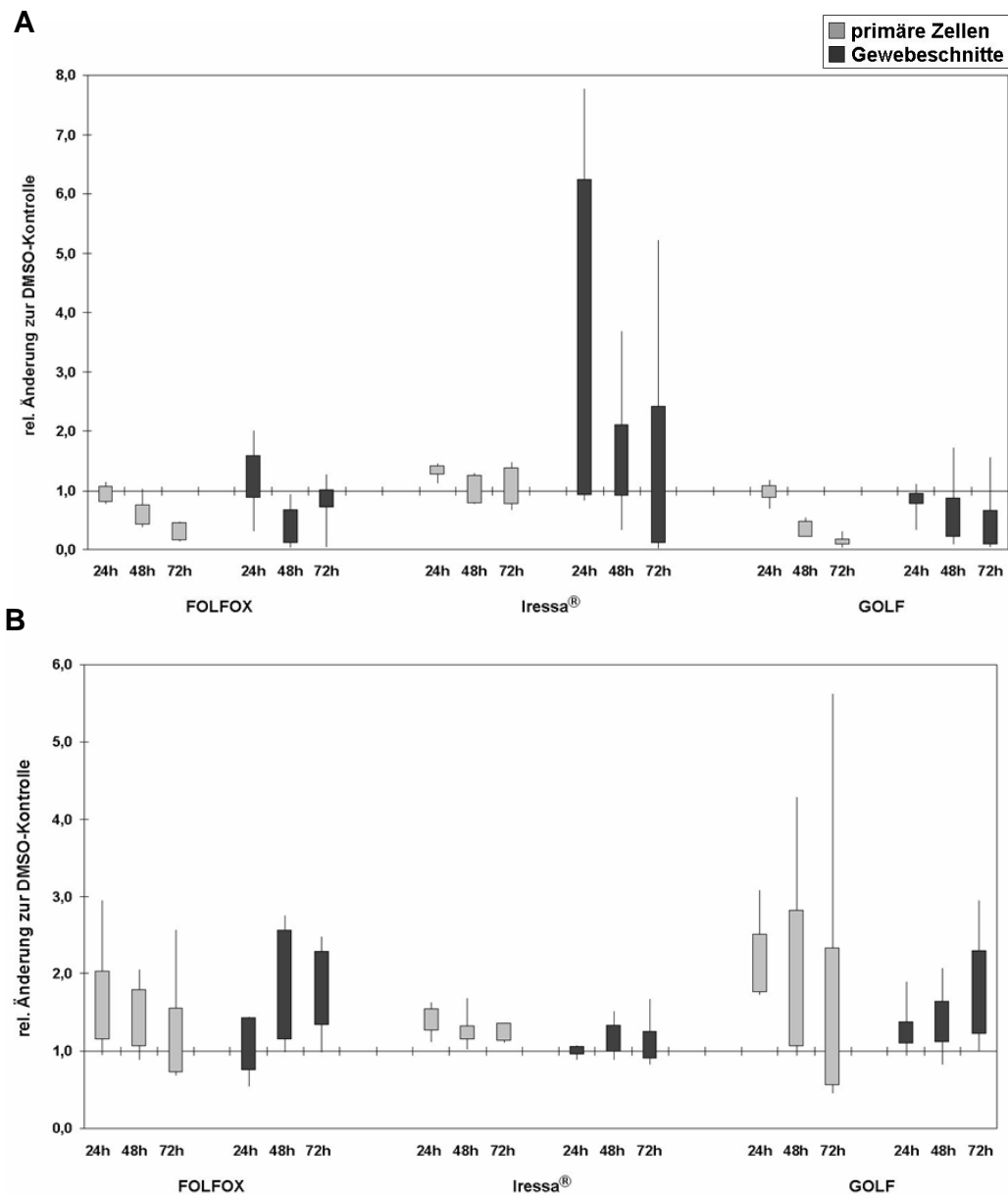


Abb. 34: ATP und aktivierte Caspase 3 in behandelten primären Zellen und Gewebeschnitten

Die Vitalität wurde durch ATP-Messung (s. 2.3.4.3), die Apoptose-Induktion durch Messung der aktivierten Caspase 3 (s. 2.3.4.4) in Kurzzeit-kultivierten primären Zellen und Gewebeschnitten bestimmt. Dargestellt sind die relativen Änderungen bezogen auf die jeweiligen DMSO-Kontrollen. Die Box Plots umfassen jeweils die fünf primären Zellkulturen (hellgrau) und die fünf kultivierten Gewebeschnittkulturen (dunkelgrau). **A** ATP-Messung. **B** Caspase 3-Bestimmung. Ein Abfall des ATP-Niveaus und ein gleichzeitiger Anstieg der aktivierten Caspase 3 sind bei FOLFOX und GOLF erkennbar. Dieser Abfall und Anstieg erweist sich bei den primären Zellen als überwiegend stärker als in den Gewebeschnitten. Iressa® verursacht in Gewebeschnitten einen höheren ATP-Level mit hohen Messschwankungen, beeinflusst jedoch in beiden Kultursystemen nicht die Aktivierung der Caspase 3.

Bei der Betrachtung von pAkt war in beiden *In vitro*-Kultursystemen zum wiederholten Mal Iressa® ohne erkennbare Reaktion. Sowohl die FOLFOX- als auch die GOLF-Behandlung erzeugten in primären Zellen eine Reduktion des pAkt-Niveaus (Abb. 35 A). Der Abfall in den primären Zellen auf 10% der DMSO-Kontrollen war stärker als in den Gewebeschnitten (30%), die zu Beginn der Zeitreihen einen höheren pAkt-Level aufwiesen (knapp das 3-fache der DMSO-Kontrollen).

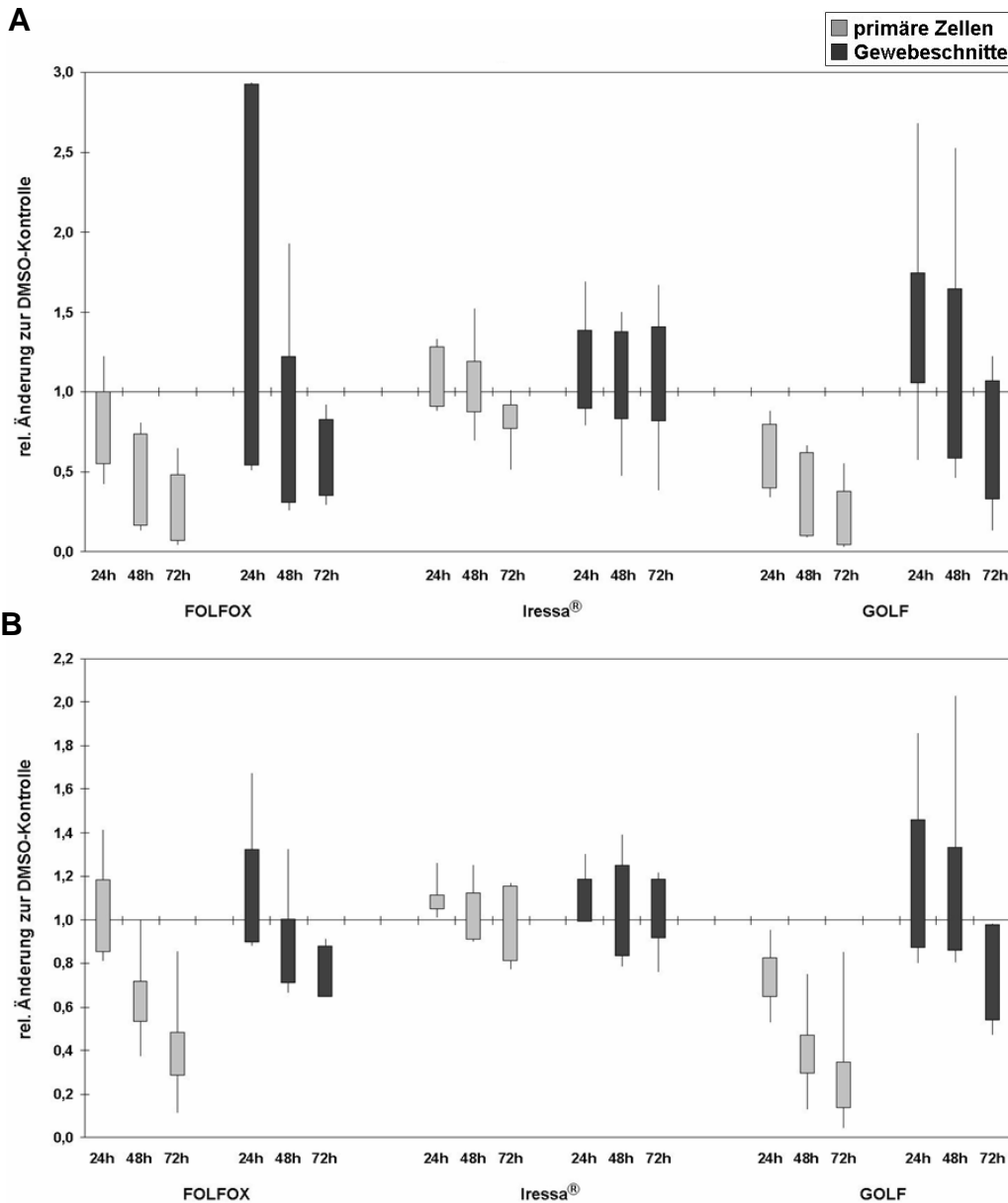


Abb. 35: Level von pAkt und pGSK-3 β in behandelten primären Zellen und Gewebeschnitten

Die Level von pAkt und pGSK-3 β (s. 2.3.4.8) wurden in Kurzzeit-kultivierten primären Zellen und Gewebeschnitten bestimmt. Dargestellt sind die relativen Änderungen bezogen auf die jeweiligen DMSO-Kontrollen. Die Box Plots umfassen jeweils die fünf primären Zellkulturen (hellgrau) und die fünf kultivierten Gewebeschnittkulturen (dunkelgrau). **A** pAkt. **B** pGSK-3 β . Ein Abfall des pAkt- und des pGSK-3 β -Levels ist bei FOLFOX und GOLF erkennbar. Dieser fällt bei den primären Zellen überwiegend stärker aus als in den Gewebeschnitten. Iressa® verursacht teilweise einen zunächst (24h) höheren pAkt-Level, jedoch keine Veränderungen des pGSK-3 β -Levels.

Ähnliche Verhältnisse wie für pAkt galten für die Analyse von pGSK-3 β (Abb. 35 B). Auf Iressa® zeigten die Kulturen wiederholt keine Reaktion. Die Gewebeschnitte reagierten zwar auf FOLFOX und GOLF, der pGSK-3 β -Level sank aber in beiden Fällen nicht unter 50% der DMSO-Kontrollen. In den primären Zellen hingegen kam es im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einem sehr deutlichen Absinken von pGSK-3 β . Dieser Abfall war wiederum durch GOLF-Behandlung stärker (10%) als durch FOLFOX (30%) (Medianberechnung).

Die Evaluierung der Medikamententestplattform an Kurzzeit-kultivierten primären Zellen und Gewebeschnitten ergab zusammenfassend folgende Ergebnisse:

- Es ließen sich bei beiden *In vitro*-Kultursystemen Unterschiede zwischen Medikamenten, Kombinationen und den jeweiligen Zeit-abhängigen Wirkungseffekten bestimmen ebenso wie die individuellen Reaktionsmuster einzelner Patienten.
- Die primären Zellen reagierten überwiegend sensitiver auf die Behandlungen mit FOLFOX und GOLF als die Gewebeschnitte. Generell bestätigte sich aber im Vergleich mit FOLFOX die stärkere Wirkung von GOLF, während der EGFR-Inhibitor Iressa[®] kaum Effekte aufwies. Dies war sowohl im Überblicksvergleich aller Patienten als auch in separat kontrollierten Vergleichen einzelner Patienten festzustellen und bestätigte die Ergebnisse der Voruntersuchungen an Langzeit-Kulturen.
- Die Auswertung der an Gewebeschnitten gewonnenen Daten zu grundlegenden und individuellen Reaktionsmustern wurde allerdings im Gegensatz zu primären Zellkulturen teilweise durch auftretende Messschwankungen erschwert.

3.3 Anwendung der Medikamententestplattform

In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit wurde die Etablierung und Evaluierung einer Medikamententestplattform mit geeigneten *In vitro*-Kultursystemen gezeigt. Sie wurde im Folgenden an primären Zellen von kolorektalen Karzinompatienten durchgeführt, um eine praktische Anwendung der Plattform zu demonstrieren. Zur Kontrolle der Robustheit und Reproduzierbarkeit der Plattform wurden die Medikamenteneffekte in primären Zellen von einer möglichst großen Patientenzahl als Gruppe und einzeln analysiert sowie anhand der erhobenen klinischen Daten und konservierten Referenzgewebe auf molekulare Veränderungen und Abhängigkeiten überprüft.

3.3.1 Verwendung von Tumorgewebe von 28 Patienten

Es wurden primäre Zellen von 28 Patienten mit kolorektalem Karzinom in der Medikamententestplattform eingesetzt, wobei nur primäre Adenokarzinome des Kolons und Rektums verwendet wurden (keine Metastasen), die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Weitere Einschränkungen zur Patientenauswahl wurden nicht vorgenommen. Dadurch wurde in kurzer Zeit die Fallzahl von 28 Patienten erreicht. Die jeweiligen primären Zellkulturen wurden hinsichtlich ihrer

Vitalität, Anwachsrate und Zellzahlausbeute überprüft und die in der Plattform verwendbaren Kulturen (s. 3.1.2.1) anschließend behandelt. Zunächst wurden die verwendeten Patientengewebe anhand der klinisch erfassten Daten charakterisiert.

3.3.1.1 Vergleich der klinische Daten

Die standardisiert erhobenen Daten der 28 Patienten wurden in einer Datenbank (Indivumed GmbH) zur Auswertung zusammengetragen (Tab. 15).

Tab. 15: Klinische Daten der 28 Patienten mit kolorektalem Karzinom

Aufgelistet sind die standardisiert von Indivumed GmbH ermittelten Daten zu Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Tumordifferenzierung, TNM-Klassifikation, Stadium und die Gradeinteilung.

Nr.	Patienten-kürzel	Geschlecht	Alter	Tumor-lokalisation	Tumor-differenzierung	TNM-Klassifikation (UICC 2002)	Stadium	Grad-einteilung
1	A2136	männlich	58	Colon sigmoideum	moderat	T3 N1 1/27 M0 L1 V0 R0	IIIB	G2
2	A2139	männlich	58	Colon sigmoideum	moderat	T3 N1 1/27 M0 L1 V0 R0	IIIB	G2
3	A2156	männlich	77	Colon sigmoideum	moderat	T3 N1 2/33 M0 L0 V0 R0	IIIB	G2
4	A2162	männlich	67	Rectum	moderat	T3 N2 6/17 M1 L1 V0 R0	IV	G2
5	A2166	weiblich	79	Colon sigmoideum	moderat	T3 N1 3/12 M0 L1 V0 R0	IIIB	G2
6	A2167	weiblich	63	Flexura splenica	moderat	T3 N0 0/28 M0 L0 V0 R0	IIA	G2
7	A2180	weiblich	80	Colon ascendens	moderat bis schwach	T3 N2 18/32 M1 L1 V1 R0	IV	G3
8	A2215	männlich	69	Colon ascendens	moderat	T2 N0 0/27 M0 L0 V0 R0	I	G2
9	A2216	männlich	72	Flexura hepatica	moderat	T3 N1 3/8 M1 L0 V0 R0	IV	G2
10	A2220	männlich	68	Colon sigmoideum	schwach, schleimig	T3 N2 6/22 M1 L0 V0 R0	IV	G3
11	A2223	weiblich	85	Rectum	moderat	T3 N1 3/13 M1 L1 V1 R2	IV	G2
12	A2230	männlich	66	Rectum	moderat	T2 N0 0/19 M0 L0 V0 R0	I	G2
13	A2231	männlich	57	Rectum	moderat	T2 N1 1/29 M0 L0 V0 R0	IIIA	G2
14	A2258	weiblich	40	Rectum	moderat	T2 N0 0/30 M0 L0 V0 R0	I	G2
15	A2275	weiblich	46	Colon transversum	schwach	T4 N0 0/45 M0 L0 V0 R0	IIB	G3
16	A2288	männlich	68	Rectum	moderat	T3 N1 1/24 M0 L0 V0 R0	IIIB	G2

Nr.	Patienten-kürzel	Geschlecht	Alter	Tumor-lokalisierung	Tumor-differenzierung	TNM-Klassifikation (UICC 2002)	Stadium	Grad-einteilung
17	B999	männlich	77	Colon ascendens	moderat	T2 N0 0/16 M0 L1 R0	I	G2
18	B1007	männlich	82	Colon sigmoideum	schwach	T3 N1 1/17 M0 L1 R0	IIIB	G3
19	B1014	weiblich	71	Colon ascendens	schwach	T1 N0 0/25 M0 L1 V1 R0	IIIB	G3
20	B1050	männlich	68	Flexura hepatica	moderat	T3 N0 0/16 M0 L1 V1 R0	IIA	G2
21	B1058	weiblich	72	Colon transversum	moderat	T3 N0 0/14 M0 L1 V1 R0	IIA	G2
22	B1065	weiblich	73	Rectum	moderat	T3 N0 0/29 M0 L1 V1 R0	IIA	G2
23	B1090	weiblich	87	Colon transversum	moderat	T3 N0 0/20 M0 L1 V1 R0	IIA	G2
24	KC73	männlich	77	Colon ascendens	moderat, teilw. schleimig	T3 N0 0/12 M0 L0 R0	IIA	G2
25	R3	weiblich	48	Caecum	schwach	T3 N1 3/24 M1 R0	IV	G3
26	R10	weiblich	85	Caecum	schwach	T3 N0 0/28 M0 R0	IIA	G3
27	R39	weiblich	71	Colon ascendens	moderat, teilw. schleimig	T4 N0 0/13 M1 R0	IV	G2
28	R45	weiblich	79	Rectum	moderat	T3 N1 1/13 M0 R0	IIIB	G2

Es handelte sich um Tumorgewebe von Patienten im Alter von 40-87 Jahren. Die Tumore waren an unterschiedlichen Positionen des gesamten Darmtraktes lokalisiert. Sie beinhalteten alle Stadien von I-IV, schwach oder moderat differenzierte, sowie vier Patienten mit Metastasierung.

