

**Vergleichende Untersuchung der
Genexpression in humanen Tumorzellknoten
und Tumorzellrasen *in vitro***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christina Hildegard Wagner

aus Saarburg

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Harald Enzmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der Promotion: 20.01.2017

Erscheinungsjahr: 2017

Danksagung

An dem erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit waren einige Personen beteiligt, bei denen ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanke.

Meinem Doktorvater PD Dr. Harald Enzmann danke ich für die Möglichkeit, dieses sehr interessante Thema zu bearbeiten. Ich danke ihm ebenfalls für die umfassende wissenschaftliche Betreuung und für das Vertrauen, das er mir von Anfang an entgegenbrachte. Die konstruktiven Diskussionen und vielfältigen Anregungen haben mich stets motiviert.

Ich danke Prof. Dr. Ulrich Jaehde für das Interesse an meiner Arbeit, die Übernahme des Koreferates und die Bereitstellung der A2780- und HCT-8-Zellen.

Bei Prof. Dr. Harald Schweim und Prof. Dr. Wolfgang Büscher bedanke ich mich für ihre Mitwirkung in der Promotionskommission.

Dr. Karsten Spicher danke ich sehr für die zuverlässige Unterstützung und die fachliche Betreuung des Projekts.

Bei meiner Kollegin Dr. Bettina Kästner bedanke ich mich für die schöne Zeit in Labor, Büro und darüber hinaus.

Maria Catarinolo und Christoph Schlösser danke ich für die engagierte und tatkräftige Unterstützung im Labor und ihr Durchhaltevermögen an langen Versuchstagen.

Dr. Peter Mayer und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den PCR-Versuchen und die Unterstützung bei den Microarrays.

Bei Dr. Carina Mohn bedanke ich mich für die Durchführung der Platinbestimmung und die Hilfe bei der Auswertung dieser Daten.

Für die Durchführung der Hypoxieversuche danke ich Dr. Nadja Pfetzer.

Bei Irene Bachmann bedanke ich mich für die Organisation der Diskussionsrunden und ihre stets freundliche Unterstützung in allen Belangen.

Dr. Irina Bosman danke ich für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit und die sehr konstruktiven und motivierenden Gespräche.

Schließlich danke ich meinem Mann Philipp, meiner Familie und meinen Freunden, die mich in meinem Promotionsvorhaben stets unterstützt haben.

1. Einleitung	1
1.1 <i>In-vitro</i>-Modelle	1
1.1.1 Zellkultur	1
1.1.2 Sphäroide	2
1.2 <i>In-vivo</i>-Mausmodelle	3
1.2.1 Induzierte Neoplasien	4
1.2.2 Transplantierte Tumoren / Xenografts	4
1.3 <i>In-ovo</i>-Modell: Tumorzellen auf der Chorion-Allantois-Membran von Vögeln	5
1.4 Antineoplastische Arzneistoffe	7
1.4.1 Sorafenib	8
1.4.2 Cisplatin	10
1.5 Zielsetzung	11
2. Material	12
2.1 Geräte	12
2.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.3 Chemikalien und Reagenzien	14
2.4 Hergestellte Lösungen und Puffer	16
2.5 Primer für die Polymerase Kettenreaktion	20
2.6 Zellkultur	22
2.6.1 Tumorzelllinien	22
2.6.2 Lösungen Zellkultur	23
2.7 Fertilisierte Puteneier	23
3. Methoden	25
3.1 Zellkultur	25
3.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums	25
3.1.2 Zellzählung	25
3.1.3 Kryokonservierung	26
3.1.4 Auftauen von Zellen aus dem Stickstoff-Tank	27
3.1.5 Mediumwechsel	27
3.1.6 Subkultivierung	27
3.2 Herstellung der Zellsuspension für den CAM-Versuch	29
3.3 Zellkulturversuche mit Sorafenib und Cisplatin	29
3.3.1 Grundlagen	29
3.3.2 Versuchsdurchführung	30
3.4 Hypoxie-Versuche	30
3.5 Generierung der Tumorzellknoten	31
3.5.1 Auswahl der Zelllinien	31
3.5.2 Beimpfung der CAM	32
3.6 Histologie	33
3.6.1 Vorbereitung des Tumorgewebes zur histologischen Auswertung	33
3.6.2 Anfertigung der Gewebeschnitte	33
3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	34
3.6.4 Immunperoxidasefärbung des Zytokeratin 8	35

3.7 RNA-Isolierung	38
3.7.1 Herstellung des Homogenats	38
3.7.2 RNA-Isolierung	39
3.7.3 Denaturierendes Agarosegel	39
3.8 Microarray	41
3.8.1 Grundlagen	41
3.8.2 Durchführung und Auswertung	41
3.8.3 Übersicht Microarrays - Proben und Kontrollen	45
3.8.4 Darstellung der Ergebnisse	45
3.8.5 Begriffsdefinitionen	47
3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	48
3.9.1 Reverse Transkription	48
3.9.2 Ablauf der PCR	49
3.10 Rückführung	50
3.10.1 Grundlagen	50
3.10.2 Durchführung	51
3.10.3 Microarray	51
3.11 Dosisfindung von Sorafenib und Cisplatin	52
3.11.1 Sorafenib	52
3.11.2 Cisplatin	54
3.12 Bestimmung der Gewebekonzentration von Cisplatin	55
3.12.1 Behandlung der Eier mit Cisplatin	55
3.12.2 Atomabsorptionsspektrometrie	55
3.12.3 Probenaufarbeitung und Messung	55
3.13 Behandlung der Tumorzellknoten <i>in ovo</i>	57
3.13.1 Behandlung der HepG2- Tumorzellknoten mit Sorafenib	57
3.13.2 Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin	57
4. Ergebnisse	59
4.1 Methodenoptimierung	59
4.1.1 Zelllinienauswahl	59
4.1.2 Makroskopisches Bild der Tumorzellknoten	61
4.1.3 Histologisches Bild der Tumorzellknoten	64
4.1.4 Immunperoxidasefärbung	67
4.1.5 Genexpressionsmuster	67
4.2 Tumor-assoziierte Veränderungen der Genexpressionsmuster	73
4.2.1 Tumorzellknoten HepG2	73
4.2.2 Tumorzellknoten A2780	74
4.2.3 Tumorzellknoten HCT-8	74
4.2.4 Tumor-assoziierte Genexpressionsmusteränderungen in allen drei Tumorarten	75
4.2.5 Bestätigung durch PCR	80
4.3 Hypoxie	81
4.3.1 Anzahl der verändert exprimierten Sequenzen (VES)	81
4.3.2 Übereinstimmung der VES Hypoxie 1 % und 5 % Sauerstoff	82
4.3.3 Übereinstimmung der VES der HepG2-Zelllinien Bonn und Würzburg	83
4.3.4 Vergleich der Gensequenzen, die in allen drei Tumorzelllinien hochreguliert waren, mit den Gensequenzen, die unter Hypoxie hochreguliert waren	84

4.3.5 Vergleich der verändert exprimierten Sequenzen in HepG2 <i>in ovo</i> mit den verändert exprimierten Sequenzen unter Hypoxie <i>in vitro</i>	86
4.4 Rückführung	86
4.4.1 Vergleich VES Rückführung beider Microarrays miteinander	86
4.4.2 Vergleich der verändert exprimierten Sequenzen nach Rückführung mit den Tumor-assoziierten Veränderungen bei HepG2	89
4.4.3 Vergleich A3T mit VES Rückführung	90
4.5 Dosisfindung von Sorafenib und Cisplatin	91
4.5.1 Sorafenib	91
4.5.2 Cisplatin	92
4.6 Behandlung der HepG2-Tumorzellknoten mit Sorafenib	93
4.6.1 Tumorwachstum unter Sorafenib	93
4.6.2 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Sorafenib <i>in ovo</i>	93
4.6.3 Übereinstimmung VES Sorafenib <i>in ovo</i> mit TA-VES HepG2	95
4.6.4 Vergleich VES Rückführung mit VES Sorafenib <i>in ovo</i>	96
4.6.5 Vergleich VES Sorafenib <i>in ovo</i> mit A3T	97
4.7 Behandlung der HepG2-Zellen <i>in vitro</i> mit Sorafenib	98
4.7.1 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Sorafenib <i>in vitro</i>	98
4.7.2 Vergleich VES Sorafenib <i>in ovo</i> mit VES Sorafenib <i>in vitro</i>	99
4.8 Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin	102
4.8.1 Tumorwachstum unter Cisplatin	102
4.8.2 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Cisplatin <i>in ovo</i>	102
4.8.3 Vergleich VES Cisplatin <i>in ovo</i> mit TA-VES A2780	103
4.8.4 Vergleich VES Cisplatin <i>in ovo</i> mit A3T	105
4.9 Behandlung der A2780-Zellen <i>in vitro</i> mit Cisplatin	106
4.9.1 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Cisplatin <i>in vitro</i>	106
4.9.2 Vergleich VES Cisplatin <i>in ovo</i> mit VES Cisplatin <i>in vitro</i>	107
4.10 Platingehalt im Lebergewebe	109
 5. Diskussion	 110
5.1 Eignung des Modells	110
5.1.1 Erzeugung der Tumorzellknoten	110
5.1.2 Bestimmung der Genexpressionsmuster	111
5.1.3 Dosisfindung von Sorafenib und Cisplatin	112
5.2 Vergleiche der Genexpressionsmuster in A3T	113
5.2.1 A3T und Hypoxie	117
5.2.2 A3T und Sorafenib	118
5.2.3 A3T und Cisplatin	120
5.2.4 A3T und Rückführung	126
5.3 Genexpressionsmusteränderungen innerhalb der einzelnen Zelllinien	127
5.3.1 HepG2	127
5.3.2 A2780	131
5.3.3 HCT-8	133
5.4 Einordnung des Modells „CAM“ in den Gesamtkontext	134
 6. Zusammenfassung	 139
 7. Literaturverzeichnis	 141