Die 28 Patienten bildeten demnach eine sehr heterogene Patientenpopulation. Diese breite Ausgangsdatenlage wurde dazu genutzt, um die Robustheit der Medikamententestplattform und ihr Vermögen zu überprüfen, sowohl die zuvor evaluierten Medikamentenwirkungen zu reproduzieren als auch individuelle Patientenreaktionen abzubilden. Zur näheren Charakterisierung dieser Patientenpopulation wurden im Folgenden zusätzlich die morphologischen und molekularen Gewebecharakteristika analysiert.

3.3.1.2 Molekulare Gewebecharakteristika des konservierten Referenzgewebes

Für diese Analysen wurde in Formalin konserviertes Referenzmaterial verwendet und in IHC-Analyse ausgewählte Proteine sichtbar gemacht (s. 2.3.4.10):

- Ki67 als Proliferationsmarker ^[108]
- das Reparatur- und Apoptose-relevante Protein p53 ^[95, 96]
- p-mTOR zur Repräsentation des Akt-Signalwegs ^[119], da in dieser Arbeit bei Akt und GSK-3 β im Medikamententest deutliche Wirkungseffekte demonstriert werden konnten

Zur Analyse der Gewebemorphologie wurden zusätzlich Schnitte mit der HE-Methode angefärbt (s. 2.3.4.10). Um die Färbeargebnisse und Gewebemorphologien darzustellen sowie die Bandbreite der unterschiedlichen IHC-Färbungen einzuordnen, sind in Abb. 36 drei Patientengewebe repräsentativ dargestellt. Die prozentualen Einteilungen morphologischer Bereiche und die Anteile der jeweiligen positiven IHC-Färbungen wurden hierfür an mikroskopischen Aufnahmen der kompletten Schnitte abgeschätzt.

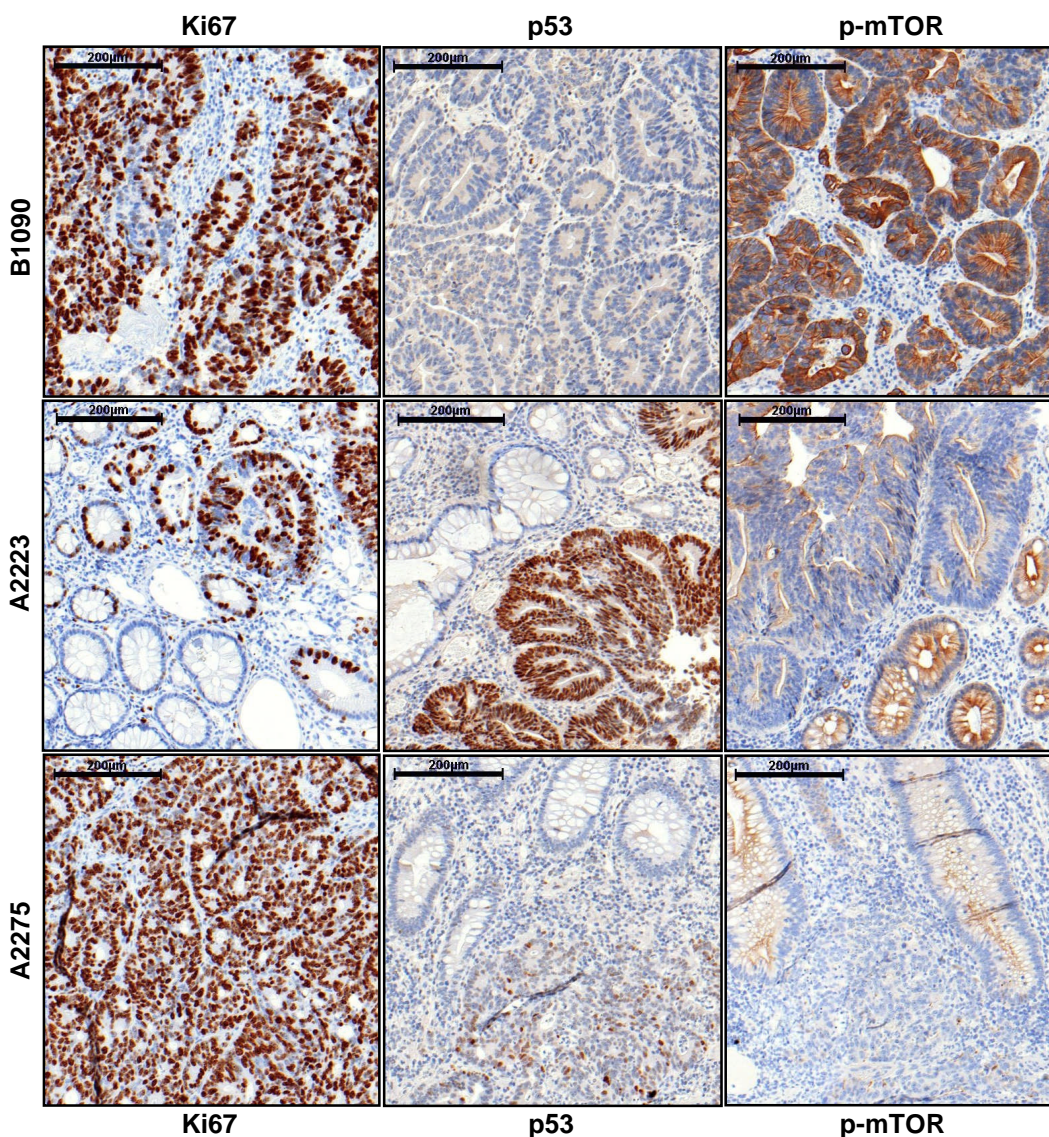


Abb. 36: IHC-Analyse der Patientengewebe B1090, A2223 und A2275

Gezeigt sind in 100-facher Vergrößerung (200µm-Maßstab) Beispielbilder der IHC-Färbungen Ki67, p53 und p-mTOR der Patientengewebe B1090, A2223 und A2275. Die positive Antikörperkopplung wurde durch Chromogenentwicklung (braun) detektiert, mit Hämatoxylin erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne (blau). Die drei Patienten weisen extrem unterschiedliche Level an Ki67-, p53- und p-mTOR auf. Zwischen starken Färbungen bei Ki67, p53 und p-mTOR bis zu vollständig negativen Färbungen bei p53 (B1090) sind mehrere Abstufungen zu erkennen.

Die Gewebe beinhalteten Tumoranteile von 10% bis 80% und Normalschleimhaut von 10% bis 90%. Der Rest der Schnitte bestand aus Muskel- und in geringem Maße aus lymphatischem Gewebe.

Die Ki67-Färbung als Proliferationsindiz zeigte individuelle Unterschiede. Die Patienten B1090 und A2275 wiesen stark positive Zellkerne (braun) in annähernd allen Tumorzellen auf. Die Tumorzellen A2223 dagegen waren ebenso wie normale Schleimhautzellen nicht alle positiv für Ki67 und geringfügig schwächer gefärbt.

Die individuellen Ergebnisse der p53-Färbung unterschieden sich ebenfalls deutlich. Der Patient A2223 wies nur in der Hälfte der Tumorzellen eine positive und starke

Färbung auf. In den Patienten A2275 und B1090 hingegen waren kaum spezifische p53-Expressionsfärbungen, weder in den Tumorbereichen noch in den Krypten der Normalschleimhaut, zu sehen.

Der p-mTOR-Level zeigte in Tumorbereichen und Normalgewebe häufig sehr unterschiedliche Intensitäten. Das Patientengewebe des B1090 wies sowohl im Zytosol der Tumorbereiche als auch in den Krypten der Normalschleimhaut eine extrem starke Färbung auf, die in keinem anderen Gewebe der 28 Patienten mit vergleichbarer Stärke detektiert wurde. Im Gegensatz hierzu zeigten die Patienten A2223 und A2275 nur sehr schwache Färbungen. Die Tumorzellen wurden hierbei nur zu 30% oder gar nicht als positiv gefärbt eingestuft, wohingegen die Krypten der Normalschleimhaut zu 50% oder mehr schwach bis mittelstarke Färbungen anzeigten.

Die Ergebnisse dieser drei Gewebebeispiele zeigten deutlich die große Bandbreite an unterschiedlicher Tumormorphologie und in den Expressionsleveln von Ki67, p53 und p-mTOR. Nach Einordnung und subjektiver Skalierung der Proteinlevel durch diese drei Patientengewebe in „schwache“, „mittlere“ und „starke“ Färberegebnisse wurden die Expressionsstärken der drei Proteine in den 28 Patientengeweben durch entsprechende mikroskopische Analysen charakterisiert (Tab. 16).

Tab. 16: Expressionsstärken der Proteine Ki67, p53 und p-mTOR (IHC-Färbung)

Die Einteilung der Expressionsstärke der drei Proteine Ki67, p53 und p-mTOR erfolgte aufgrund der prozentualen Flächenanteile der positiv (braun) gefärbten Zellen bzw. Gewebereiche und ihrer Intensität. Angegeben sind die Abstufungen „schwach“, „mittel“ und „stark“.

Nr.	Patienten-kürzel	Expressionsstärke (Braunfärbung)		
		Ki67	p53	p-mTOR
1	A2136	schwach	schwach	stark
2	A2139	mittel	schwach	schwach
3	A2156	stark	stark	schwach
4	A2162	stark	stark	mittel
5	A2166	stark	schwach	schwach
6	A2167	mittel	stark	schwach
7	A2180	stark	mittel	mittel
8	A2215	mittel	schwach	schwach
9	A2216	mittel	schwach	mittel
10	A2220	schwach	stark	schwach
11	A2223	mittel	mittel	schwach
12	A2230	mittel	schwach	mittel
13	A2231	mittel	schwach	mittel
14	A2258	stark	mittel	schwach
15	A2275	stark	schwach	schwach
16	A2288	stark	stark	mittel
17	B999	mittel	stark	stark
18	B1007	schwach	schwach	mittel
19	B1014	mittel	schwach	mittel
20	B1050	mittel	schwach	schwach
21	B1058	schwach	stark	mittel
22	B1065	mittel	mittel	schwach
23	B1090	stark	schwach	stark
24	KC73	stark	stark	schwach
25	R3	schwach	schwach	mittel
26	R10	stark	schwach	schwach
27	R39	mittel	stark	mittel
28	R45	mittel	stark	schwach

Die Ki67-Färbung differierte sehr, es gab allerdings kein Gewebe, das keinerlei Ki67-Expression aufwies. Deutlich unterschiedlicher waren die Expressionen von p53 sowie p-mTOR. Von komplett negativ über schwach und mittelstark bis zu stark gefärbten Schnitten kamen alle Abstufungen vor, wobei die prozentualen Anteile der Zellen in Tumorbereichen und in den Krypten der Normalschleimhaut ebenfalls stark unterschiedlich waren. Hierbei war in mehreren Geweben die Menge an p-mTOR in den Krypten der Normalschleimhaut deutlich höher als in den Zellen der Tumorbereiche. Die große Bandbreite an heterogenen Färbeergebnissen ist erstens anhand der drei einzelnen Proteine gut zu erkennen. Zweitens sind die Expressionsmuster der drei Proteinlevel zwischen den Patienten ebenfalls sehr unterschiedlich.

Diese weit reichenden heterogenen Gewebe-spezifischen Charakteristika korrespondierten mit der großen Streuung der klinischen Daten (s. 3.3.1.1). Im Folgenden wurde die Medikamententestplattform dahingehend überprüft, ob sie trotz dieser heterogenen Ausgangslage in der Lage war, die zuvor evaluierten Ergebnisse von Medikamentenwirkungen zu reproduzieren.

3.3.2 Durchführung der Medikamententestplattform

Es wurden die ATP-Level, die Proliferation (BrdU-Inkorporation), die Aktivierung der Caspase 3/7 (Chemilumineszenzmessung) sowie der Phosphorylierungslevel von ERK 1/2, MEK 1/2 und STAT3 sowie P70s6K, GSK-3 β und Akt (multi-funktioneller ELISA) bestimmt. Diese Proteine repräsentieren drei zentrale Signalwege der komplex vernetzten Signaltransduktionskaskaden, durch die u.a. die zelluläre Steuerung des Zellzyklus, des Zellüberlebens, der Apoptose sowie des Metabolismus erfolgt: MAPK-, Akt- und JAK-STAT-Signalweg^[19, 20, 21]. Um die individuellen Reaktionen auf die Kombination FOLFOX zu analysieren, wurden die primären Zellen 48h behandelt und die Ergebnisse mit den jeweiligen DMSO-Kontrollzellen verglichen.

3.3.2.1 Auswertung und Klassifizierungsanalyse der FOLFOX-Reaktionen

Es wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede in den Effekten und Reaktionen charakterisiert werden konnten und ob mit ihnen eine Klassifizierung der primären Zellkulturen bzw. der Patienten in unterschiedlich reagierende Gruppen möglich war. In Abb. 37 sind repräsentativ die durch 48h-FOLFOX-Behandlung auftretenden relativen Änderungen zu den jeweiligen DMSO-Kontrollzellen dargestellt: ATP-Level (Vitalitätsindiz), BrdU-Inkorporation (Proliferationsindiz), pAkt-Level (Abb. 37 A) und Caspase 3/7-Aktivierung (Apoptose-Indiz), Level an pSTAT3 und pERK 1/2 (Abb. 37 B).

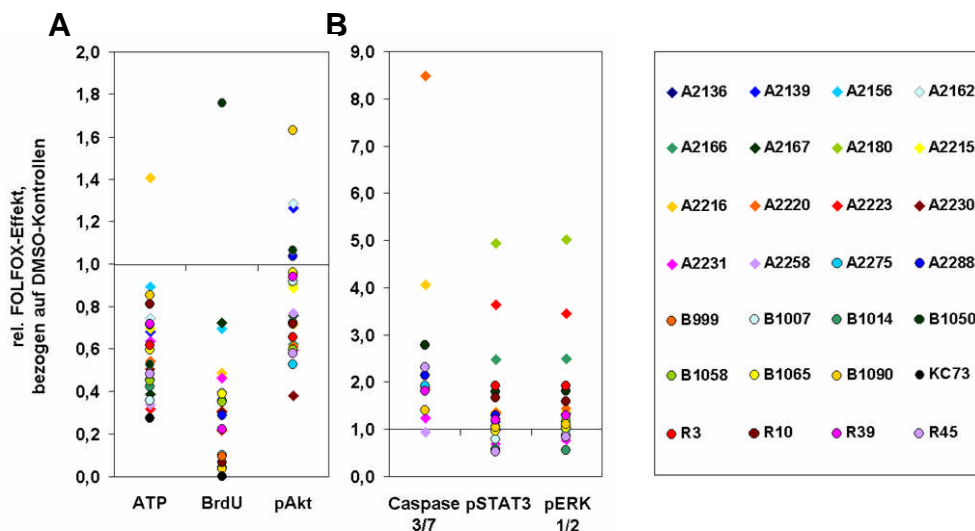


Abb. 37: FOLFOX-Effekte in den primären Zellkulturen der 28 Patienten

Aufgetragen sind die durch 48h-FOLFOX-Behandlung hervorgerufenen Veränderungen in den primären Zellen aller 28 Patienten: Vitalität (ATP; s. 2.3.4.3), Apoptose (Caspase 3/7; s. 2.3.4.4), Proliferation (BrdU; s. 2.3.2.8 & 2.3.4.10) und Phosphorylierung von Signaltransduktionsproteinen (pAkt, pSTAT3 und pERK 1/2; s. 2.3.4.8). Die y-Achse zeigt die relativen Änderungen bezogen auf die jeweiligen DMSO-Kontrollen. Die zuvor evaluierten Tendenzen, abfallender ATP-Level und BrdU-Inkorporation sowie ansteigende Caspase 3/7-Aktivierung, werden bestätigt. Bei den Leveln von pAkt, pSTAT3 und pERK 1/2 sind sowohl Erhöhungen als auch abfallende Level bei einzelnen Patienten zu beobachten. Die abfallende Tendenz des pAkt aus vorherigen Analysen ist nur schwach zu erkennen.

Trotz der zuvor charakterisierten Heterogenität der Patientenpopulation konnten übergreifende FOLFOX-Effekte gemessen werden. Die zuvor analysierten Entwicklungen (s. 3.2.1.3 und 3.2.2) wurden bestätigt:

- ATP-Level und die Anzahl der BrdU-positiven Zellen (Proliferation) fielen ab.
- Die pAkt-Menge zeigte ebenfalls in den meisten Kulturen einen Abfall, der hier allerdings nicht unter das 0,5-fache der DMSO-Kontrollen fiel.
- Der Level der aktiven Caspase 3/7 stieg auf überwiegend signifikante Werte.
- Die Phosphorylierung von ERK 1/2 war in den meisten Kulturen nicht beeinflusst.
- pSTAT3 (erstmalig bestimmt) korrespondierte deutlich mit den pERK 1/2 Daten.

Gleichzeitig demonstrierten diese Ergebnisse, dass trotz übergreifender FOLFOX-Effekte individuelle Reaktionen der verschiedenen primären Zellkulturen durch die Plattform abgebildet werden konnten. Diese Streuung der FOLFOX-Effekte innerhalb der verschiedenen Messmethoden war sehr groß. Zur näheren Analyse dieser Streuung wurde daher eine Klassifizierungsanalyse durchgeführt, wobei nach statistischen Gruppen innerhalb der FOLFOX-Reaktionen gesucht wurde. Eine Clusteranalyse inklusive Euklidischer Distanzberechnung mit der Software „Statistica

Data Miner“ (StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg) konnte jedoch keine signifikante ($p \leq 0,05$) Klasseneinteilung identifizieren.