Abkürzungsverzeichnis

\tilde{x}	Median
Abb.	Abbildung
A3T	Sequenzen, die in allen 3 T umorzelllinien in die gleiche Richtung verändert sind
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
CAM	Chorion-Allantois-Membran
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EC ₅₀	Effektive Konzentration: Konzentration, bei der 50 % des maximalen Effektes erreicht wird
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MCTS	Multizelluläre Tumorsphäroide (<i>multicellular tumour spheroids</i>)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
nc	Keine Veränderung (<i>no change</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor (<i>platelet derived growth factor</i>)
PDGFR	Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>platelet derived growth factor receptor</i>)
rcf	Relative Zentripetalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RIN	RNA integrity number
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TA-VES	T umor- a ssoziierte v erändert e xprimierte S equenzen: Sequenzen, die beim Übergang zum knotigen Wachstum verändert exprimiert sind
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜR	Überlebensrate
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
VES	V erändert e xprimierte S equenzen: Die Gensequenzen, die auf dem Microarray in der Probe im Vergleich zur Kontrolle verändert sind
WR	Wiederfindungsrate
O ₂	Sauerstoff

1. Einleitung

Die Entwicklung eines neuen Arzneimittels ist ein langwieriger Prozess. Von der Entwicklung bis zur Zulassung vergehen durchschnittlich 13,5 Jahre [1]. An die chemisch-pharmazeutische Entwicklung schließen sich präklinische Studien unter anderem mit Zell- und Tiermodellen an. Zeigt der Stoff die gewünschte Wirkung und Verträglichkeit, kann ein Genehmigungsverfahren bei der zuständigen Bundesoberbehörde zum Erstversuch am Menschen beantragt werden. Im Schnitt kann für eine von neun Substanzen (11 %), die in die klinische Prüfung gekommen sind, die Zulassung beantragt werden. Bei der Entwicklung von Krebstherapeutika liegt diese Quote lediglich bei 5 %. In Phase II der klinischen Prüfung scheitern mehr als 70 %, in Phase III 59 % der onkologisch wirksamen Substanzen. Auf Grund dieser hohen Misserfolgsquote ist es besonders wichtig, potentielle Risiken bereits in präklinischen Studien zu identifizieren [2]. Bevor ein neu entwickelter Wirkstoff gegen Krebs für die klinische Prüfung am Menschen (*first in human*) zugelassen wird, wird er in umfangreichen präklinischen Studien im Hinblick auf Toxizität und Wirksamkeit überprüft. Es wird sowohl an *In-vitro*-Modellen als auch in Tierversuchen getestet. Unter Berücksichtigung der entstehenden Kosten und aus ethischen Gründen wird dabei so viel wie möglich an *In-vitro*-Modellen getestet.

1.1 *In-vitro*-Modelle

1.1.1 Zellkultur

Die Entstehung und das Wachstum von Tumoren und mögliche molekulare Ziele und Substanzen zur Therapie von humanem Krebs werden seit über 60 Jahren mit Hilfe verschiedener *In-vivo*- und *In-vitro*-Modelle untersucht. 1955 wurde das erste groß angelegte Programm für die Arzneimittelentwicklung gegen Krebs durch das *National Cancer Institute* (NCI, USA) initiiert. Dabei wurden die Effekte verschiedener Substanzen auf Mauslymphomzellen untersucht, um neue antineoplastische Wirkstoffe zu identifizieren. Im Rahmen des Programms wurden unter anderem die Vinca-Alkaloide, Actinomycin D und die Platine entwickelt [3]. Die systematische Suche nach neuen Wirkstoffen gegen Krebs durch die Testung in einer Vielzahl humaner Tumorzelllinien begann in den späten 1980er Jahren, als das NCI eine Screeningmethode mit 60 humanen Tumorzelllinien entwickelte. Die Tumorzelllinien deckten ein breites Spektrum an verschiedenen Tumorarten ab [3]. Die prädiktive Aussagekraft solcher Daten, die durch die Versuche mit einschichtigen Zellrasen und im Falle von hämatologischen Neoplasien mit Suspensionskulturen erhalten wurden, bleibt in Bezug auf eine klinisch relevante Wirksamkeit gering. So wird von allen

potentiellen Wirkstoffen gegen Krebs nur ein geringer Teil, der in die klinische Prüfung gelangt, später auch z.B. von der *Food and Drug Administration* (FDA, USA) zugelassen (weniger als 5 %). Deshalb ist die Entwicklung ausgereifter und dreidimensionaler Tumormodelle dringend erforderlich, um die bessere Übertragung in den klinischen Kontext zu gewährleisten [4]. Heute existieren drei Hauptstrategien um zellbasierte Tumormodelle zu entwickeln:

- Verwendung von Krebszelllinien, die aus einer Einzelzelle eines entsprechenden Tumors stammen. Es handelt sich um immortalisierte Klone.
- Verwendung von Primärzellkulturen, welche direkt aus Tumorgewebe gewonnen und nach Entnahme in Kultur genommen wurden.
- Eine Kombination aus 1. und 2. [4].