3.3.2.2 Korrelationsanalysen

Neben der Klassifizierungsanalyse wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse der Medikamententestplattform, der klinischen Daten sowie der einzelnen IHC-Färbungen wurden herangezogen und nach statistisch relevanten ($p \leq 0,05$) Korrelationen zwischen sämtlichen Daten und Parametern gesucht, um Indizien über mögliche Abhängigkeiten von Parametern zu erhalten.

Mittels „Spearman-Rangkorrelation“ der Software „Statistica Data Miner“ (StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg) wurden zunächst die Korrelationsbeziehungen zwischen den einzelnen klinischen Daten und den Messergebnissen der Medikamententestplattform analysiert. Wie zuvor dargelegt waren z.B. die Altersverteilung der Patienten, die Tumorlokalisation und die Tumorstadien äußerst unterschiedlich. Der Level von pSTAT3 nach 48h-FOLFOX-Behandlung stieg parallel mit dem Tumorstadium (I-IV) des den primären Zellen zugrunde liegenden Gewebes (Abb. 38).

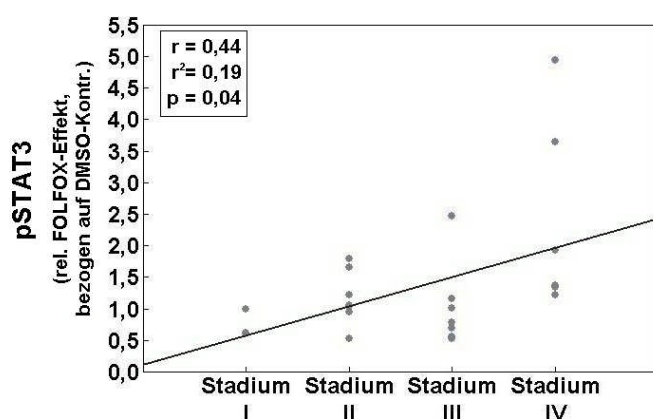


Abb. 38: Korrelation zwischen Tumorstadium und pSTAT3-Level

Dargestellt ist die Korrelation der Tumorstadien mit den pSTAT3-Levels nach 48h-FOLFOX-Behandlung der primären Zellen aller 28 Patienten. pSTAT3 wurde als relative Änderung zur jeweiligen DMSO-Kontrolle auf der y-Achse, die Tumorstadien I-IV auf der ordinalen Skala der x-Achse aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient (r) gibt die Korrelation zwischen beiden Parametern an, r^2 das Korrelationsmaß und p die statistische Varianz.

Die x-Achse zeigt die Verteilung der Patienten (graue Punkte) auf die vier Tumorstadien. Die y-Achse gibt die relativen Änderungen der pSTAT3-Level an, die sich durch die FOLFOX-Behandlung bezogen auf die jeweiligen DMSO-Kontrollzellen ergaben. Dies wies auf eine mit $p = 0,04$ („statistische Varianz“) statistisch relevante und mit $r = 0,44$ („Korrelationskoeffizient“) mittelstarke positive Korrelation hin. Der quadrierte Korrelationskoeffizient ($r^2 = 0,19$) zeigte jedoch, dass zwischen den einzelnen Messwerten von pSTAT3 und den Tumorstadien nur zu 19% eine Korrelation besteht (100% wäre eine absolute Abhängigkeit). Innerhalb dieser Fallzahlgruppe von 28 Patienten konnte es sich hierbei um ein Zufallsergebnis handeln. Diese demnach nicht eindeutige Korrelation sollte daher durch größere

Fallzahlen kontrolliert werden. Entsprechende Analysen zwischen weiteren Messergebnissen der Medikamententestplattform und dem Tumorstadium ergaben keine eindeutigen Abhängigkeiten.

Die Korrelationsanalysen wurden daher im Folgenden auf die IHC-Ergebnisse ausgeweitet. Es wurde sowohl nach möglichen Abhängigkeiten zu den klinischen Daten als auch zu den Ergebnissen des Medikamententests gesucht. Es waren jedoch ebenfalls keine statistisch eindeutigen Korrelationen festzustellen.

Zusammenfassend war festzuhalten:

- Trotz der starken Heterogenität der eingesetzten Patientenmaterialien war die Medikamententestplattform in der Lage, die zuvor gemessenen FOLFOX-Effekte zu reproduzieren.
- Die Plattform war darüber hinaus geeignet, die individuellen Reaktionen der einzelnen *In vitro*-Kulturen der Patienten abzubilden.
- Klassifizierungen von Patienten-spezifischen Reaktionsgruppen oder eindeutige Aussagen über Korrelationen der verschiedenen Parameter waren mit diesen 28 Patienten nicht möglich.

4 Diskussion

Zur Entwicklung neuer Medikamente sind genaue Kenntnisse über die Reaktionswege notwendig, um Ursachen für unterschiedliche Wirksamkeiten und individuelle Resistenzmechanismen von Tumoren identifizieren und in Behandlungskonzepten berücksichtigen zu können. Diese sind jedoch häufig noch nicht ausreichend geklärt. Eine Medikamententestplattform stellt hierfür eine Möglichkeit dar, Daten über Reaktionsunterschiede individueller Tumore durch die Verwendung von auf ihnen basierender *In vitro*-Kulturen zu erhalten. Die parallele Gewinnung von Referenzmaterial und das Bestehen der klinischen Datenbank der Firma Indivumed GmbH bietet darüber hinaus die Möglichkeit, auf genetischer bzw. proteinbiochemischer Ebene Vergleichsanalysen vorzunehmen, um nach neuen Erkennungsmarkern, Medikamentenzielen und Resistenzmarkern zu suchen. Nach Resistenzursachen zu suchen hat eine hohe Priorität ^[120, 121]. Wie Helfrich et al. ^[8] darlegten, können hierbei diverse Parameter wie Genexpression, Genamplifikationen, Mutationen sowie Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus eine Rolle spielen. Es gilt herauszufinden, welche Proteine und Signalwege zur Resistenz beitragen, ob sie durch Mutationen veränderte Funktionen aufweisen und ob sie als Resistenzmarker und Ziel für weitere Medikamente und Inhibitoren dienen können. Um dieser individuellen Komplexität gerecht zu werden, sollten nur mit Ursprungstumoren vergleichbare *In vitro*-Kultursysteme zu Analysen herangezogen werden.

4.1 Etablierung von *In vitro*-Kultursystemen für kolorektale Tumore

In vitro-Kultursysteme werden für eine Vielzahl an Analysen wie Untersuchungen zur Medikamentenwirkung und spezifischen Signalwegen verwendet. Ein wichtiges Kriterium für ihre Verwendung ist die Reproduzierbarkeit der auf ihrer Basis gewonnenen Ergebnisse und deren Übertragbarkeit auf den Tumor im Menschen. Damit diese gegeben ist, müssen die *In vitro*-Kultursysteme die charakteristischen Eigenschaften der Ursprungstumore widerspiegeln. Dies betrifft sowohl den Genotyp, u.a. genetische Polymorphismen, Mutationen, Genkopiezahlen und Expressionsmuster als auch den dadurch bestimmten Phänotyp, u.a. zelluläre Signalwege, Phosphorylierungsmuster und das Reaktionsverhalten gegenüber Medikamenten.

Die Entwicklung von Zelllinien, die Charakterisierung ihrer Eigenschaften und der Vergleich mit Ursprungstumoren hat nicht nur für das kolorektale System gezeigt,

dass diese nur zu einem kleinen Prozentsatz die Expressionsmuster ^[122, 68] und die genetische Diversität ^[123, 124] der kolorektalen Ursprungstumore repräsentieren. Oh et al. ^[93] hingegen beschreiben zwölf gut charakterisierte kolorektale Zelllinien als dafür geeignet, gemeinsam mit weiteren Zelllinien einen Ursprungstumor darzustellen. Da Zelllinien durch Klonierung von Langzeit-kultivierten primären Zellkulturen abstammen, ist insbesondere die Stabilität der genetischen und proteinbiochemischen Merkmale dieser Langzeit-Kulturen sowie ihr Kulturverhalten zu untersuchen, denn die Anpassung an die *In vitro*-Kulturbedingungen und lange Kulturdauer führt im Vergleich zum Ursprungsgewebe zu gesteigerten Translations- und Proliferationsraten ^[8, 125]. Thiery et al. ^[69] und Bhadriraju et al. ^[126] haben gezeigt, dass sich der Phänotyp von passagierten Zellkulturen durch eine Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Eigenschaften (EMT) ändert. Eine gleichzeitige Abnahme der Heterozygotität ^[71] und Verkleinerung des genetischen Pools führen zu massiven Flaschenhals-Effekten ^[127] und einem Verlust phänotypischer Eigenschaften. Daher wurde für diese Arbeit die kolorektale geno- und phänotypisch gut charakterisierte Zelllinie HT29 zwar für methodische Etablierungen sowie als Vergleichs- und Referenzsystem mit anderen *In vitro*-Kultursystemen, jedoch nicht für auf kolorektale Tumore zu übertragende Analysen verwendet. Gayet et al. ^[128] und Vécsey-Semjén et al. ^[129] sprechen zwar bei einigen neuen Zelllinien von einer guten Übertragbarkeit ihrer Eigenschaften auf kolorektale Tumore, sie stellten aber ebenfalls fest, dass selbst mehrere Zelllinien mit unterschiedlicher Expressionsausprägung in Summe trotzdem nicht die komplexen Eigenschaften dieses Tumortyps widerspiegeln. Um dies zu erreichen, müssen weitere Zelllinien aus Langzeit-Kulturen primärer Zellen durch Klonierung und Immortalisierung gewonnen und ihre charakteristischen Eigenschaften festgestellt werden.

Langzeit-Kulturen primärer Zellen

Die in dieser Arbeit etablierte Isolierungs- und Kultivierungsprozedur primärer Zellen kolorektaler Tumore ermöglichte die Analyse einiger geno- und phänotypischer Eigenschaften und Verhaltensweisen von passagierten und in Langzeit-Kultur gehaltener Zellkulturen. Wie unter 3.1.1 exemplarisch gezeigt, ist die A413-Kultur phänotypisch eine epitheliale Mischkultur mit weniger als 5% Fibroblasten, die sich in großen Mengen und bis über die 27. Passage hinaus kultivieren lässt. Während dieser Langzeit-Kultivierung wurde in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen über Zelllinien und Langzeit-Kulturen ^[69, 71, 126, 127] eine morphologische Abnahme der Zellheterogenität der A413-Population beobachtet, insbesondere

verlor sie den Fibroblastenanteil. Gleichzeitig erhöhte sich die Zellproliferation, was an den Verdopplungsraten und durch BrdU-Färbungen sichtbar wurde. Um die molekularen Eigenschaften von Langzeit-Kulturen auf Stabilität zu überprüfen, wurden Expressionsanalysen an unterschiedlichen Passagen einer Kultur durchgeführt. Veränderungen der Expressionsmuster einer Kultur durch die Passagierung wären ein Nachteil für die Reproduzierbarkeit in Analysen und die Übertragbarkeit auf Ursprungstumore. Es wurde ebenfalls exemplarisch die epitheliale Mischkultur A413 verwendet, da aufgrund der möglichen Gewinnung großer Zellzahlen ein breites Analysenspektrum parallel und kontinuierlich nacheinander durchführbar war.

Der Vergleich der „frühen“ und „späten“ Passagen im Microarray DualChip™ (Vergleich Passage 6 mit 19, s. 3.1.1, Abb. 4) zeigte Änderungen der Genexpression des wichtigen kolorektalen Tumormarkers *CEACAM5* (CEA) und des *EGFR*, der in Kolontumoren häufig überexprimiert und -aktiviert vorliegt [8, 9, 26]. Der genetische Polymorphismus dieser Tumor-relevanten Marker wird analysiert, um Ursachen und Wirkung auf Medikamentenreaktionen zu untersuchen [60, 130, 131]. Nach Behandlung mit Oxaliplatin oder 5-Fluorouracil mit Leucovorin wurde u.a. eine Erhöhung des CEA-Proteinlevels in kolorektalen Zelllinien wie den HT29 von Prete et al. [132] festgestellt. Der EGF-Rezeptor hingegen wurde u.a. von Kuwai et al. [104] als sehr unterschiedlich in der Empfindlichkeit gegen Inhibitoren beschrieben. Die Genkopienzahl sowie bestimmte Mutationen wie die Deletion in Exon 19 (L858R-Mutation) können Zellen z.B. für die Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib sensitiv machen [37, 38, 39]. Andere Mutationen wie T790M hingegen erzeugen Resistenz diesen Inhibitoren oder auch inhibitorischen Antikörpern wie Cetuximab gegenüber [38, 39, 40]. Bei Brustkrebspatientinnen wird vor einer Behandlung mit dem Rezeptorantagonisten Trastuzumab (Herceptin®) der HER2-Level kontrolliert [52, 53]. Eine Kontrolle des EGFR-Expressions- bzw. Mutationsstatus, um einen Behandlungserfolg von z.B. Gefitinib vorherzusagen, wird bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zurzeit nicht vorgenommen. Gleichzeitig wurden Änderungen der Genexpression des Oncogens Stathmin 1 (*STMN1*), *CTNNB1* (Catenin β), *VEGFA*, *FLT4* und *PLAUR* (uPAR) festgestellt. Diese Gene sind in unterschiedlichen zellulären Prozessen involviert. Das Oncogen Stathmin 1 steuert im Zellzyklus und in der Proliferation die Umstrukturierung der Mikrotubuli [97, 133, 134]. Die Gene *CTNNB1*, *VEGFA* und *FLT4* [98, 99, 100, 135] sind an der Angiogenese beteiligt, und Expressionsänderungen dieser Gene können die Überlebensfähigkeiten von Tumorzellen stark beeinflussen. Der uPA-Rezeptor (*PLAUR*) ist ebenfalls an der Angiogenese beteiligt und hat darüber hinaus zentralen Einfluss

auf die Expression von u.a. Collagenen und Fibronectinen ^[101, 102]. Er steuert die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte und die Migration der Zellen sowie in Tumorzellen die Metastasierung ^[136, 137].

Mittels Real-time PCR (s. 3.1.1, Abb. 5) wurden ebenfalls Anstiege der Genexpressionslevel von *HIF1A* (HIF-1 α) und *FOS* (c-fos) gemessen. Wie in einer früheren Arbeit von Spruessel et al. ^[87] beschrieben, zeigten die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und c-fos in ihrer Genexpression in nur wenigen Minuten nach Resektion des Tumorgewebes durch u.a. ischämische Einflüsse einen Anstieg des RNA-Levels. Beide Gene sind ebenfalls maßgeblich an der Steuerung der Angiogenese beteiligt ^[138, 139, 140] und im Falle des c-fos in diversen weiteren Signalwegen wie Proliferation und Metabolismus involviert und durch EGFR-vermittelte Signaltransduktion gesteuert ^[60, 141]. Solche Änderungen der Genexpression können, wenn sie sich auf der Proteinebene fortsetzen, ein deutlich verändertes Verhalten der Kultur bei Ischämie sowie den Zellzyklus und Metabolismus beeinflussenden Medikamenten hervorrufen.

Die verschiedenen Analysen auf Gen-Ebene mittels Microarray und Real-time PCR zeigten deutlich die heterogenen Veränderungen dieser Langzeit-Kulturen sowohl innerhalb der gesamten Genexpressionsmuster als auch anhand einzelner Gene. Wegen der Expressionsänderungen auf Gen-Ebene können, wie anhand CEA und EGFR exemplarisch bestätigt (s. 3.1.1, Abb. 6), ebenfalls entsprechende Veränderungen auf Protein-Ebene angenommen werden. Es sind Änderungen im Phänotyp und den physiologischen Reaktionen der Kultur zu vermuten, da solche Expressionsänderungen von verschiedenen Gruppen bereits als maßgeblich für die Identität und Reaktionsfähigkeit von kolorektalen Karzinomen beschrieben wurden ^[26, 27, 132]. Die molekularen Änderungen betreffen demnach Gene bzw. Proteine, die in eine Vielzahl an zellulär wichtigen Prozessen involviert sind. Dies bestätigt Ergebnisse, die gezeigt haben, dass diverse Signalwege in Zelllinien im Vergleich mit Tumor- oder Normalgewebe veränderte Muster aufweisen ^[94, 123, 125]. Diese heterogene und zellübergreifende Instabilität könnte eventuelle weitere Analysen behindern und Ergebnisse verfälschen. Die gleichzeitigen Änderungen der Kultureigenschaften sowie der Verlust der Zellheterogenität lassen eine Übertragung analytischer Ergebnisse auf Ursprungstumore nur sehr eingeschränkt zu. Durch Klonierung wurde der Genotyp und Phänotyp noch weiter verändert, wie separate Analysen an A413-Klonen gezeigt haben (weitere bei Indivumed GmbH durchgeführte Experimente). Diese Ergebnisse ließen in weiteren verwendeten Langzeit-Kulturen ähnlich starke und die Expressionseigenschaften beeinflussende Veränderungen vermuten, da durch mikroskopische Analy-

sen und Immunfluoreszenzfärbungen ebenfalls Veränderungen der Kulturzusammensetzungen und des Wachstums beobachtet wurden. Langzeit-Kulturen primärer Zellen und die Zelllinie HT29 wurden, da sie eine Verwendung sehr großer Zellmengen ermöglichen, im Folgenden nur für methodische Etablierungen verwendet.

Kurzzeit-Kulturen primärer Zellen

Um in primären Zellen durch lange Kulturzeiten auftretende Expressionsänderungen zu umgehen, wurde die Kultivierung auf wenige Tage verkürzt und keine Passagierung durchgeführt (Kurzzeit-Kultur). Nach der Vielzahl an Optimierungsschritten und methodischen Vergleichsanalysen an über 100 Patientengeweben zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen (s. 3.1.2.1, Abb. 10) deutlich heterogenere Zellpopulationen als in Langzeit-Kulturen. Morphologisch unterschiedliche Epithelzellen und ein geringer Fibroblastenanteil bilden mit ebenfalls unterschiedlicher Proliferation genauer als Langzeit-Kulturen und Zelllinien kolorektale Tumore ab. Da neben den epithelialen Tumorzellen ebenfalls die Fibroblasten des Tumorstromas einen Einfluss auf die Interaktion der verschiedenen Tumorbereiche, auf die Metastasierung, die Reaktionen auf Medikamente und auf die Neo-Angiogenese besitzen ^[105, 106], wurde ihr Anteil in der Zellpopulation zwar gering gehalten, jedoch nicht eliminiert. Zur Durchführung von IC₅₀-Analysen ist eine stabile Vitalität über einen Zeitraum bis mindestens 96h notwendig ^[142], um die Effekte auf Vitalität und Apoptose-Induktion durch Medikamente untersuchen zu können ^[71, 128]. Ein solcher Zeitrahmen wurde, wie die ATP-Analysen unter 3.1.2.1 zeigten, in über 50% der Kulturen erreicht.