Eines der klassischen Zellkulturmodelle ist das des einschichtigen Zellrasens. Dieses Modell weist eine Reihe von Vorteilen auf. Tumorzellen *in vitro* zeigen ein schnelles Wachstum. Durch die Standardisierung der Experimente können reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Viele Zelllinien sind im Hinblick auf ihren genetischen Fingerabdruck, ihre Mutationen und ihre Differenzierungseigenschaften gut definiert und stabil. Die Experimente mit Zelllinien haben vor allem auch im Hinblick auf die zielgerichtete Krebstherapie schon zur Entdeckung neuer Wirkstoffe beigetragen [4]. Es ist jedoch oft der Fall, dass Wirkstoffe, die eine antineoplastische Wirkung auf *in vitro* kultivierte Tumorzellen zeigen, sich schon im Tierversuch oder später in der klinischen Prüfung als unwirksam erweisen. Dafür gibt es verschiedene Gründe. *In vitro* kultivierte Tumorzellen haben eine sehr artifizielle Umgebung. Adhärente Tumorzellen wachsen als einschichtiger Zellrasen auf dem Boden spezieller Zellkulturflaschen und erhalten ihre Nährstoffe aus dem Zellkulturmedium, welches jede der Zellen umgibt. Folglich ist nahezu jede Zelle gleichermaßen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Zudem fehlt der Einfluss umliegendes Gewebes auf die Tumorzellen. Tumorzellen *in vitro* wachsen als einzelne Zellen ohne Interaktionen mit Nachbarzellen, die beim Wachstum von Zellen im Tumorknoten vorhanden sind. Eine Gefäßversorgung ist nicht vorhanden.

1.1.2 Sphäroide

Das Modell der multizellulären Tumorsphäroide ist das älteste und am häufigsten angewandte Modell, um *in vitro* eine Annäherung an ein dreidimensionales Zellwachstum zu erreichen. Bei den Sphäroiden handelt es sich um kleine Aggregate von Tumorzellen, die unter nicht-adhärenenten Bedingungen gebildet werden. Zur Bildung der Aggregate werden verschiedene Methoden angewandt. Diese Methoden sind unter anderem die Kultur in Spinnerflaschen, die nicht-adhärenente Kultur auf mit

Agarose beschichteten Platten und die Kultur im hängenden Tropfen. Durch diese Methoden werden Aggregate mit Durchmessern von inzwischen bis zu 3 mm erzeugt [5]. Sphäroide sind humanen soliden Tumoren ähnlicher als *in vitro* kultivierte Tumorzellen. Sie ähneln kleinen, unvaskularisierten soliden Tumoren in Bezug auf den nahen Zell-Zell-Kontakt, die Zellmorphologie, die Wachstumskinetik und die Reaktion auf Arzneistoffe [6, 7]. In Sphäroiden ist ein Proliferationsgradient vorhanden. Proliferierende Tumorzellen sind eher in der Peripherie zu finden, Zellen im Zellzyklus-Arrest weiter entfernt von der Tumeroberfläche und in der Mitte ist häufig ein nekrotischer Kern vorhanden. Analog zu großen soliden Tumoren ist ein Gradient in Bezug auf Sauerstoff- und Nährstoffversorgung vorhanden. Diese Unterschiede in der Zellphysiologie und im Tumormikromilieu beeinflussen die Sensitivität von Tumoren und Sphäroiden gegenüber vielen Krebstherapeutika maßgeblich. So zeigen Sphäroide, wie humane Tumoren *in vivo*, im Gegensatz zum Zellrasen höhere Resistenz gegenüber Wirkstoffen [4]. Sphäroide bilden im Gegensatz zu einzeln wachsenden Zellen histologische Strukturen und weisen natürlichere extrazelluläre Stimuli auf. Die Genexpressionsveränderungen im Hinblick auf intrazelluläre Signale, Zellpolarisation und Zellmetabolismus (z.B. Glykolyse, Hochregulierung angiogenetischer Faktoren wie VEGF) ähneln dem Genexpressionsmuster humaner Tumoren mehr als das Genexpressionsmuster von Zellen, die im Zellrasen wachsen. Neben den genannten Vorteilen gibt es jedoch einige Beschränkungen der Sphäroide. Die Diffusion innerhalb der Sphäroide ist limitiert, da die Distanz, über die eine Substanz via Diffusion migrieren kann, sehr gering ist. Aus diesem Grund sind sowohl Nährstoff- und Sauerstoffversorgung als auch der Arzneistofftransport zu den innenliegenden Zellen erschwert und Metabolismus- und Proliferationsraten innerhalb der Sphäroide sehr heterogen. Außerdem bieten Sphäroide keinen komplexen Aufbau oder gute Bedingungen für Co-Kulturen, um Studien komplexer Tumorbiologie zu ermöglichen oder um Therapien, die auf Tumor-Stroma-Interaktionen abzielen, zu entwickeln [4]. Sphäroide zeigen im Gegensatz zu Tumoren *in vivo* keine Neovaskularisierung.

1.2 *In-vivo*-Mausmodelle

Es gibt drei Hauptgründe für die Verwendung von Mausmodellen in der Tumorforschung. Sie können bei der Untersuchung grundlegender biologischer Prinzipien von Krebs von Nutzen sein und sowohl als Assay für die präklinische Entwicklung von Krebstherapeutika als auch als Werkzeug zur Entdeckung neuer klinisch wirksamer Stoffe und Assays dienen [8].

1.2.1 Induzierte Neoplasien

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Krebs direkt im Versuchstier zu induzieren. Eine Möglichkeit ist die Bestrahlung, wie z.B. mit UV-Strahlen, welche Hautkrebs auslöst. Die Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen kann im Mausmodell die Entstehung von Leukämien zur Folge haben. Physikalische Agonisten, wie zum Beispiel Asbestfasern, stellen eine weitere Möglichkeit zur Krebsinduktion im Mausmodell dar. Zudem besteht die Möglichkeit der Induktion von Tumoren mittels karzinogener Stoffe. In manchen Mausmodellen entwickeln die Versuchstiere einen spezifischen Tumor nach Erhalt eines krebsauslösenden Stoffes oder nach Exposition mit einem Karzinogen. Beispielsweise werden seit den 1940er Jahren Karzinome des Verdauungssystems, die durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe induziert werden können, untersucht [9]. Orale- und Lungenkarzinome können durch tabakspezifische Komponenten ausgelöst werden. Ebenso können Tumoren mittels Genmodifikationen induziert werden. Unter anderem können in transgenen Mäusen organspezifische Krebsarten erzeugt werden. Tumoren entstehen aus normalen Zellen in deren natürlicher Gewebemikroumgebung innerhalb eines intakten Immunsystems [10]. Ein Beispiel ist das Modell der p53-defizienten Maus. Fast in der Hälfte aller humanen Krebsarten liegt eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 vor. Im Fall eines Funktionsverlustes von p53 gehen apoptotische und dem Arrest des Zellzyklus dienende Funktionen verloren. Infolgedessen werden genomische Instabilitäten und das Zellüberleben gefördert. Auf diese Weise wird die Krebsentstehung beschleunigt [11].

1.2.2 Transplantierte Tumoren / Xenografts

Eines der am häufigsten verwendeten Modelle ist das von Tumor-Xenografts in immundefizienten Mäusen. Xenografts werden durch die Injektion humaner Tumorzellen aus *in vitro* Kulturen oder durch Transplantationen kleiner Anteile solider Tumoren erzeugt [8]. Verglichen zu Zellkulturmodellen *in vitro* bieten *In-vivo*-Modelle eine komplexere Tumorumgebung. Die Entwicklung und Kultivierung ist zeit- und kostenintensiv. Meist ist die subkutane Lokalisierung der Xenografts im Wirtstier nicht mit dem entsprechenden Tumor im Patienten vergleichbar. Der Xenograft-Tumor unterscheidet sich notwendigerweise von einem spontan entstandenen Tumor *in vivo*. Obwohl die Xenografts humanen Ursprungs sind, sind sie nicht von humanem Stroma umgeben. Außerdem bieten immundefiziente Versuchstiere nicht den normalerweise vorhandenen natürlichen immunologischen Rahmen [4].