Durch die Aufarbeitung wurde eine Durchmischung verschiedener heterogener Zelltypen möglich. Dadurch konnten eine annähernd gleichmäßige Verteilung der primären Zellen erreicht und durch zusätzliche Zwei- oder Dreifachbestimmungen in sämtlichen Methoden zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Gleichzeitig war eine Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen in solchen Mengen möglich, dass eine Vielzahl an Analysen durchführbar war: RNA-Analysen, Immunhistologie und -fluoreszenz sowie die Anwendung eines multi-funktionellen ELISA. Dadurch wurden Genexpressionsuntersuchungen sowie Analysen weiterer zellulärer Parameter wie Apoptose, Proliferation, Expressionsuntersuchungen einzelner Proteine möglich.

Um neben diesen phänotypischen Merkmalen die molekularen Expressionsmuster wie bei der Langzeit-Kultur der A413 zu analysieren und festzustellen, welchen Einfluss die Isolierung der Zellen aus dem Gewebe und die anschließende Kurzzeit-

Kultivierung bis 72h auf primäre Zellkulturen hat, wurden Microarray-Analysen (Affymetrix, s. 3.1.3) durchgeführt und die Zelllinie HT29 als Vergleich eines bestehenden gut charakterisierten Zellsystems mit vermessen.

In der PCA-Analyse, dem Hierarchischen Cluster sowie in der Korrelationsanalyse wurden die Ähnlichkeiten bzw. die Korrelation der Expressionsmuster zueinander bestimmt. Die Expressionsmuster der sieben Ursprungsgewebe zeigten deutlich die individuellen Charakteristika der Tumore, was die Ergebnisse verschiedener Studien bestätigt [68, 123, 124]. Passend zu Studien über verschiedene Zelllinien [68, 122, 124] konnte auch hier bestätigt werden, dass jeder Patient und erst recht jede Zelllinie wie die HT29 nur einen kleinen Bereich der möglichen Genexpressionsmuster kolorektaler Karzinome abdecken. Es kann vermutet werden, dass bei weiteren Patientengeweben weitere ebenfalls individuelle Genexpressionsmuster auftreten werden, die die Komplexität und die Heterogenität der Messdaten des zugrunde liegenden Tumortyps erweitern. Die Notwendigkeit bei Analysen sowohl die spezifischen Merkmale einzelner Patienten zu berücksichtigen als auch durch Verwendung großer Gruppen die gesamte Komplexität dieser Tumorerkrankung widerzuspiegeln, wird dadurch untermauert und kann nicht durch wenige Zelllinien wie die HT29 erreicht werden. Änderungen in den Genexpressionsmustern wurden nur zu geringem Anteil durch die Isolierung verursacht. Die Genexpressionsänderungen nahmen hingegen über die Kultivierungszeit zu und waren ebenfalls individuell unterschiedlich und verschieden stark ausgeprägt. Diese individuellen Veränderungsmuster korrespondieren mit Analysen von Sandberg et al. [123] und Stein et al. [125]. Da bei der Isolierung und In-Kulturnahme die primären Zellkulturen sich an die neue Umgebung und die künstlichen Kulturbedingungen anpassen mussten und diese prinzipiell nicht mit denen im Originaltumor identisch sein können, waren zwangsläufig Änderungen der Genexpression, die das Überleben der Zellen steuern, zu erwarten. Die entsprechend aufgetretenen Änderungen betrafen, wie in 3.1.3 Abb. 21 gezeigt, Gene, die durch die KEGG-Einteilung in die zellulären Prozesse des Stoffwechsels, Zellzyklus und der Proliferation sowie des Überlebens bzw. der Apoptose von Zellen und Zellverbänden eingeordnet werden. Dazu gehörten, exemplarisch in 3.1.3 Tab. 14 aufgeführt, *IL8*, *IL18* und *PLAUR* (uPAR), die in sämtlichen primären Zellkulturen bis 72h signifikant höher exprimiert wurden und an folgenden Funktionen beteiligt sind. *IL8* und *IL18* sind Bestandteil von Entzündungs- und Überlebensreaktionen. Es wird von verschiedenen Gruppen diskutiert, ob eine erhöhte Expression von *IL8* mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung des kolorektalen Karzinoms verbunden ist [111, 143] und ob

es sich bei *IL18* um ein „anti-Tumor Protein“ handelt oder es umgekehrt mit dem Tumorwachstum korreliert ^[112, 144]. uPAR steuert den Abbau von Zelloberflächenproteinen und den Zellzusammenhalt im Gewebe sowie die Zellproliferation, Migration und Differenzierung ^[101, 136, 137]. Da sich jede dieser *In vitro*-Kulturen an ein Wachstum mit deutlich geringeren Zell-Zell-Kontakten anpassen musste, könnte eine verstärkte Expression von *PLAUR* den Abbau von Proteinen des Zellzusammenhalts und der Zelladhäsion gefördert haben und bei der Herstellung von Zellkulturen eine zwangsläufige Veränderung sein.

Da es sich jedoch insgesamt nur um 3,33% der Gene handelte und der Anteil an den ihnen zugrunde liegenden zellulär relevanten Gruppen jeweils weniger als 1% betrug, wurde der Einfluss auf das Zellkulturverhalten im Folgenden vernachlässigt. Da darüber hinaus weder die in diversen zellulären Prozessen relevanten Gene, die in der Langzeit-Kultur A413 als verändert identifiziert wurden, noch die in zelluläre Signalwege involvierten Gene des MAPK- (*MAPK1* (ERK 1/2)) ^[19, 30] sowie des Akt-Signalweges (*AKT* und *GSK3B*) ^[119, 145] Expressionsänderungen aufwiesen, wurden die Kurzzeit-Kulturen primärer Zellen als geeignet eingestuft, die jeweiligen individuellen Ursprungstumore zu repräsentieren. Diese Signalwege steuern u.a. eine Signalweiterleitung unterhalb des EGFR ^[8, 9] und können, wie von Vogelstein et al. ^[115] und Cohen et al. ^[64] beschrieben, für die Reaktionsfähigkeit auf Medikamente verantwortlich sein. Dies bestätigt die Erkenntnisse verschiedener Forschungsgruppen, die Kurzzeit-Kulturen allgemein im Vergleich zu Zelllinien und Langzeit-Kulturen als besser geeignete Grundlage für Analysen der Tumorforschung und Medikamententests erörtern ^[127, 129]. Inwieweit sich dieses Kultursystem für Medikamententest einsetzen lässt, wird unter 4.2 diskutiert.

Dreidimensionale organoide Systeme

Wie verschiedene Studien an anderen Gewebetypen gezeigt haben ^[75, 76, 107], spielt der dreidimensionale Zellaufbau bei der Reaktion auf Medikamente eine wichtige Rolle. Von verschiedenen Arbeitsgruppen werden hierfür Methoden wie die Agarose-Kolonie-Kultur ^[146, 147, 148] oder Sphäroid-Kultur ^[72, 73] getestet. Sie basieren auf in Monolayer wachsenden Zellkulturen, die zu einem dreidimensionalen Wachstum angeregt werden. Allerdings ist die Agarose-Umgebung für die Behandlung mit Medikamenten und Anwendung multipler Analysetechniken wenig geeignet und Sphäroide konnten, wie in 3.1.2.2 gezeigt wurde, nicht mit den primären Zellen von Kurzzeit-Kulturen aus kolorektalen Tumoren gewonnen werden. Die Methode der

Sphäroid-Herstellung wurde daher in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Als dreidimensionales System wurde stattdessen die Kultur von Gewebeschnitten entwickelt. Der Erhalt des originalen Gewebeaufbaus war hierbei gegenüber dreidimensionalen Systemen auf Basis von Zellkulturen, wie den Sphäroiden, der ausschlaggebende Vorteil. Unterschiedliche Techniken sind zur Herstellung von kultivierbaren Gewebeschnitten für verschiedene andere Gewebetypen beschrieben ^[76, 77, 78, 149].

Nach der Vielzahl an Optimierungsschritten und methodischen Vergleichsanalysen an über 50 Patientengeweben zeigten die IHC-Färbungen (s. Abb. 15), dass die organo-typischen epithelialen Bereiche aus Normal- und Tumorgewebe erhalten blieben. Mit dem ebenfalls enthaltenen Stromagewebe ist darüber hinaus berücksichtigt, dass dieses eine wichtige Rolle bei den Reaktionen auf Medikamente und in der Neo-Angiogenese spielen kann ^[105, 106]. Die Gewebeschnitte weisen ebenfalls die für zytostatische Analysen notwendigen proliferierenden Zellen auf, wie durch Ki67-Färbungen (s. 3.1.2.2, Abb. 15) gezeigt. Die Gewebeschnitte konnten, wie anhand der ATP-Analysen unter 3.1.2.2 zu sehen, sogar in über 60% der Kulturen bis 96h stabil kultiviert werden, was, wie zuvor beschrieben, u.a. für IC₅₀-Analysen von Medikamenten ^[142] notwendig ist. Durch die Analysen mit dem Diffusions- und Vitalfarbstoff C22803 (s. 2.3.2.9) wurde eine vollständige Diffusion nach spätestens 9h gemessen und bestätigte, dass die Durchlässigkeit von 400µm-dicken Gewebeschnitten innerhalb kurzer Zeit gegeben ist. Aufgrund dieser Daten, der ATP-Ergebnisse und in Übereinstimmung mit den Analysen von de Kanter et al. ^[74, 76] wurde auf eine effektive Versorgung mit Nährstoffen und Begasung bis ins Innere der Schnitte geschlossen, die die Vitalität der Schnitte aufrecht erhält und weitere Analysen erlaubt. Es war aufgrund der gewonnenen und kultivierbaren Gewebeschnitzahlen – wie bei primären Zellen in Kurzzeit-Kultur – eine Vielzahl an Analysen durchführbar: RNA-Analysen, Immunhistologie und -fluoreszenz sowie die Anwendung eines multi-funktionellen ELISA. Dadurch wurden Genexpressionsuntersuchungen sowie Analysen weiterer zellulärer Parameter wie Apoptose, Proliferation, Expressionsuntersuchungen einzelner Proteine möglich.

Wie die Analysen zum ATP-Gehalt und IHC-Färbungen (s. 3.1.2.2, Abb. 16) zeigten, wiesen die Gewebe verschiedener Patienten sehr heterogene morphologische Strukturen und Grundlevel an ATP auf, was die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bestätigt, die eine starke Individualität der molekulargenetischen Grundmuster in verschiedenen Patientengeweben beobachteten ^[68, 123, 124]. Darüber hinaus bestanden zwischen einzelnen Gewebeschnitten deutliche Unterschiede im morphologischen

Aufbau und ATP-Status, was den inhomogenen und originalen Aufbau eines einzelnen Tumors widerspiegelt. Anders als bei den primären Zellkulturen bleibt die interne Tumorerogenität bei den Schnitten bestehen, was den Vorteil bietet, dass die originalen Zellverbände in jegliche Analysen und Reaktionen einbezogen werden. Gleichzeitig wurden deutlich größere Messschwankungen durch diese Individualität beobachtet. Eine Verwendung von mindestens drei Schnitten pro analytische Probe reichte jedoch aus, um trotz der Patienten-spezifischen Heterogenität der Gewebeschnitte und durch zusätzliche Zwei- oder Dreifachbestimmungen zuverlässige und reproduzierbare Daten zu erhalten.

Neben diesen phänotypischen Merkmalen wurden ebenfalls die Einflüsse der Herstellung und die der anschließenden Kurzzeit-Kultivierung bis 72h auf die molekularen Expressionsmuster mittels Microarray-Analysen (Affymetrix, s. 3.1.3) untersucht und mit denen der primären Kurzzeit-Kulturen verglichen.

In sämtlichen Analysen waren die Gewebeschnitte sowohl nach Herstellung als auch nach Kultivierung den jeweiligen Ausgangsgeweben (OP-Werten) sehr ähnlich. Es bestanden größere Korrelationen zwischen den Genexpressionsmustern der Gewebeschnitte mit den OP-Werten als bei den kultivierten primären Zellkulturen. Die auftretenden Änderungen betrafen, wie in 3.1.3.2 Abb. 21 gezeigt, ebenfalls wie bei den primären Zellkulturen Gene, die durch die KEGG-Einteilung in die zellulären Prozesse des Stoffwechsels, Zellzyklus und der Proliferation sowie des Überlebens bzw. der Apoptose von Zellen und Zellverbänden eingeordnet werden. Dazu gehörten, exemplarisch in 3.1.3.2 Tab. 14 aufgeführt, *IL8*, *ANXA1* (Annexin A1) und die Hitzeschockproteine *HSP1A1/B1*, die in sämtlichen Gewebeschnittkulturen bis 72h signifikant höher exprimiert wurden und an folgenden Funktionen beteiligt sind. *IL8* ist, wie beschrieben, Bestandteil von Entzündungs- und Überlebensreaktionen ^[111, 143]. Annexin A1 hat wie andere Familienmitglieder u.a. Funktionen in der Zellproliferation, der Differenzierung und der Tumorprogression ^[113]. Zusätzlich ist es ein Bestandteil von Anti-Entzündungsreaktionen, durch die letztendlich die Überlebens-Signalwege des Tumors aktiviert werden ^[150]. In kolorektalem Karzinomgewebe wurde schon im Vergleich zu normalem Gewebe eine signifikante Erhöhung des Annexin A1-Proteinlevels festgestellt ^[151]. Die Hitzeschockproteine *HSP1A1/B1* gehören zur Hsp70-Familie und stabilisieren die korrekte Proteinfaltung ^[114]. Ihre Überexpression wurde in verschiedenen Krebstypen beobachtet, was mit einer erhöhten Proliferation verbunden war ^[114]. Wie für die Kultur von primären Zellen galt, dass Änderungen, die u.a. das Überleben der Zellen im Gewebe steuern, zu erwarten

waren, da die Gewebeschnitte sich ebenfalls an die künstlichen *In vitro*-Bedingungen anpassen mussten. Es entfielen bei den Gewebeschnitten jedoch überwiegend Änderungen, die durch Vereinzelung der Zellen hervorgerufen wurden, wie z.B. die stark erhöhte Expression von *PLAUR* in den primären Zellkulturen, das die Zell-Zell-Kontakte und Zellmigration steuert^[101, 136, 137]. Diese sehr geringen Genexpressionsänderungen von nur 0,75% aller detektierten Gene, mit einem Anteil an den ihnen zugrunde liegenden zellulär relevanten Gruppen von jeweils weniger als 0,2%, lassen sich auf die geringeren Eingriffe in den Gewebeverband zurückführen. Da ebenfalls wie in den primären Zellkulturen weder Tumormarker wie *CEACAM5* oder *EGFR* sowie die in der Langzeit-Kultur A413 signifikant veränderten Gene noch Gene der Signaltransduktionswege Genexpressionsänderungen aufwiesen, wurde die Gewebeschnittkultur ebenfalls als geeignet eingestuft. Die größere Stabilität der Genexpression in Gewebeschnitten gegenüber primären Kurzzeit-Kulturen bestätigt die Erkenntnisse verschiedener Forschungsgruppen^[75, 76, 107]. Die Einbeziehung der Dreidimensionalität kolorektaler Tumore stellt ein wichtiges Kriterium dar, damit die jeweiligen individuellen Ursprungstumore abgebildet werden. Die Einsetzbarkeit dieses Kultursystems für Medikamententest wird im Vergleich mit primären Kurzzeit-Kulturen unter 4.2 diskutiert.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen des Abschnitts 4.1

Als kolorektale Karzinome repräsentierende *In vitro*-Kultursysteme für Medikamententests können Kurzzeit-Kulturen eingesetzt werden. Primäre Zellen und Gewebeschnitte erlauben den Erhalt von für multiple Analysen ausreichenden Mengen. Sie weisen eine hohe morphologische Heterogenität auf, die mit der der jeweiligen Ursprungsgewebe besser übereinstimmt als bei Langzeit-Kulturen oder Zelllinien^[94], wobei die Gewebeschnitte zusätzlich den organoiden Aufbau berücksichtigen. Beide Kurzzeit-Kultursysteme sind bis 96h stabil kultivierbar, wobei aus 20% mehr Patienten Gewebeschnitte erfolgreich kultiviert werden konnten. Sie weisen darüber hinaus bis 72h genügend stabile Expressionsmuster im Vergleich zu den Ursprungsgeweben auf, was ebenfalls auf eine Übertragbarkeit auf die individuellen kolorektalen Karzinome schließen lässt. Auch hier schneiden die Gewebeschnittkulturen besser ab als die primären Zellen, da ihre Genexpressionsmuster weniger Veränderungen erfahren. Die große Bandbreite an einsetzbaren analytischen Methoden erlaubt die Etablierung einer Medikamententestplattform für eine Anwendung an beiden Kurzzeit-Kultursystemen. Für die methodischen Etablierungsschritte wurden je-

doch die Langzeit-Kulturen und die Zelllinie HT29 eingesetzt, da sie große Materialmengen für vergleichende Etablierungsversuche zur Verfügung stellten und eine Übertragbarkeit auf kolorektale Tumore nicht absolut notwendig war.