1.3 *In-ovo*-Modell: Tumorzellen auf der Chorion-Allantois-Membran von Vögeln

Während der Bebrütung des Vogeleis entsteht durch die Fusion von Chorion und Allantois die extraembryonale stark vaskularisierte Chorion-Allantois-Membran (CAM). Durch ihre Position direkt an der Eischale dient sie dem Austausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zwischen Embryo und Umgebung. Zusätzlich fungiert sie als Reservoir für Abfallstoffe des Embryos. Außerdem ist die CAM in die Mobilisierung von Calcium aus der Eischale für den Start der Knochenmineralisierung des Embryos involviert [12]. Die CAM wird vielfach als Modell verwendet, unter anderem in der Erforschung der Angiogenese und Tumorbilogie. Von Vorteil ist dabei ihr dichtes Gefäßnetzwerk, durch welches aufgetragene Tumorzellen mit Nährstoffen versorgt werden können. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die CAM nicht innerviert ist. Außerdem ist das Immunsystem des Vogelembryos noch nicht vollständig ausgebildet, da sich die vollständige Immunkompetenz in Vögeln erst nach dem Schlupf entwickelt [12]. Die CAM ist eines der ersten für das Wachstum von Tumor-Xenografts verwendeten Modelle. 1911 wurde durch Rous und Murphy erfolgreich das Wachstum eines Hühnersarkoms nach Aufbringen auf die CAM von Hühnerembryonen gezeigt [13]. Später wurde der CAM-Assay weiterentwickelt: Ein quadratförmiges Stück der Eischale wurde entfernt, um die CAM-Oberfläche freizulegen [12]. Durch das Aufbringen von Tumoren und Tumorzelllinien auf die CAM von Hühnereiern wurde deren Invasivität und Interaktion mit Blutgefäßen untersucht. Diese Methode gewährt Einblicke in das Verhalten von Tumorzellen. Das Chorion stellt eine epitheliale Barriere dar. Aus diesem Grund können nur Tumorzellen mit ausreichend invasivem Potential diese Barriere überwinden und Zugang zu Gefäßen erhalten [14]. Das Modell der humanen Tumorzellen auf der Chorion-Allantois-Membran ist der klinischen Situation um einiges näher als Zellkulturversuche *in vitro*. Humane Tumorzellen, die auf der Chorion-Allantois-Membran eines aviären Wirtes im Kollektiv als Tumorknoten wachsen, unterliegen Einflüssen, die grundverschieden von denen der *in vitro* kultivierten humanen Tumorzellen sind. Diese Unterschiede sind vielschichtig. Auf der CAM wachsende Tumorzellknoten bilden eine dreidimensionale, für die jeweilige Zelllinie charakteristische histologische Struktur aus, in die auch Wirtszellen im Zuge der Neovaskularisierung einbezogen sind. Die CAM-Tumorzellknoten erhalten Nährstoffe über das embryonale Blut des aviären Wirts. Hierfür ist das ausgeprägte Gefäßnetz der CAM sehr von Vorteil. Zudem wachsen die Tumoren als dreidimensionales Gebilde, welches wiederum die Aufnahme und Verteilung von Sauerstoff, Nährstoffen und anderen Faktoren erschwert. Außerdem werden die Tumorzellen durch umliegendes Wirtsgewebe beeinflusst. Die Unterschiede zwischen

Tumorzellknoten und Zellrasen werden in Veränderungen der Genexpression reflektiert. Dabei können diese Veränderungen der Genexpression einerseits für das knotige Wachstum bzw. die Ausbildung der dreidimensionalen Knotenstruktur notwendig sein. Andererseits könnten sie Anpassungsreaktionen der Tumorzellen an die im Knoten veränderten Wachstumsbedingungen sein.

Mensch und Pute sind phylogenetisch weit voneinander entfernt [15]. Ihre DNA-Sequenzen unterscheiden sich stark voneinander. Deshalb ist die Verfälschung der Expressionsmuster der humanen RNA im Microarray durch aviäre RNA unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen. Kreuzhybridisierungen von humaner und aviärer DNA wurden nicht gefunden. In Vorversuchen wurden HepG2-Tumoren auf der CAM bebrüteter Puteneier generiert. RNA wurde sowohl aus Gewebe von Tumorzellknoten humanen Ursprungs als auch aus dem CAM-Gewebe extrahiert. Es konnte gezeigt werden, dass die humanen Gensequenzen sowohl in Microarray- als auch in PCR-Versuchen nachgewiesen werden können. Bei der Verwendung der aus CAM-Gewebe extrahierten RNA wurden dagegen weder in Microarray- noch in PCR-Versuchen Hybridisierungssignale gefunden. Auf diese Weise konnte ausschließlich das Genexpressionsmuster der HepG2-Tumoren bestimmt werden. In Abb. 1.1 sind die Ergebnisse einer quantitativen Real-Time PCR mit sieben zufällig ausgewählten Genen dargestellt. In einer Analyse mittels Microarray zeigte sich, dass diese Gene im Tumorzellknoten („Tumor“) im Vergleich zum Tumorzellrasen („HepG2“) stark verändert waren. Zum Vergleich wurde ebenfalls die RNA der CAM ohne Tumor untersucht. Die CAM-Proben brachten keine Amplifikate hervor, sodass von einer Speziesselektivität der PCR ausgegangen werden kann.

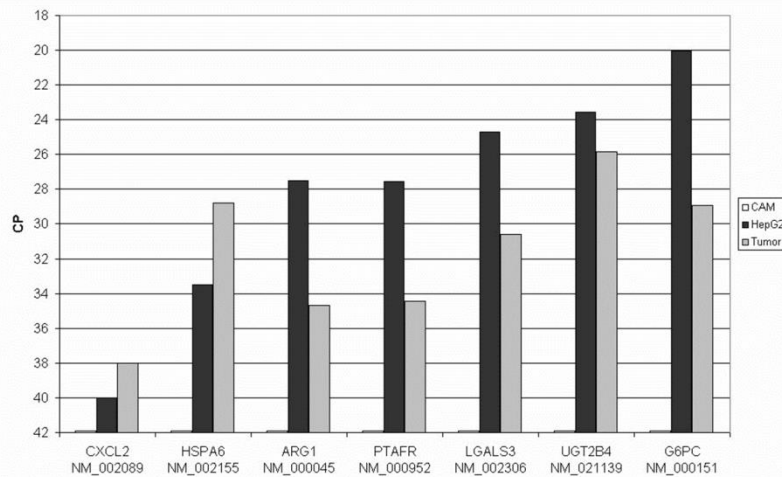


Abb. 1.1 Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR. CAM ohne Tumor ("CAM"); HepG2 aus adhärenter Zellkultur ("HepG2"); Gesamt-RNA aus HepG2-Tumoren, die auf der CAM gewachsen sind ("Tumor").