4.2 Etablierung und Evaluierung einer multi-funktionellen Medikamententestplattform

Die Entwicklung einer Medikamententestplattformen muss umfassende Analysen der durch Medikamente beeinflussten Signalwege beinhalten, um das individuelle Therapiedesign zu klären und im Einzelnen zu verbessern, wie u.a. von Azzariti et al. [24] dargelegt wurde. Hierzu gehören die Proliferation, die durch zytostatisch wirksame Medikamente beeinträchtigt wird [79], sowie die Vitalität und Apoptose, die z.B. durch DNA-Schäden der alkylierenden Zytostatika und den daraus resultierenden Zellzyklusstopp induziert wird [9, 12, 15]. Eine Messung von Signaltransduktionseffekten ist deshalb wichtig, da dadurch die Wirkungswege von Medikamenten genauer aufgeklärt werden können. Über diese Signaltransduktionswege, die zu einem großen Teil aus Phosphorylierungskaskaden bestehen, werden der Zellzyklus, die Proliferation, das Überleben und die Apoptose gesteuert [19, 20, 21]. Therapeutika wie spezifische Kinase-Inhibitoren und Rezeptor-Antagonisten wirken direkt auf diese Wege ein und können in Kombination mit anderen die zytostatischen Wirkungen verstärken.

Die ausgewählten und etablierten Methoden (3.2.1.1 & 3.2.1.2), anhand der Zelllinie HT29 gezeigt (Abb. 22 - Abb. 29) und jeweils an primären Zellen und Gewebeschnittkulturen kontrolliert, ermöglichten mit hoher Sensitivität und Spezifität Analysen zu Vitalität der Kulturen, zur Proliferation, zur Apoptose-Induktion und zur Aktivität (Phosphorylierung) der Signaltransduktionswege.

Ein ATP-Assay auf Chemilumineszenzbasis wurde zur Vitalitätsbestimmung verwendet [152, 153] und lieferte reproduzierbare Messwerte. Dasselbe galt für die Chemilumineszenzmessung der aktivierten Caspasen 3/7, die häufig als Apoptose-Indiz herangezogen werden [154, 155]. Die Kontrollzellen, in denen mit Staurosporin nach diversen Vortests an verschiedenen Zelllinien die Apoptose induziert wurde [116, 156], bestätigten anhand von Immunfluoreszenzfärbungen den Eintritt in die Apoptose durch die Identifizierung von apoptotischen Zellen, die positiv für die aktive Caspase 3 waren. Durch die Verwendung eines multi-funktionellen ELISA mit Multi-Spot-System (MSD) wurde die sensitive und reproduzierbare Bestimmung von mindestens 12-24

verschiedenen Proteinlevel (absolute Proteinmengen und Phosphorylierungsstatus) in nur 18-30µg Proteinlysate etabliert.

Die Bestimmung von proliferierenden Zellen in der Zellkultur erfolgte für eine hohe Sensitivität und Spezifität durch Inkubation mit dem Uracilanalogen BrdU ^[157, 158], das anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, wenn diese in Vorbereitung zur Zellteilung innerhalb der Synthese-Phase des Zellzyklus verdoppelt wird. Durch die etablierte immunhistologische Fluoreszenzfärbung wurden leicht übereinander wachsende Zellen und unterschiedlich große sowie intensiv gefärbte Zellkerne erkennbar, die möglicherweise auf verschiedenen Chromosomensätzen basieren ^[71]. Trotzdem wurde durch das Generieren von Masken ermöglicht, in einer Zellkultur die positiv gefärbten Zellen einzeln zu zählen und über ihr Verhältnis zur Gesamtzahl die Proliferationsstärke der Kulturen einzuordnen. Bei Gewebeschnitten wurden proliferierende Zellen statt mit BrdU durch die Expression und Kernlokalisierung des Proliferationsmarkers Ki67 identifiziert ^[108, 159], wie während der Etablierung der Kulturbedingungen (s. 3.1.2.2) gezeigt. Durch Ermittlung der notwendigen Mehrfachbestimmungen für Reproduktionsversuche stand durch diese Auswahl ein Kontingent spezifischer und sensibler Messmethoden zur Verfügung, die mit allen Kultursystemen in kleinem Maßstab – geringen Zell- bzw. Schnittzahlen – durchführbar waren.

Die weitere Auswahl geeigneter Medikamente und Kombinationen wurde anhand der Zelllinie HT29 vorgenommen und an primären Zellen und Gewebeschnitten kontrolliert. Aufgrund ihres Status als Standardtherapie im kolorektalen Karzinom wurden die feste Kombination 5-Fluorouracil mit Leucovorin (5-FU / L) ^[13, 14, 160, 161] und Oxaliplatin (Oxa) ausgewählt, da es im letzten Jahrzehnt in der Therapie des Kolorektalkarzinoms zugelassen wurde. Die verwendete Kombination von Oxaliplatin mit 5-FU / L (= FOLFOX) wird in fortgeschrittenen klinischen Studien analysiert ^[33, 34] sowie ebenfalls standardmäßig verwendet. FOLFOX stand hier für die generelle Kombination dieser drei Substanzen, die parallel und einmalig zugeführt wurden, und berücksichtigte nicht die unterschiedlichen therapeutischen Zuführungsarten am Menschen (oral, bolus oder intravenös) ^[54, 162], Reihenfolgen und Konzentration, die z.B. in die Therapieformen FOLFOX-4 und -6 unterteilt werden ^[117, 163]. Neben diesen Standardmedikamenten wurde stellvertretend für die Gruppe der Kinase-Inhibitoren Gefitinib (Iressa[®]) verwendet, der spezifisch gegen den EGFR gerichtet ist und die Signalweiterleitung des Wachstumsrezeptors blockiert ^[16]. Er wurde im letzten Jahrzehnt jedoch hauptsächlich beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) angewendet und im kolorektalen Karzinom bislang nur selten getestet ^[16]. In verschiede-

nen präklinischen und klinischen Studien wird Iressa[®] mittlerweile als Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit einer FOLFOX-Therapie (= IFOX) untersucht [9, 15]. Dieser Inhibitor wurde zur Etablierung der Medikamententestplattform ebenfalls einzeln und als IFOX-Kombination eingesetzt. Als ein weiteres Zytostatikum, das jedoch hauptsächlich bei Prostata- und Lungentumoren (NSCLC) Verwendung findet, wurde Gemcitabin benutzt und einzeln bzw. in Kombination mit FOLFOX (= GOLF) eingesetzt. Dessen Verwendung beim kolorektalen Karzinom ist bislang nur wenig beschrieben, so z.B. von Caraglia et al. [118], weshalb die Einsatzkonzentration aus der Literatur übernommen wurde. Aufgrund der Vortests unter Verwendung der Zelllinie HT29 (s. 3.2.1, Abb. 22 - Abb. 29) wurden die jeweiligen Dosierungen und die Behandlungszeiträume von 24h, 48h, und 72h festgelegt, da in dieser Zeit Effekte in den unterschiedlichen und zuvor erläuterten zellulären Signalwegen messbar waren und in diesen Zeiträumen eine spätere Anwendung an den Kurzzeit-Kulturen primärer Zellen und Gewebeschnitten ermöglicht wurde.

Zur endgültigen Etablierung der Medikamententestplattform (s. 3.2.1.3) wurden sämtliche zuvor getesteten Methoden unter Berücksichtigung aller Behandlungs- und Messkontrollen integriert. Die an der Zelllinie HT29 und den drei primären Langzeit-Kulturen A413, A806 und B429 durchgeführten Medikamententests ergaben unterschiedliche und voneinander abweichende Effekte einzelner Medikamente bzw. Kombinationen. Durch die multi-funktionelle Plattform ist es im kleinen Maßstab gelungen, diese Informationen parallel und daher direkt vergleichbar zu gewinnen. Die FOLFOX-Kombination wies deutliche Synergieeffekte der Einzelkomponenten auf, was sich besonders in Vitalität und Apoptose zeigte (s. Abb. 30). Dies bestätigt die synergistischen Effekte von 5-FU und Oxaliplatin, die u.a. von Patel et al. beschrieben wurden [33]. Anders als 5-FU / L verursachte Oxaliplatin als Einzelsubstanz zusätzlich eine deutliche Reduktion der proliferierenden Zellen, wie durch die BrdU-Färbung zu sehen ist (s. Abb. 31). Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein [164, 165]. Die geringeren Effekte von 5-FU / L auf die Vitalität, Apoptose und Proliferation könnten darin begründet sein, dass die durch beide Therapeutika blockierte Thymidylatsynthase gegenreguliert wird und dadurch Resistenzen auftreten. Dieser Resistenzmechanismus ist bei Zelllinien des kolorektalen Karzinoms, u.a. den HT29, und auch tatsächlichen Tumoren weit verbreitet, wie verschiedene Gruppen zeigen konnten [166, 167, 168]. Dies stellt einen der Gründe dar, dass zusätzlich mit Oxaliplatin behandelt wird, um die Synergieeffekte zu nutzen.

Die Einzelbehandlung mit Iressa[®] hingegen bestätigte die sehr kontroverse Diskussion über dessen Wirksamkeit. Mittels verschiedener durchgeführter Western Blot-Analysen (nicht gezeigte zusätzlich durchgeführte Experimente) konnte die sehr effektive Phosphorylierungsinhibition des EGFR verschiedener Studien bestätigt werden ^[16, 24, 169]. Iressa[®] ist in der Lage, die Phosphorylierung des Rezeptors sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand innerhalb von 10-20 Minuten und einer Konzentration von 0,75µM zu blockieren. Es wurde jedoch ebenfalls beobachtet, dass dieser Effekt auf EGFR nach weiteren 10-20 Minuten wieder zurückging, was ein Grund für die geringen zellulären Effekte sein könnte. In vielen Studien über Lungentumoren aber auch in kolorektalen Karzinomen wurden darüber hinaus Mutationen und Mechanismen identifiziert, durch die entweder der EGFR selbst gegen die Inhibition resistent wurde ^[8, 170] und / oder die Inhibition durch nachfolgende Regulatoren wie möglicherweise Ras gegenreguliert wurde ^[9, 64]. Ein Indiz für eine nachfolgende Inhibition war in den Western Blots (zusätzliche Experimente), dass die Inhibition des Rezeptors anders als die Stimulation mit EGF nicht bis zur Kinase ERK 1/2 reichte. Im Medikamententest verursachte die Iressa[®]-Behandlung weder eine signifikante Änderung der ATP-Level, der Proliferation, der Apoptose noch in den Leveln der Signaltransduktionskinasen. Die IFOX-Kombination zeigte im Vergleich zu FOLFOX keine eindeutigen Synergieeffekte, was ebenfalls auf die geringe Wirksamkeit von Iressa[®] zurückzuführen war. Nur der Level von pAkt (s. Abb. 32) zeigte durch Iressa[®]-Behandlung eine ansteigende Tendenz. Dies deutet auf die Beteiligung dieses Signalweges mit Akt als zentrale Regulationskinase hin. Allerdings sind die Akt nachfolgenden Proteine GSK-3β und P70s6K nicht durch Iressa[®] beeinflusst. Dies macht dringend notwendig, mehr über Resistenzen und die genauen Abläufe und Signalwege, auf die ein Medikament einwirkt, sowie die Wirkungszusammenhänge bei Kombinationen herauszufinden. Es könnten im Akt-Signalweg Mutationen oder anderweitige genetische Polymorphismen verborgen sein, die die Kulturen gegen Iressa[®] trotz kurzfristiger positiver inhibierender Funktion des EGFR unempfindlich oder sogar resistent machen. Mutationen und veränderte Phosphorylierungsaktivität mit entsprechenden Folgen auf die Wirksamkeit von Medikamenten wurde für Akt und seinen Signalweg u.a. von Jhawer et al. ^[31] beschrieben. Sabbah et al. ^[171] sieht darüber hinaus einen Zusammenhang mit der „EMT“ („epithelial-mesenchymal transition“) von zellulären *In vitro*-Kulturen. Die Zulassung von Iressa[®] ist inzwischen in Deutschland (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM ^[172]) wieder zurückgezogen worden. Eine Identifizierung

von für Resistenzen verantwortlichen Mutationen unterhalb des EGFR und eine Entwicklung von Inhibitoren gegen entsprechende verantwortliche Kinasen könnte eine Anwendung von Iressa[®] in einer Kombination mit solchen Inhibitoren jedoch möglicherweise wieder erlauben.

Das Zytostatikum Gemcitabin bestätigt den u.a. von Jacob et al. [172] und Kleespies et al. [174] beschriebenen erheblichen Effekt auf die Proliferation von Zellen. Nur in der Zelllinie HT29 nach 24h führte die Behandlung zu keinem vollständigen Verlust an proliferierenden Zellen. Die geringere Sensitivität der Zelllinie HT29 könnte darin seine Ursache haben, dass sich Zelllinien genetisch von den Ursprungstumoren entfernt haben und Mutationen und Resistenzen erwerben können, wie Lee et al. [141] und Wang et al. [175] zeigen konnten. So zeigt die Zelllinie HT29 bei pGSK-3 β bei allen Behandlungen außer Iressa[®] deutlich erhöhte Level. Die verstärkte Phosphorylierung von GSK-3 β verursacht eine starke Inhibierung des Proteins und somit keine Reduzierung der Translation oder des Stoffwechsels und eine Unterdrückung der Apoptose-Induktion [176, 177].

Auffällig stark war die für die Anwendung am kolorektalen Karzinom neue Kombination GOLP. Sie wies gegenüber FOLFOX nicht nur bezüglich der Proliferation sondern auch beim Abfall der ATP-Level, der Apoptose-Induktion durch Caspase 3/7-Aktivierung und bei den meisten Signaltransduktionsproteinen (absolute und Phosphorylierungslevel) erkennbar stärkere und auch zeitlich frühere Effekte auf, was u.a. die Daten von Caraglia et al. [118] in der Zelllinie HT29 bestätigt.

Es war ebenfalls in den Langzeit-Kulturen und besonders in der Zelllinie HT29 nach FOLFOX- und erst recht nach GOLP-Behandlung, wie in Western Blots der HT29 nach 48h (s. 3.2.1.2, Abb. 27) gezeigt, eine erhöhte ERK 1/2-Phosphorylierung sowie ein Expressionsrückgang der Signaltransduktionskinase Akt nach GOLP-Behandlung zu verzeichnen. Einen solchen Phosphorylierungsanstieg des ERK 1/2 mit gleichzeitigem Abfall und Inaktivierung des Akt-Signalweges innerhalb einer Apoptose-Induktion wurde von Moon et al. [178] in Fibrosarkomzellen gezeigt und wurde hier erstmals in kolorektalen Karzinomzellen beobachtet.

Die Zelllinie HT29 erwies sich bei den überwiegenden Assay-Parametern und Behandlungen als am wenigsten empfindlich. Als eine mögliche Ursache kommen durch Klonierung, Langzeit-Kultur und Immortalisierung erworbene Resistenzen in Frage. Erworbene Resistenzen werden bei Zelllinien inzwischen mit der „EMT“ in Verbindung gebracht [179, 180], die bei der phänotypischen Entfernung der Zelllinien vom Ursprungsgewebe eine zentrale Rolle spielt [69, 126]. Der Vergleich mit den

Langzeit-Kulturen A413, A806 und B429 zeigte jedoch trotzdem die oben beschriebenen Wirkungen der verschiedenen Behandlungsvarianten, die mit sehr ähnlichen Tendenzen beobachtet wurden. Die Reaktionen der Zelllinie und der Langzeit-Kulturen waren ähnlich, und trotzdem konnten ebenfalls die individuellen Stärken der Medikamentenreaktionen analysiert werden.

Die Evaluierung der Medikamententestplattform mit den zuvor als geeignet und Tumor-repräsentativ identifizierten Kultursystemen (s. 3.2.2) zeigte ebenfalls wieder erkennbare Effekte von FOLFOX-, Iressa[®]- und der GOLF-Behandlung (s. Abb. 33 - Abb. 35). Ebenso wie in den Langzeit-Kulturen primärer Zellen konnte ein abfallender ATP-Level, absinkende Proliferation und geringere Phosphorylierungslevel von Akt und GSK-3 β durch FOLFOX-Behandlung in den Kurzzeit-kultivierten Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig war ebenfalls ein Anstieg der Caspase 3-Aktivierung als Indiz der Apoptose-Induktion zu beobachten. Die Iressa[®]-Behandlung rief kaum Reaktionen hervor. Dies bestätigt die Ergebnisse von Rosell et al. [29] und Cascinu et al. [181], die für Iressa[®] allein oder auch in Kombination keine Effekte beschrieben. Die Kombination GOLF zeigte FOLFOX vergleichbare, jedoch früher und stärker eintretende Effekte. Diese Grundtendenzen der Medikamentenreaktionen konnten in beiden Kurzzeit-Kulturen beobachtet werden, was die Zuverlässigkeit verdeutlicht, mit dieser Medikamententestplattform grundlegende Reaktionsmechanismen und -parameter bestimmen zu können. Die Immunfluoreszenzfärbungen (s. Abb. 33) der primären Zellen in Kurzzeit-Kultur weisen auf einen charakteristischen Unterschied gegenüber Langzeit-Kulturen hin, der nochmals die Vorteile solcher unpassagierter primärer Zellen hervorhebt. Der Patient A2359 demonstrierte exemplarisch die sichtbar höhere Heterogenität der Kurzzeit-Kulturen im Vergleich zu den Langzeit-Kulturen. Es waren deutlich mehr Fibroblasten vorhanden, die Epithelzellen und ihre Kerne wiesen unterschiedliche Größen auf. Gleichzeitig zeigte sich, dass die durchschnittliche Proliferationsrate der primären Zellen in Kurzzeit-Kultur, die während der Etablierungsphase auf 35% eingeordnet wurde, deutlich geringer war als in den Langzeit-Kulturen, die im Mittel 70% proliferierende Zellen aufwiesen. Zellkulturen mit weniger proliferierenden Zellen, die eher den Anteil im Ursprungsgewebe repräsentieren, werden auf Zytostatika anders reagieren als sehr viel stärker proliferierende Langzeit-Kulturen und somit besser die Reaktion des Originaltumors nachempfinden.

Der Vergleich der Reaktionen der primären Kurzzeit-Kulturen mit der Kultur von Gewebeschnitten zeigte, dass auch dort ähnliche Grundtendenzen der FOLFOX-,

Iressa[®]- und GOLF-Reaktionen zu verzeichnen waren, die Plattform also robuste Ergebnisse lieferte. Die Effekte fielen in den primären Zellen jedoch meist stärker aus als in den Gewebeschnitten, was die Zellkultur und Ursprungsgewebe vergleichenden Analysen von Stein et al. ^[125] und Sandberg et al. ^[123] bestätigt. Diese in Gewebeschnitten geringer ausfallenden Behandlungseffekte betrafen besonders die FOLFOX-Kombination, die hier auch im Vergleich zu GOLF in weniger Analysen zu signifikanten Abweichungen führte oder diese erst deutlich und zeitlich versetzt eintraten, wie bei der Caspase 3-Aktivierung gesehen werden konnte (s. Abb. 34).

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen des Abschnitts 4.2

Die Kurzzeit-kultivierten primären Zellen und die Gewebeschnitte sind dafür geeignet, differenzierte Untersuchungen zu Wirkungsweisen von Medikamenten durchzuführen, Hinweise auf den zeitlichen Wirkungsverlauf zu erhalten und individuelle Patienten-typische Einflüsse festzustellen. Die Kultivierung der Gewebeschnitte sollte jedoch wegen der teilweise auftretenden Messschwankungen und dadurch schwieriger zu treffenden Aussagen über Wirkungseffekte durch weitere Etablierungsschritte optimiert werden. Für die Anwendung der Medikamententestplattform (4.3) wurden deshalb nur Kurzzeit-kultivierte primäre Zellkulturen eingesetzt.

Die kolorektale Zelllinie HT29 zeigte sich als relativ unempfindlich und war, da sie in ihren Genexpressionsmustern nur einen kleinen Bereich abdeckte (s. 3.1.3.1, Abb. 18), nicht geeignet, die große Bandbreite von kolorektalen Tumoren zu repräsentieren. Dies bestätigt die Notwendigkeit, Kurzzeit-Kulturen zu verwenden. Durch ihre bessere Repräsentation der Ursprungstumore werden die gesamte Komplexität dieses Tumortyps und gleichzeitig die individuellen Reaktionen berücksichtigt.

Die weniger empfindlichen Reaktionen der Gewebeschnittkulturen auf die Behandlungen bestätigen nochmals, dass die Berücksichtigung der Dreidimensionalität kolorektaler Tumore im für die Analysen eingesetzten *In vitro*-Kultursystem ein wichtiges Kriterium ist. Ein Grund für die schwächeren Reaktionen könnte u.a. sein, dass wegen der organoiden Struktur die Diffusionsdauer zu einer verzögerten und geringeren Reaktion führt. Ebenso können die genetisch umfangreicheren Änderungen der primären Zellen, die zur Anpassung an die künstlichen Kulturbedingungen erfolgten, diese empfindlicher gegenüber Medikamentenbehandlungen machen ^[123, 125]. Die in den Etablierungsversuchen festgestellte geringe Sensitivität der Zelllinie HT29 auf Therapieansätze wie FOLFOX kann in präklinischen Studien zu falsch-negativen Ergebnissen und damit zu einer zu hohen Dosierung der Medikamente führen. Gleich-

zeitig könnte die größere Sensitivität der Kurzzeit-kultivierten primären Zellen gegenüber den Gewebeschnitten darauf hindeuten, dass umgekehrt möglicherweise falsch-positive Ergebnisse und dadurch zu geringe Dosierungen in den präklinischen Studien identifiziert werden. Bei der Medikamentenzulassung und Aussortierung von nicht wirksamen Medikamenten kann dies ein Grund für unnötig viele und teure Wiederholungsversuche über sämtliche Studien-Stufen sein [54, 58, 59]. Allerdings sollten die vergleichenden Analysen mit größeren Patientengruppen fortgesetzt werden, um die gemessenen Sensitivitätsunterschiede zu überprüfen und die einzelnen Parameter statistisch auszuwerten. Trotz der höheren und möglicherweise durch die Isolierung erworbenen Sensitivität der primären Zellkulturen gegenüber den Gewebeschnitten kann ein Vergleich beider Kurzzeit-Kultursysteme genauere Informationen über die Reaktionsmechanismen von Geweben und Zellsystemen liefern. Ein Vergleich mit hinsichtlich Mutationen und Expressionsmustern gut charakterisierten Zelllinien bietet zusätzlich die Möglichkeit, mehr über die Entstehung von genotypischen Änderungen wie Mutationen bis hin zu phänotypischen Änderungen herauszufinden. Deshalb sollten Zelllinien und Langzeit-Kulturen nicht eingesetzt werden, wenn eine Übertragbarkeit auf Tumore verlangt wird, sie sollten jedoch auf keinen Fall vollständig aus den Analysen ausgeschlossen werden.

4.3 Anwendung der Medikamententestplattform

Die Medikamententestplattform lässt unterschiedliche Anwendungen zu. Als erstes dient sie der Analyse von Medikamentenwirkungen aufgrund multipler Parameter. Sie ermöglicht eine Anwendung in wenigen Stunden bis Tagen anhand von Tumor-repräsentierender Kurzzeit-Kulturen wie primären Zellen und einen Vergleich verschiedener Patienten. Hierfür muss die Plattform robust sein, um wiederkehrende Medikamentenreaktionen wie durch die FOLFOX-Behandlung zuverlässig bestimmen zu können. Um dies zu analysieren, wurden 28 Patientengewebe analysiert, wobei nicht – wie für prospektive Studien notwendig – Einschränkungen der an den Analysen teilnehmenden Patienten bezüglich ihrer klinischen Daten vorgenommen wurden. Dadurch fand eine sehr heterogene Patientengruppe Anwendung. Die Tumoralokalisation im Dickdarm, die Differenzierung und die Tumorstadien sowie die Altersverteilung der Patienten (u.a.) waren sehr inhomogen (s. 3.3.1.1).

Diese Heterogenität wurde neben den klinischen Daten ebenfalls in der Proteinexpression der Tumorgewebe nachgewiesen. Ausgewählt wurden für IHC-Analysen ex-

emplarisch drei Proteine, die mögliche Korrelationen mit einzelnen Behandlungseffekten im Medikamententest aufweisen könnten. Gefärbt wurden der Proliferationsmarker Ki67 ^[108, 159], p53 als ein zentrales Steuerungsprotein in DNA-Reparatur und Apoptose ^[95, 96] und die phosphorylierte Form des mTOR, der in den Akt-Signalweg involviert ist ^[119, 145] und negative Rückkopplungseffekte auslösen kann ^[84, 182]. Diese Auswahl an immunhistologisch gefärbten Proteinen demonstrierte deutlich die individuellen Expressionsmuster der verschiedenen Patienten. Die Morphologie, die Tumorteile und Bereiche mit normaler Schleimhaut, durch mikroskopische Überblicksbilder abgeschätzt, differierten stark. Die Färbung von Ki67, p53 und p-mTOR zeigte eine große Bandbreite von keinerlei Expression über schwache, mittelstarke bis hin zu extrem intensiver positiver Färbung.

Trotz dieser Inhomogenität der analysierten Patientengruppe wurde sowohl die zuvor evaluierte ATP- und Proliferations-verringende als auch Apoptose-induzierende Wirkung von FOLFOX reproduziert. Die Plattform bestätigte somit nochmals, dass repräsentative und zuverlässige Aussagen über Medikamentenreaktionen erhalten werden können. Die Zellkulturen reagierten unterschiedlich sensitiv auf FOLFOX, wie anhand der deutlichen Streuung der verschiedenen Messparameter zu sehen ist (s. 3.3.2). Dies bestätigt die klinischen Ergebnisse verschiedener Studien, die FOLFOX in der Therapie des kolorektalen Karzinoms als unterschiedlich wirksam beschrieben ^[61, 183, 184]. Die größten Unterschiede zwischen den Patienten zeigten sich anhand der teilweisen Verringerung und Erhöhung von pAkt. Dies deutet darauf hin, dass der Akt-Signalweg an der Reaktion der Kulturen auf FOLFOX-Behandlung beteiligt ist. Vogelstein et al. ^[115] und Cohen et al. ^[64] haben u.a. gezeigt, dass Medikamentenreaktionen von der Aktivität der zentralen Signaltransduktionswege wie des MAPK- und Akt-Signalweges abhängig sind. Expressionsänderungen, genetische Polymorphismen und Mutationen von Akt oder im selben Signalweg beteiligter Proteine können Ursachen für unterschiedliche Sensitivität und Resistenzmechanismen sein, wobei für Akt und seinen Signalweg solche Veränderungen mittlerweile in verschiedenen Geweben und Zelltypen beschrieben wurden ^[31, 171].

Um Korrelationen innerhalb der individuellen Reaktionsmuster der Patienten auf FOLFOX zu analysieren und zu ermitteln, ob einzelne Patientengruppen mit signifikant unterschiedlichen Reaktionen auf FOLFOX identifiziert werden können, wurden Klassifizierungs- und Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine statistisch eindeutige Klassifizierung nicht möglich war. Es konnten keine klaren Abgrenzungen der Patienten in unterschiedlich stark reagierende Gruppen

gesetzt werden. Um die Chancen zu verbessern, statistische Aussagen über das Vorhandensein von Klassen und Korrelationen treffen zu können, wurden als weitere Variablen die klinischen Daten und die IHC-Expressionen von Ki67, p53 und p-mTOR hinzugenommen. Es waren jedoch keine eindeutigen Zusammenhänge festzustellen. Es korrelierten weder die verschiedenen FOLFOX-Reaktionen mit den klinischen Daten oder den einzelnen IHC-Färbungen noch die Stärke der IHC-Färbungen untereinander oder mit den klinischen Daten. Zwar wies der Level von pSTAT3 nach FOLFOX-Behandlung eine geringe positive Korrelation mit den Tumorstadien auf, diese war jedoch mit $r^2 = 0,19$ sehr gering. Da dies innerhalb der klinisch heterogenen Gruppe von nur 28 Patienten ein gesondertes Ergebnis darstellen kann, sollte dies an einer homogeneren und / oder größeren Patientenpopulation überprüft und die Analysen fortgesetzt werden.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen des Abschnitts 4.3

Die Heterogenität der eingesetzten Patientenmaterialien untereinander hinsichtlich klinischer Daten und Expressionsmustern der drei IHC-gefärbten Proteine schränkte weder das Vermögen der Medikamententestplattform ein, die zuvor gemessenen FOLFOX-Effekte zu reproduzieren, noch die individuellen Reaktionen der einzelnen *In vitro*-Kulturen der Patienten abzubilden. Diese anhand der klinischen Daten und der IHC-Analyse festgestellte Heterogenität der Patienten und Gewebe durch die Verwendung individueller und die einzelnen Tumore repräsentierender *In vitro*-Kultursysteme für Medikamententests sollte unbedingt berücksichtigt werden. Dass keine Klassifizierung möglich war und keine statistisch eindeutigen Korrelationen identifiziert werden konnten, lag höchstwahrscheinlich an der starken Inhomogenität der Patientenpopulation und an der kleinen Fallzahl von 28 Patienten. Durch homogenere Gruppen könnten auftretende Varianzen reduziert werden und das Auftreten oder Fehlen von Klassifizierungen und Korrelationen mit höherer Eindeutigkeit identifiziert werden. Es ist zu vermuten, dass durch IHC-Analysen mit größerer Wahrscheinlichkeit statistisch signifikante Korrelationen zu entdecken sind, wenn weitere Proteine und somit mehr Variablen analysiert werden. Gleichzeitig steht bei der Medikamententestplattform wegen der Variierbarkeit der analysierten Signalwegproteine u.a. im multi-funktionellen ELISA eine Vielzahl an möglichen weiteren Analysekonzepten zur Verfügung, wodurch ebenfalls weitere Variablen und Parameter zur Messung herangezogen werden können, um die Chancen auf statistisch eindeutige Klassifizierungen von unterschiedlich reagierenden Patientengruppen zu verbessern.

4.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Parallel und unterstützend zur Analyse von Medikamentenwirkungen wird allgemein diskutiert, die individuellen Polymorphismen, Mutationen und Expressionsunterschiede von Genen, die die Reaktionsfähigkeit auf Medikamente beeinflussen können, in Referenzgeweben von *In vitro*-Kulturen zu kontrollieren ^[120, 121]. Verwendet werden zurzeit u.a. Genexpressionsanalysen mit Microarrays, um die individuellen Muster einzelner Tumore mit Reaktionen auf bestimmte Medikamente zu vergleichen und nach Korrelationen zu suchen ^[121]. Die Identifizierung von Zusammenhängen zwischen der Reaktion von *In vitro*-Kultursystemen auf Medikamente und ihrem Mutations- und Genexpressionsstatus sowie der Analyse von Phosphorylierungsmustern und der Proteinexpression in den Referenzgeweben kann neue Erkenntnisse über die komplexen Reaktions- und Resistenzmechanismen von Tumorzellen und -geweben auf Zytostatika, Kinase-Inhibitoren und Rezeptorantagonisten fördern.

Die IHC-Analyse einzelner Proteine und die Einbeziehung der klinischen Daten stellt eine Möglichkeit dar, mit der parallel durchgeführten Medikamententestplattform Patienten hinsichtlich ihrer Reaktion auf Medikamente zu klassifizieren und Korrelationen zwischen sämtlichen Parametern sowie mit einer Klasseneinteilung zu identifizieren. Eine solche Vorgehensweise hat erstens eine Identifizierung von neuen prognostischen Markern sowie die Entwicklung neuer Therapeutika gegen diese Marker zum Ziel. Zweitens möchte man so neue Therapiekonzepte und Kombinationen erarbeiten, z.B. die Gabe von multiplen Kinase-Inhibitoren in Kombination mit Zytostatika. Die Analyse der Tumore hinsichtlich solcher Marker hat die Zielsetzung, im Vorwege einer medikamentösen Therapie Voraussagen über den Behandlungserfolg treffen zu können. Dadurch würden für jeden Patienten nur die Erfolg versprechenden Medikamente und Kombinationen verwendet. Eine solche individuelle Therapie könnte zum einen die Behandlungserfolge durch Minimierung der erfolglosen Therapeutikagaben samt Nebenwirkungen optimieren und zum anderen die Kosten der Behandlung reduzieren ^[185].

Eine Fortsetzung der Analysen dieser Arbeit mit größeren und homogeneren Patientengruppen, die Einbeziehung der entwickelten Medikamententestplattform anhand der Tumor-repräsentierenden Kurzzeit-Kulturen könnte dazu beitragen, die präklinischen Analysen über Medikamentenwirkung, Markern zur Früherkennung und neuer therapeutischer Ansätze zur Entwicklung von individuellen Therapien zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Eine der zentralen Aufgaben der Tumorforschung ist die Entwicklung von wirksamen Therapeutika zur Tumorthapie. In präklinischen Analysen werden hierfür überwiegend Zelllinien als Grundlage verwendet. Verschiedene Studien zeigen jedoch, dass eine effektive Übertragbarkeit von Messergebnissen auf Tumore nicht gewährleistet ist, da durch ihre Gewinnung ein Verlust genetischer und biochemischer Tumortypischer Merkmale und Charakteristika eintritt.

Die Identifizierung von *In vitro*-Kultursystemen des kolorektalen Karzinoms, die Ursprungstumore repräsentieren, war daher die erste Aufgabe dieser Arbeit. Verschiedene Kultursysteme wurden etabliert und dahingehend untersucht, ob sie für Medikamententests verwendet werden konnten. Langzeit-kultivierte primäre Zellen entfernten sich zunehmend mit der Passagenzahl vom Zustand des Ursprungstumors. Kurzzeit-kultivierte primäre Zellen hingegen zeigten deutlich höhere Stabilität und bestanden aus heterogenen, den Ursprungstumor genauer entsprechenden Zellpopulationen. Dasselbe galt für die Kultur von Gewebeschnitten, die zusätzlich die dreidimensionale Struktur der Tumore berücksichtigte. Durch beide zuletzt genannte Kultursysteme konnten auf Ursprungstumore übertragbare Daten gewonnen und in Medikamententests die Eigenschaften individueller Tumore mit einbezogen werden.

Auf Basis dieser beiden *In vitro*-Kultursysteme wurde im zweiten Teil der Arbeit eine Medikamententestplattform entwickelt. Die Wirkungen mehrerer Medikamente auf Vitalität, Proliferation, Apoptose und ausgewählte Proteine der Signaltransduktionswege konnten parallel, stabil und reproduzierbar an geringen Zell- und Gewebemengen gemessen werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Analysen zur Anwendbarkeit der Medikamententestplattform in der Tumorforschung begonnen. Trotz der sehr heterogenen Patientengruppe konnten auf Basis von primären Zellen die Effekte der Medikamentenkombination FOLFOX reproduziert und gleichzeitig individuelle Unterschiede in Reaktionsmustern festgestellt werden. Klassifizierungsmuster und signifikant eindeutige Korrelationen konnten jedoch nicht identifiziert werden. Eine Fortsetzung dieser Analysen mit homogeneren Gruppen und größeren Fallzahlen könnte solche Identifizierungen jedoch ermöglichen. Dies könnte die Suche nach Tumor- und Resistenzmarkern als neue Angriffsziele für Medikamente und somit die Entwicklung von individuellen Therapien verbessern.

6 Summary

A central task of tumor research is the development of effective therapeutics for tumor therapy. Preclinical analysis is predominantly based on established cancer cell lines. However, several studies show that analysis data won from cell lines can not readily be translated to tumors in situ, since a loss of genetic and biochemical tumor-typical characteristics occurs during cell line establishment and cultivation.

Identifying *in vitro* culture systems representing original tumor tissue is the first task of this thesis work. Different culture systems of colorectal carcinoma were established and surveyed to examine feasibility for use in drug testing. Primary cells in long-term culture increasingly departed from the tumor origin. However, the short-time cultures of primary cells showed clearly higher stability and consisted of heterogeneous cell populations which better reflected the origin tumor. This was the same for the culture of tissue slices, which considered the three-dimensional structure of the tumors in addition to the heterogeneous cell populations. By both last-mentioned culture systems analysis data transferable to tumors in situ could be obtained and included the individuality of the tumors in drug testing.