1.4 Antineoplastische Arzneistoffe

Antineoplastische Arzneistoffe entfalten ihre Wirkung mit Hilfe unterschiedlicher Mechanismen. Zielstrukturen klassischer antineoplastischer Arzneistoffe sind meist proliferierende Zellen zum Beispiel auf Ebene der DNA oder des Spindelapparates. Ein Beispiel für Wirkstoffe mit einem relativ unselektiven Wirkmechanismus sind die Vertreter der Platinkomplexe. Durch Platinierung der DNA kommt es zu einem Schaden der DNA und anschließender Apoptose. Es erfolgt vor allem eine Platinierung der DNA schnell proliferierender Zellen, die Wirkung ist nicht tumorspezifisch. Platinkomplexe haben eine enge therapeutische Breite. Bei Unterdosierung ist die Wirksamkeit eventuell nicht gegeben, bei Überdosierung fallen die unerwünschten Arzneimittelwirkungen stark ins Gewicht und haben einen dosislimitierenden Effekt auf die Therapie. Im Gegensatz dazu wirken die Substanzen der zielgerichteten Krebstherapie, der sogenannten *targeted therapies*, relativ spezifisch. Dabei werden bestimmte, für die Entstehung und Proliferierung von Tumoren und Leukämien wichtige Proteine von den jeweils dafür entwickelten Substanzen gezielt attackiert. Durch die zielgerichtete Therapie sollen weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten, die sich jedoch auch hier nicht gänzlich vermeiden lassen. Solche Zielstrukturen sind unter anderem Wachstumsfaktoren, Signalmoleküle, Proteine des Zellzyklus, Modulatoren der Apoptose und Moleküle, die die Angiogenese fördern [3]. Im Folgenden werden die für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendeten antineoplastischen Arzneistoffe, Sorafenib und Cisplatin, genauer beschrieben.

1.4.1 Sorafenib

Sorafenib (s. Abb. 1.2) ist ein niedermolekularer Proteinkinaseinhibitor und zählt zur Gruppe der zielgerichteten antineoplastischen Arzneistoffe. Durch die Inhibition verschiedener Kinasen wird Sorafenib auch als Multikinaseinhibitor bezeichnet. Sorafenib weist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antiproliferative und antiangiogene Eigenschaften auf [16]. Sorafenib wird zur Erstlinientherapie des hepatozellulären Karzinoms und zur Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms bei Versagen einer vorherigen Interferon-alpha- oder Interleukin-2-basierten Therapie oder Nicht-Eignung des Patienten für die vorher genannten Therapien eingesetzt [16]. Außerdem ist es zusätzlich bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem, differenziertem Schilddrüsenkrebs zugelassen, der auf eine Behandlung mit radioaktivem Jod nicht mehr anspricht [17].

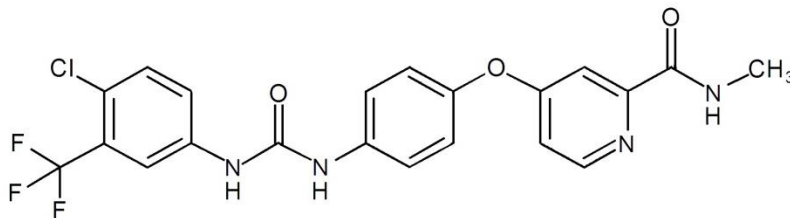


Abb. 1.2 Strukturformel von Sorafenib.

Die antitumorale Wirkung von Sorafenib wird durch die Hemmung von Proteinkinasen sowohl in den Tumorzellen als auch in den an der Tumorbildung beteiligten mesenchymalen Wirtszellen vermittelt. Sorafenib ist außerdem ein Inhibitor der proangiogenen Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β und FGFR-1 und wirkt auf diese Weise anti-angiogen. Zusätzlich inhibiert Sorafenib die Rezeptortyrosinkinasen Flt-3 und c-Kit, welche ebenfalls an der Tumorentstehung beteiligt sind [18]. Besonders wichtig für die Tumorzellen ist die Hemmung des MAP-K-Signalweges durch Sorafenib, da dieser eine entscheidende Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens hat. Eine Dysregulation des MAP-Kinase-Signalweges kann eine Aktivierung der Signalweiterleitung zur Folge haben und spielt eine entscheidende Rolle in humanem Krebs. Eine Dysregulierung der Signalweiterleitung über Isoformen der Raf-Kinase wurde in ca. 30 % humaner Krebsarten nachgewiesen [19]. Sorafenib inhibiert den MAP-Kinase-Signalweg durch die spezifische Hemmung der intrazellulären Serin/Threonin-Kinase C-Raf (auch bekannt als Raf-1) sowie deren Isoform B-Raf und der Wildtyp-Isoform (s. Abb. 1.3). Diese Kinasen sind die ersten Kinasen innerhalb der MAP-Kinase-Kaskade und haben

eine Schlüsselposition in der Regulierung der zellulären Proliferation und des Überlebens der Zelle. In Folge der Inhibition dieser Kinasen wird das Signal der Wachstumsfaktoren zur Zellteilung in den Zellkern unterbrochen [19].