Based on these two *in vitro* culture systems a drug testing platform was developed in the second part of this thesis work. The effects of several drugs on viability, proliferation, apoptosis and selected proteins of signal transduction pathways could be stably and reproducibly analyzed in parallel on small cell and tissue samples.

For the third part of this thesis work the applications of the drug testing platform in the cancer research was begun. In spite of the very heterogeneous group of patients the effects of the drug combination FOLFOX could be reproduced in primary cells. Simultaneously, individual differences of drug reaction patterns could be determined. However, a classification in reference to these patterns as well as significantly reliable correlations of all data could not be identified. An expansion of these analysis to more homogeneous groups and larger numbers of cases could allow such identifications. Additionally, the drug testing platform could be promoted the discovery of tumor markers and markers involved in resistance pathways used as new targets for drugs and therefore considerably improve the development of individual therapies.

7 Referenzen

1. World Health Organization, www.who.int/en/, 2008.
2. Robert-Koch-Institut, www.rki.de, 2008.
3. Deutsches Krebsforschungszentrum (dkfz), www.dkfz.de, 2008.
4. Reuter P. Springer Lexikon Diagnose & Therapie. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg 2006; 757-760.
5. Baustein C, Roller S, Voltz R. Leitfaden Palliativmedizin / Palliative Care. Urban & Fischer, München 2007 (3. Auflage); 269-285.
6. NCI, www.cancer.gov, 2008.
7. Schlag PM. Kolorektaler Rezidivtumor, Früherkennung und Therapie. In: Der Onkologe. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg 1998.
8. Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, Coldren C, Baro A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna J, Bunn Jr. PA. (2006). Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin Cancer Res*; 12:7117-7125.
9. Loeffler-Ragg J, Skvortsov S, Sarg B, Skvortsova I, Witsch-Baumgartner M, Mueller D, Lindner H, Zwierzina H. (2005). Gefitinib-responsive EGFR-positive colorectal cancers have different proteome profiles from non-responsive cell lines. *Eur J Cancer*; 41:2338-2346.
10. Vousden KH, Lu X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*; 2:595-604.
11. Igney FH, Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*; 2:277-288.

12. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2008.
13. Mini E, Trave F, Rustum YM, Bertino JR. (1990). Enhancement of the antitumor effects of 5-fluorouracil by folinic acid. *Pharmacol Ther*; 47:1-19.
14. Borner MM, Castiglione M, Bacchi M, Weber W, Herrmann R, Fey MF, Pagani O, Leyvraz S, Morant R, Pestalozzi B, Hanselmann S, Goldhirsch A. (1998). The impact of adding low-dose leucovorin to monthly 5-fluorouracil in advanced colorectal carcinoma: Results of a phase III trial. *Ann Oncol*; 9:535-541.
15. Cho CD, Fisher GA, Halsey J, Sikic BI. (2006). Phase I study of gefitinib, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin (IFOX) in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs*; 24:117-123.
16. Kuo T, Cho CD, Halsey J, Wakelee HA, Advani RH, Ford JM, Fisher GA, Sikic BI. (2005). Phase II study of gefitinib, fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin therapy in previously treated patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 23:5613-5619.
17. Cunningham D, Maroun J, Vanhoefler U, Van Cutsem E. (2001). Optimizing the use of irinotecan in colorectal cancer. *The Oncologist*; 6:17-23.
18. Vanhoefler U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM. (2001). Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: Clinical overview. *J Clin Oncol*; 19:1501-1518.
19. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*; 1773:1263-1284.
20. Pene F, Claessens YE, Muller O, Vigié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*; 21:6587-6597.

21. Dent P, Curie DT, Fisher PB, Grant S. (2009). Synergistic combinations of signaling pathway inhibitors: Mechanisms for improved cancer therapy. *Drug Resist Updat*; doi:10.1016/j.drug.2009.03.001.
22. Bajetta E, Bartolomeo MD, Buzzoni R, Ferrario E, Dotti KF, Mariani L, Bajetta R, Gevorgyan A, Venturino P, Galassi M. (2009). Dose finding study of erlotinib combined to capecitabine and irinotecan in pretreated advanced colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*; 64:67-72.
23. Van Cutsem E, Verslype C, Beale P, Clarke S, Bugat R, Rakhit A, Fettner SH, Brennscheidt U, Feyereislova A, Delord JP. (2008). A phase Ib dose-escalation study of erlotinib, capecitabine and oxaliplatin in metastatic colorectal cancer patients. *Annals of Oncology*; 19:332-339.
24. Azzariti A, Porcelli L, Xu JM, Simone GM, Paradiso A. (2006). Prolonged exposure of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib (Iressa™) and to the antiangiogenic agent ZD6474: Cytotoxic and biomolecular effects. *World J Gastroenterol*; 12:5140-5147.
25. Stebbing J, Harrison M, Glynn-Jones R, Bridgewater J, Propper D. (2008). A phase II study to determine the ability of gefitinib to reverse fluoropyrimidine resistance in metastatic colorectal cancer (the INFORM study). *Br J Cancer*; 98:716-719.
26. Rodriguez J, Zarate R, Bandres E, Viudez A, Chopitea A, García-Foncillas J, Gil-Bazo I. (2007). Combining chemotherapy and targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*; 13:5867-5876.
27. Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. (2006). The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. *Biochim Biophys Acta*; 1766:120-139.
28. Morgan MA, Parsels LA, Kollar LE, Normolle DP, Maybaum J, Lawrence TS. (2008). The combination of epidermal growth factor receptor inhibitors with gemcitabine and radiation in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*; 14:5142-5149.

29. Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T. (2006). Epidermal growth factor receptor activation: How exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. *Clin Cancer Res*; 12:7222-7231.
30. Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H. (2009). Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res*; 15:1133-1139.
31. Jhaver M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Soler RP, Mariadason JM. (2008). PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*; 68:1953-1961.
32. Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. (2007). Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res*; 67:8240-8247.
33. Patel BB, Sengupta R, Qazi S, Vachhani H, Yu Y, Rishi AK, Majumdar APN. (2008). Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J Cancer*; 122:267-273.
34. Noordhuis P, Laan AC, van de Born K, Losekoot N, Kathmann I, Peters GJ. (2008). Oxaliplatin activity in selected and unselected human ovarian and colorectal cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*; 76:53-61.
35. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, Lièvre A, Cortet M, Bouvier AM, Rat P, Roignot P, Faivre J, Laurent-Puig P, Piard F. (2008). Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signalling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*; 122:2255-2259.
36. Montazer Haghighi M, Radpour R, Aghajani K, Zali N, Molaei M, Zali MR. (2009). Four novel germline mutations in the MLH1 and PMS2 mismatch repair genes in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*; 24:885-893.

37. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*; 305:1163-1167.
38. Shimamura T, Li D, Ji H, Haringsma HJ, Liniker E, Borgman CL, Lowell AM, Minami Y, McNamara K, Perera SA, Zaghlul S, Thomas RK, Greulich H, Kobayashi S, Chirieac LR, Padera RF, Kubo S, Takahashi M, Tenen DG, Meyerson M, Wong KK, Shapiro GI. (2008). Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance. *Cancer Res*; 68:5827-5838.
39. Jänne PA. (2008). Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours. *Lung Cancer*; 60:S3-S9.
40. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, Chiang A, Yang G, Ouerfelli O, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA, Pao W. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor - Mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006;12:6494-6501.
41. Jiang SX, Yamashita K, Yamamoto M, Piao CJ, Umezawa A, Saegusa M, Yoshida T, Katagiri M, Masuda N, Hayakawa K, Okayasu I. (2008). EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance. *Int J Cancer*; 123:2480-2486.
42. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. (2009). Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 63:315-321.
43. Riely GJ. (2008). The use of first-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with NSCLC and somatic EGFR mutations. *Lung Cancer*; 60:519-522.
44. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Velculescu VE. Mutations in a signalling pathway. *Nature*; 436:792.

45. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. (1987). Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*; 327:298-303.
46. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*; 417:949-954.
47. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*; 304:554
48. Iqbal S, Lenz HJ. (2004). Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*; 54:S32-S39.
49. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*; 286:531-537.
50. McLeod HL. (2002). Individualized cancer therapy: molecular approaches to the prediction of tumor response. *Expert Rev Anticancer Ther*; 2:113-119.
51. Acharya CR, Hsu DS, Anders CK, Anguiano A, Salter KH, Walters KS, Redman RC, Tuchman SA, Moylan CA, Mukherjee S, Barry WT, Dressman HK, Ginsburg GS, Marcom KP, Garman KS, Lyman GH, Nevins JR, Potti A. (2008). Gene expression signatures, clinicopathological features, and individualized therapy in breast cancer. *JAMA*; 299:1574-1587.

52. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*; 20:719-726.
53. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. (2007). Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*; 7:153-163.
54. Chau I, Cunningham D. (2006). Adjuvant therapy in colon cancer - what, when and how? *Ann Oncol*; 17:1347-1359.
55. Fichtner I. (2008). Präklinische Daten als Grundlage für die Konzeption klinischer Studien. *Onkologie*; 31:34-38.
56. Greaves P, Williams A, Eve M. (2004). First dose of potential new medicines to humans: How animals help. *Nat Rev Drug Discov*; 3:226-236.
57. Kubinyi H. (2008). Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug Discov*; 2:665-668.
58. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Economics*; 22:151-185.
59. Kola I, Landis J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev: Drug Discov*; 3:711-715.
60. Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, Thompson S, Sennello R, Young D, Iwata K, Gibson NW, Cagnoni P, Haley JD. (2007). Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol Cancer Ther*; 6:532-541.
61. Lenz HJ. (2004). Pharmacogenomics and colorectal cancer. *Ann Oncol*; 15:iv173-iv177.
62. Barros SA. (2005). The importance of applying toxicogenomics to increase the efficiency of drug discovery. *Pharmacogenomics*; 6:547-550.

63. Zlobec I, Lugli A. (2008). Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol*; 61:561-569.
64. Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ. (2005). Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer – more than skin deep. *J Clin Oncol*; 23:5374-5385.
65. Hong Y, Ho KS, Eu KW, Cheah PY. (2007). A susceptibility gene set for early onset colorectal cancer that integrates diverse signaling pathways: Implication for tumorigenesis. *Clin Cancer Res*; 13:1107-1114.
66. Brockmüller J, Tzvetkov MV. (2008). Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol*; 64:133-157.
67. Walker DK. (2004). The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. *Br J Clin Pharmacol*; 58:601-608.
68. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet*; 24:236-244.
69. Thiery JP, Sleeman JP. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7:131-142.
70. de Both NJ, Vermey M, Dinjens WN, Bosman FT. (1999). A comparative evaluation of various invasion assays testing colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer*; 81:934-941.
71. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet*; 34:369-376.
72. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. (2009). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*; 83:849-871.

73. Pickl M, Ries CH. (2007). Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*; 28:461-468.
74. de Kanter R, de Jager MH, Draaisma AL, Jurva JU, Olinga P, Meijer DKF, Groothuis GMM. (2002). Drug-metabolizing activity of human and rat liver, lung, kidney and intestine slices. *Xenobiotica*; 32:349-362.
75. Lerche-Langrand C, Toutain HJ. (2000). Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*; 153:221-253.
76. de Kanter R, Monshouwer M, Meijer DKF, Groothuis GMM. (2002). Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Curr Drug Metab*; 3:39-59.
77. Vickers AEM, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. (1994). Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. *Cell Biol Toxicol*; 10:407-414.
78. van der Kuip H, Mürdter TE, Sonnenberg M, McClellan M, Gutzeit S, Gerteis A, Simon W, Fritz P, Aulitzky WE. (2006). Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer*; 6:86-97.
79. Singh RP, Gu M, Agarwal R. (2008). Silibinin inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and angiogenesis. *Cancer Res*; 68:2043-2050.
80. Park YB, Kim YY, Oh SK, Chung SG, Ku SY, Kim SH, Choi YM, Moon SY. (2008). Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture. *Exp Mol Med*; 40:98-108.
81. McNeil C. (2008). K-Ras mutations are changing practice in advanced colorectal cancer. *JNCI*; 100:1667-1669.

82. Wang X, Yue P, Kim YA, Fu H, Khuri FR, Sun SY. (2008). Enhancing mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted cancer therapy by preventing mTOR/Raptor inhibition-initiated, mTOR/Rictor-independent Akt activation. *Cancer Res*; 68:7409-7418.
83. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M. (2008). Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing Akt and ERK signaling pathways. *Mol Cancer Ther*; 7:1789-1796.
84. Grant S. (2008). Cotargeting survival signaling pathways in cancer. *J Clin Invest*; 118:3003-3006.
85. Indivumed GmbH, www.indivumed.com, 2009
86. Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162:156-159.
87. Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA. (2004). Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques*; 36:1030-1037.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of reactive gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*; 25:402-408.
89. de Longueville F, Surry D, Meneses-Lorente G, Bertholet V, Talbot V, Evrard S, Chandelier N, Pike A, Worboys P, Rasson JP, Le Bourdellès B, Remacle J. (2002). Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochem Pharmacol*; 64:137-149.
90. Draghici S, Khatri P, Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz SA. (2003). Global functional profiling of gene expression. *Genomics*; 81:98-104.
91. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *The Lancet*; 360:772-777.

92. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olsen BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150:76-85.
93. Oh JH, Ku JL, Yoon KA, Kwon HJ, Kim WH, Park HS, Yeo KS, Song SY, Chung JK, Park JG. (1999). Establishment and characterization of 12 human colorectal-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*; 81:902-910.
94. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. (2006). Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer*; 5:55-68.
95. Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, Longley DB, Johnston PG. (2004). Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res*; 10:2158-2167.
96. Liu Y, Bodmer WF. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *PNAS*; 103:976-981.
97. Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Atweh GF. (2000). Taxol and anti-stathmin therapy: A synergistic combination that targets the mitotic spindle. *Cancer Res*; 60:3537-3541.
98. Yochum GS, Cleland R, Goodman RH. (2008). A genome-wide screen for β -catenin binding sites identifies a downstream enhancer element that controls *c-myc* gene expression. *Mol Cell Biol*; 28:7368-7379.
99. White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, Murray JC. (2002). Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res*; 62:1669-1675.
100. Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GFJM, Schlingemann RO. (2001). VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol*; 195: 490-497.

101. Madsen CD, Ferraris GMS, Andolfo A, Cunningham O, Sidenius N. (2004). uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *JCB*; 177:927-939.
102. Lakka SS, Rajagopal R, Rajan MK, Mohan PM, Adachi Y, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Ali-Osman F, Roth JA, Yung WKA, Kyritsis AP, Rao JS. (2001). Adenovirus-mediated antisense urokinase-type plasminogen activator receptor gene transfer reduces tumor cell invasion and metastasis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*; 7:1087-1093.
103. Schmoll HJ, Cassidy J. (2001). Integrating oxaliplatin into the management of colorectal cancer. *The Oncologist*; 6:24-28.
104. Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, Kim SJ, Fan D, Villares GJ, Zigler M, Wang H, Bar-Eli M, Kerbel RS, Fidler IJ. (2008). Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia*; 10:489-500.
105. Kammertoens T, Schüler T, Blankenstein T. (2005). Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor. *Trends Mol Med*; 11:225-231.
106. Lafkas D, Trimis G, Papavassiliou AG, Kiaris H. (2008). p53 mutations in stromal fibroblasts sensitize tumors against chemotherapy. *Int J Cancer*; 123:967-971.
107. Baranczewski P, Stańczyk A, Sundberg K, Svensson R, Wallin Å, Jansson J, Garberg P, Postlind H. (2006). Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep*; 58:453-472.
108. Wilson MS, Anderson E, Bell JC, Pearson JM, Haboubi NY, James RD, Schofield PF. (1994). An evaluation of five different methods for estimating proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Surg Oncol*; 3:263-273.
109. Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B*; 57:289-300.
110. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, www.genome.jp/kegg/, 2009

111. Gunter MC, Canzian F, Landi S, Chanock SJ, Sinha R, Rothman N. (2006). Inflammation-related gene polymorphisms and colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15:1126-1134.
112. Pages F, Berger A, Lebel-Binay S, Zinzindohoue F, Danel C, Piqueras B, Carriere O, Thiounn N, Cugnenc PH, Fridman WH. (2000). Proinflammatory and antitumor properties of interleukin-18 in the gastrointestinal tract. *Immunol Lett*; 75:9-14.
113. Guzmán-Aránguez A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Pérez-Ramos P, López de Silanes I, Lizarbe MA. (2005). Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem*; 94:178-193.
114. Kasyapa CS, Kunapuli P, Cowell JK. (2007). HSPA1A is an important regulator of the stability and function of ZNF198 and its oncogenic derivative, ZNF198–FGFR1. *J Cell Biochem*; 102:1308-1317.
115. Vogelstein B, Kinzler KW. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*; 10:789-799.
116. Tang D, Lahti JM, Kidd VJ. (2000). Caspase-8 activation and Bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *JBC*; 275:9303-9307.
117. des Guetz G, Mariani P, Cucherousset J, Benamoun M, Lagorce C, Sastre X, Le Toumelin P, Uzzan B, Perret GY, Morere JF, Breau JL, Fagard R, Schischmanoff PO. (2007). Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res*; 27:2715-2719.
118. Caraglia M, Marra M, Budillon A, Meo G, Ricciardiello F, Bismuto E, Brachelente G, Francini G, Giordano A, Correale P, Abbruzzese A. (2005). Chemotherapy regimen GOLF induces apoptosis in colon cancer cells through multi-chaperone complex inactivation and increased Raf-1 ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Biol Ther*; 4:1159-1167.
119. Bjornsti MA, Houghton PJ. (2004). The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 4:335-348.

120. Davies SM. (2006). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and personalized medicine: Are we there yet? *Hematology*; 1:111-117.
121. Bandrés E, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Bitarte N, García-Foncillas J. (2007). Pharmacogenomics in colorectal cancer: The first step for individualized-therapy. *World J Gastroenterol*; 13:5888-5901.
122. Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace Jr. AJ, Kohn KW, Fojo T, Bates SE, Rubinstein LV, Anderson NL, Buolamwini JK, van Osdol WW, Monks AP, Scudiero DA, Sausville EA, Zaharevitz DW, Bunow B, Viswanadhan VN, Johnson GS, Wittes RE, Paull KD. (1997). An Information-Intensive Approach to the Molecular Pharmacology of Cancer. *Science*; 275:343-349.
123. Sandberg R, Ernberg I. (2005). Assessment of tumor characteristic gene expression in cell lines using a tissue similarity index (TSI). *PNAS*; 102:2052-2057.
124. Masramon L, Vendrell E, Tarafa G, Capellà G, Miró R, Ribas M, Peinado MA. (2006). Genetic instability and divergence of clonal populations in colon cancer cells in vitro. *J Cell Sci*; 119:1477-1482.
125. Stein WD, Litman T, Fojo T, Bates SE. (2004). A serial analysis of gene expression (SAGE) database analysis of chemosensitivity: comparing solid tumors with cell lines and comparing solid tumors from different tissue origins. *Cancer Res*; 64:2805-2816.
126. Bhadriraju K, Chen CS. (2002). Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today*; 7:612-620.
127. Dangles-Marie V, Pocard M, Richon S, Weiswald LB, Assayag F, Saulnier P, Judde JG, Janneau JL, Auger N, Validire P, Dutrillaux B, Praz F, Bellet D, Poupon MF. (2007). Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: Comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res*; 67:398-407.
128. Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R. (2001). Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*; 20:5025-5032.

-
129. Vécsey-Semjén B, Becker KF, Sinski A, Blennow E, Vietor I, Zatloukal K, Beug H, Wagner E, Huber LA. (2002). Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene*; 21:4646-4662.
130. Iwanicki-Caron I, Di Fiore F, Roque I, Astruc E, Stetiu M, Duclos A, Tougeron D, Saillard S, Thureau S, Benichou J, Paillot B, Basuyau JP, Michel P. (2008). Usefulness of the serum carcinoembryonic antigen kinetic for chemotherapy monitoring in patients with unresectable metastasis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 26:3681-3686.
131. Konstantinopoulos PA, VANDOROS GP, Karamouzis MV, Gkermepesi M, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. (2007). EGF-R is expressed and AP-1 and NF- κ B are activated in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas paralleling expression of COX-2 and VEGF. *Cell Oncol*; 29:477-482.
132. Prete SP, Turriziani M, Massara MC, De Rossi A, Correale P, De Vecchis L, Torino F, Bonmassar L, Aquino A. (2008). Combined effects of 5-fluorouracil, Folinic acid and Oxaliplatin on the expression of carcinoembryonic antigen in human colon cancer cells: pharmacological basis to develop an active antitumor immunochemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*; 19:5-11.
133. Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ, Ma D, Man X, Hong Y, Zhang L, Li L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. (2005). Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers. *Proteomics*; 5:1125-1139.
134. Obama K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y. (2006). Overexpression of peptidyl-prolyl isomerase-like 1 is associated with the growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res*; 12:70-76.
135. Moehler M, Frings C, Mueller A, Gockel I, Schimanski CC, Biesterfeld S, Galle PR, Holtmann MH. (2008). VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. *World J Gastroenterol*; 14:4156-4167.

136. Shetty S, Velusamy T, Idell S, Tang H, Shetty PK. (2007). Regulation of urokinase receptor expression by protein tyrosine phosphatases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292:L414-L421.
137. Montuori N, Mattiello A, Mancini A, Taglialatela P, Caputi M, Rossi G, Ragno P. (2003). Urokinase-mediated posttranscriptional regulation of urokinase-receptor expression in non-small cell lung carcinoma. *Int J Cancer*; 105:353-360.
138. Semenza GL. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 3:721-732.
139. Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. (2007). Hypoxia inducible factor-1 α independent pathways in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res*; 13:5670-5674.
140. Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Ji P, Wie HJ, Ma HY. (2006). Expression of NOS and HIF-1 α in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol*; 12:4660-4664.
141. Lee SY, Yuk DY, Song HS, Yoon DY, Jung JK, Moon DC, Lee BS, Hong JT. (2008). Growth inhibitory effects of obovatol through induction of apoptotic cell death in prostate and colon cancer by blocking of NF- κ B. *Eur J Pharmacol*; 582:17-25.
142. Cheng Y, Prusoff WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*; 22:3099-3108.
143. Wilkening S, Tavelin B, Canzian F, Enquist K, Palmqvist R, Altieri A, Hallmans G, Hemminki K, Lenner P, Försti A. (2008). Interleukin promoter polymorphisms and prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*; 29:1202-1206.
144. Majima T, Ichikura T, Chochi K, Kawabata T, Tsujimoto H, Sugawara H, Kuranaga N, Takayama E, Kinoshita M, Hiraide H, Seki S, Mochizuki H. (2006). Exploitation of interleukin-18 by gastric cancers for their growth and evasion of host immunity. *Int J Cancer*; 118:388-395.
145. Hay N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*; 8:179-183.

-
146. Miller BE, Miller FR, Heppner GH. (1985). Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in collagen gel cultures. *Cancer Res*; 45:4200-4205.
 147. Shoemaker RH, Wolpert-DeFilippes MK, Kern DH, Lieber MM, Makuch RW, Melnick MR, Miller WT, Salmon SE, Simon RM, Venditti JM, Von Hoff DD. (1985). Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Res*; 45:2145-2153.
 148. Anderson SN, Towne DL, Burns DJ, Warrior U. (2007). A high-throughput soft agar assay for identification of anticancer compound. *J Biomol Screening*; 12:938-945.
 149. Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Muller D, Albertini S, Suter L. (2003). Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci*; 73:386-402.
 150. Rescher U, Gerke V. (2004). Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*; 117:2631-2639.
 151. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, Murray GI. (2008). Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer*; 98:426-433.
 152. Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. (2008). Resistance in malignant tumors: Can resistance assays optimize cytostatic chemotherapy? *Pharmacology*; 81:196-203.
 153. Andreotti PK, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann DM, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso PA, Ricks SH, Untch M, Sartori C, Bruckner HW. (1995). Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: Clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res*; 55:5276-5282.

154. Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. (2000). Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the *c-jun* N-terminal kinase activity. *Br J Cancer*; 82:1991-1999.
155. Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Kaneko N, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Murata Y, Sasaki H, Takami K, Yamamura A, Shibata C, Sasaki I. (2009). Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci*; 100:903-913.
156. Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD. (1997). Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): Dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res*; 57:3697-3707.
157. Trent JM, Gerner E, Broderick R, Crossen PE. (1986). Cell cycle analysis using bromodeoxyuridine: Comparison of methods for analysis of total cell transit time. *Cancer Genet Cytogenet*; 19:43-50.
158. Jiménez-Medina E, Berruguilla E, Romero I, Algarra I, Collado A, Garrido F, Garcia-Lora A. (2008). The immunomodulator PSK induces *in vitro* cytotoxic activity in tumour cell lines *via* arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer*; 8:78-88.
159. Rubio CA. (2007). Further studies on the arrest of cell proliferation in tumor cells at the invading front of colonic adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*; 22:1877-1881.
160. Sutton JE, Roos IAG, Hillcoat BL. (1982). Combined actions of 5-fluorouracil and 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea on human colonic carcinoma cells *in Vitro*. *Cancer Res*; 42:5172-5175.
161. Aschele C, Sobrero A, Faderan MA, Bertino JR. (1992). Novel mechanism(s) of resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules. *Cancer Res*; 52:1855-1864.

-
162. Punt CJA. (2004). New options and old dilemmas in the treatment of patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*; 15:1453-1459.
163. Carneiro BA, Kaminer L, Eldibany M, Sreekantaiah C, Kaul K, Locker GY. (2006). Oxaliplatin-related acute myelogenous leukemia. *The Oncologist*; 11:261-262.
164. Montopoli M, Ragazzi E, Froidi G, Caparrotta L. (2009). Cell-cycle inhibition and apoptosis induced by curcumin and cisplatin or oxaliplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cell Prolif*; 42:195-206.
165. Koch S, Mayer F, Honecker F, Schittenhelm M, Bokemeyer C. (2003). Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions *in vitro*. *Br J Cancer*; 89:2133-2139.
166. Papamichael D. (2000). The Use of Thymidylate Synthase Inhibitors in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Current Status. *Stem Cells*; 18:166-175.
167. Abe S, Kubota T, Otani Y, Furukawa T, Watanabe M, Kumai K, Kitajima M. (2000). UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) enhances 5-fluorouracil cytotoxicity through down-regulation of thymidylate synthetase messenger RNA. *Jpn J Cancer Res*; 91:1192-1198.
168. Yasumatsu R, Nakashima T, Uryu H, Ayada T, Wakasaki T, Kogo R, Masuda M, Fukushima M, Komune S. (2009). Correlations between thymidylate synthase expression and chemosensitivity to 5-fluorouracil, cell proliferation and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Chemotherapy*; 55:36-41.
169. Pernas FG, Allen CT, Winters ME, Yan B, Friedman J, Dabir B, Saigal K, Munding GS, Xu X, Morris JC, Calvo KR, Van Waes C, Chen Z. (2009). Proteomic signatures of epidermal growth factor receptor and survival signal pathways correspond to gefitinib sensitivity in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*; 15:2361-2372.

170. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*; 350:2129-2139.
171. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimber A, Ouelaa R, Bracke M, De Wever O, Gespach C. (2008). Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat*; 11:123-151.
172. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), www.bfarm.de, 2009.
173. Jacob DA, Bahra M, Langrehr JM, Boas-Knoop S, Stefaniak R, Davis J, Schumacher G, Lippert S, Neumann UP. (2007). Combination therapy of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide and gemcitabine shows strong antitumor activity in pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol*; 22:738-748.
174. Kleespies A, Ischenko I, Eichhorn ME, Seeliger H, Amendt C, Mantell O, Jauch KW, Bruns CJ. (2008). Matuzumab short-term therapy in experimental pancreatic cancer: Prolonged antitumor activity in combination with gemcitabine. *Clin Cancer Res*; 14:5426-5436.
175. Wang W, Yue P, Kim YA, Fu H, Khuri FR, Sun SY. (2008). Enhancing mammalian target of Rapamycin (mTOR)-targeted cancer therapy by preventing mTOR/Raptor inhibition-initiated, mTOR/Rictor-independent Akt activation. *Cancer Res*; 68:7409-7418.
176. Hirakawa H, Nakayama T, Shibata K, Mihara Y, Taba M, Nagayasu T, Sekine I. (2009). Apical membrane localization of glycogen synthase kinase 3b protein in normal colon epithelium and aberrant distribution in colorectal cancer. *Cancer Letters*; 275:158-162.

-
177. Song S, Mazurek N, Liu C, Sun Y, Ding Q, Liu K, Hung MC, Bresalier RS. (2009). Galectin-3 mediates nuclear β -catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3 β activity. *Cancer Res*; 69:1343-1349.
178. Moon DO, Lee KJ, Choi YH, Kim GY. (2007). β -Sitosterol-induced-apoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells. *International Immunopharmacol*; 7:1044-1053.
179. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res*; 69:5820-5828.
180. Li QQ, Xu JD, Wang WJ, Cao XX, Chen Q, Tang F, Chen ZQ, Liu XP, Xu ZD. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin Cancer Res*; 15:2657-2665.
181. Cascinu S, Berardi R, Salvagni S, Beretta GD, Catalano V, Pucci F, Sobrero A, Tagliaferri P, Labianca R, Scartozzi M, Crocicchio F, Mari E, Ardizzoni A. (2008). A combination of gefitinib and FOLFOX-4 as first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. A GISCAD multicentre phase II study including a biological analysis of EGFR overexpression, amplification and NF- κ B activation. *Br J Cancer*; 98:71-76.
182. Wang J, Yang L, Yang J, Kuropatwinski K, Wang W, Liu XQ, Hauser J, Brattain MG. (2008). Transforming growth factor β induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt/surviving pathway in colon cancer cells. *Cancer Res*; 68:3152-3160.
183. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. (2008). Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*; 14:1291-1295.

184. André T, Bensmaine MA, Louvet C, Francois E, Lucas V, Desseigne F, Beerblock K, Bouché O, Carola E, Merrouche Y, Morvan F, Dupont-André G, de Gramont A. (1999). Multicenter phase II study of bimonthly high-dose leucovorin, fluorouracil infusion, and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and fluorouracil regimen. *J Clin Oncol*; 17:3560-3568.
185. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*; 57:119-137.

8 Veröffentlichungen

Poster und Abstracts

1. Gene and Protein Expression Pattern Depend on Tissue Ischemia Time. (# A223). Sprüssel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl H, David KA. AACR-NCI-EORTC International Conference on *Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Biology, and Clinical Applications*; Boston, MA; November 17-21, 2003.
2. Impact of short-term primary cell cultivation on gene expression profiles of colorectal tumor cells. (# A4879). Sprüssel A, Spangenberg J, List HJ, Zornig C, Dörner A, Juhl HH, David KA. AACR Annual Meeting 2007; Los Angeles, CA; April 14-18, 2007.
3. Molecular analysis of drug response in short-term cultivated primary cells of colorectal cancer patients. (# A131). Sullivan K, Spruessel A, Krueger J, Hennesen J, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA. AACR-NCI-EORTC International Conference on *Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Biology, and Clinical Applications*; San Francisco, CA; October 22-26, 2007.
4. Multifunctional molecular analysis of common cancer drug responses in short-term cultivated primary epithelial cells. (# A4924). Sprüssel A, Krüger J, Hennesen J, Spangenberg J, Juhl HH, David KA. AACR Annual Meeting 2008; San Diego, CA; April 12-16, 2007.
5. Multifunctional analysis of cultivated primary adenocarcinoma cells after treatment with different chemotherapeutic drugs. (Abstract No. 22139). Sprüssel A, Krüger J, Hennesen J, Spangenberg J, Juhl HH, David KA. 44rd ASCO Annual Meeting 2008; Chicago, IL; May 30-June 3, 2008.
6. Multifunctional analysis of cultivated primary adenocarcinoma cells after treatment with different chemotherapeutic drugs. (#157 / A47). Sprüssel A, Krüger J, Hennesen J, Spangenberg J, Juhl HH, David KA. AACR Centennial Conference on *Translational Cancer Medicine 2008: Cancer Clinical Trials and Personalized Medicine*; Monterey, CA; July 20-23, 2008.

Vortrag

1. Bedeutung der Gewebeischämiezeit für die Gen- und Proteinexpressionsbestimmung mittels molekularer Screeningverfahren. Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung, 121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie; Berlin; April 27-30, 2004.

Artikel

1. Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA. (2004). Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *BioTechniques*; 36:1030-7.
2. Sprüssel A, Spangenberg J, Pollmann S, Juhl HH, David KA. Short-term primary cells of colorectal adenocarcinoma: Impact on gene expression and application in multi-functional molecular analysis of cancer drug responses.

eingereicht beim Journal „Molecular Cancer“

Danksagung

Mein Dank gilt allen, ohne die ich diese Aufgabe so nicht hätte fertigstellen können:

Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst danke ich für die Übernahme der universitären Betreuung und des Co-Referates. Meiner Doktormutter, Frau PD Dr. K. David, danke ich für die Betreuung, für ihre Unterstützung und Anleitung während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. H. Juhl danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Möglichkeit, Tumorforschung auf Kongressen zu erleben, und für die Beschäftigung bei der Firma Indivumed GmbH.

Herrn Dr. Jörg Spangenberg danke ich besonders für die Beratungen zu statistischen Auswertungen, die wissenschaftliche wie praktische Hilfestellung und für die freundschaftliche Zusammenarbeit und viele Gespräche.

Frau Dr. Ilona Schonn danke ich für die Ratschläge und Kritik beim Schreiben dieser Arbeit und für die mit ihr geteilte Freude an der gemeinsamen Arbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung bei der Firma Indivumed GmbH für die Herzlichkeit und unterstützende Zusammenarbeit, die immer offenen Ohren und die fruchtbaren Anregungen, die alle dieser Arbeit beigesteuert haben.

Insbesondere möchte ich meiner Laborkollegin Jana Krüger danken, die mir eine unschätzbare Stütze gewesen ist. Mein Dank gilt weiterhin Frau Jana Hennesen, Frau Cordula Rosenbrock, Frau Jasmin Oehlmann, Frau Monika Spörl, Frau Agnieszka Harasym und Herrn Dr. Markus Meier, ohne die die Arbeit und die gemeinsam verbrachte Zeit niemals so viel Spaß gemacht hätten. Meiner Mitstreiterin Frau Anne Fentz danke ich darüber hinaus für den fachlichen und persönlichen Austausch auch während vieler Abendstunden am Labortisch. Ich danke dem gesamten Routineteam der Firma Indivumed GmbH und besonders Frau Christine Hein, Mitarbeiterin der Immunhistologie, für die tatkräftige und praktische Unterstützung, die Hilfestellungen und für die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Sören Pollmann, zeitweilig Praktikant des Studienganges Biotechnologie, danke ich für seine tatkräftige Hilfe.

„Last but not least“ danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für die immerwährende Unterstützung, die unermüdliche Hilfe (z.B. bei Problemen mit dem PC) und ihre Geduld.

Ich danke allen, die an mich geglaubt haben und mir immer versichert haben:

Alles wird gut!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annika Sprüssel
Geburtsdatum	12.01.1979
Geburtsort	Hamburg

Schulausbildung

08/1985 – 07/1989	Mendelssohn-Grundschule, Hamburg
08/1989 – 06/1998	Gymnasium Osdorf, Hamburg

Studium

10/1998 – 12/2003	Studium der Biologie an der Universität Hamburg
11/2002 – 07/2003	Diplomarbeit an der Universität Hamburg, durchgeführt bei der Firma Indivumed GmbH

Promotion

10/2003 - 10/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Firma Indivumed GmbH
01/2004 - 07/2009	Bearbeitung und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Frau PD Dr. Kerstin David
06/2005	Wechsel zum vorliegenden Promotionsthema

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, d. 30.07.2009

Annika Sprüssel