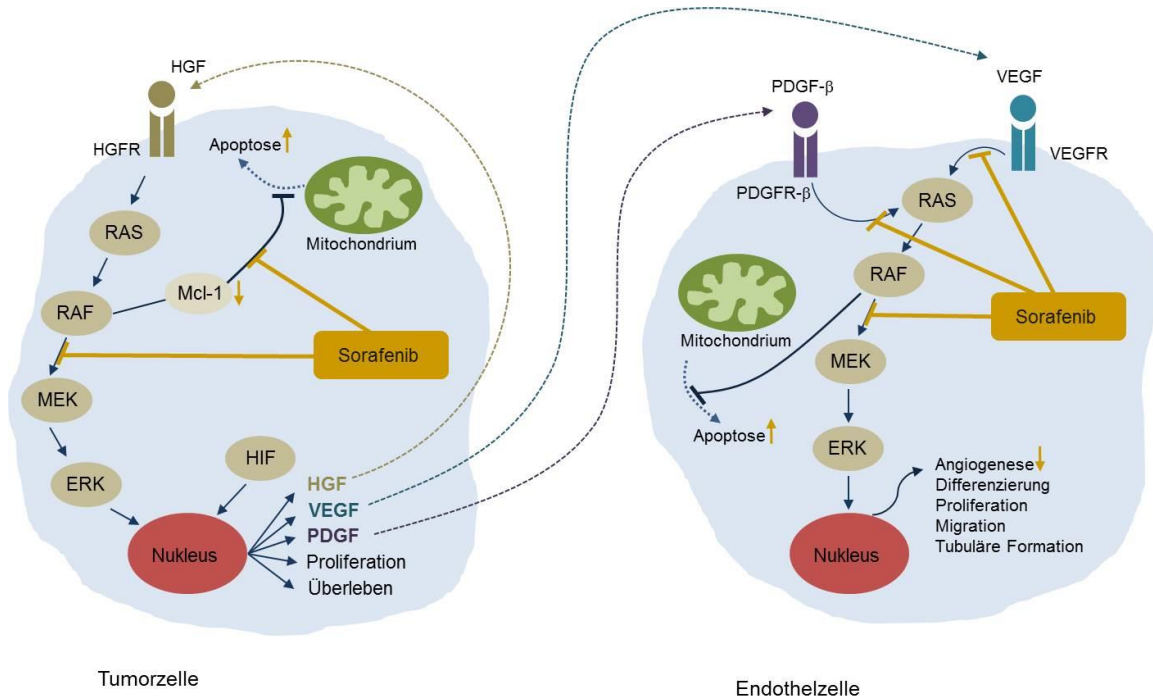


Abb. 1.3 Wirkungsmechanismus von Sorafenib auf Tumor- und Endothelzellen nach Wilhelm et al. [18]. HGF: Hepatocyte Growth Factor; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; VEGFR: VEGF-Rezeptor; PDGF: Platelet derived Growth Factor; PDGFR: PDGF-Rezeptor; HIF: Hypoxia-inducible Factor.

Die Applikation erfolgt p.o. mit 400 mg zweimal täglich. Falls eine Dosisreduktion nötig ist, wird diese auf 400 mg einmal täglich angepasst. Sehr häufige (> 10 %) unerwünschte Arzneimittelwirkungen äußern sich gastrointestinal in Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen. Dermatologische Toxizitätserscheinungen sind das Hand-Fuß-Syndrom, Alopezie und Hautrötung bzw. -ausschlag (Rash). Zudem kommt es sehr häufig zu Hypertonie und Hämorrhagie [16].

1.4.2 Cisplatin

Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II), s. Abb. 1.4) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Platinkomplexe. Cisplatin wird für die Therapie einer Vielzahl von Tumoren wie Hodentumoren, Ovarial- und Blasenkarzinomen, klein- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches, Zervix- und Endometriumkarzinomen sowie Osteosarkomen eingesetzt [20].

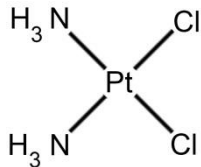


Abb. 1.4 Strukturformel von Cisplatin.

Da die perorale Einnahme eine Hydrolyse des Stoffes zur Folge hätte, wird Cisplatin intravenös appliziert. Im Blut liegt Cisplatin wegen der dort herrschenden hohen Chloridionenkonzentration (100 mM) in ungeladener Form vor. Eine Hydrolyse findet kaum statt. Sowohl durch passive Diffusion als auch durch aktive Aufnahme gelangt es in die Zellen. Dort ist die Chloridionenkonzentration mit 4 mM um ein Vielfaches geringer als im Blut. In Folge dessen kommt es zur Bildung von Aquakomplexen, welche gegenüber zellulären Nucleophilen sehr reaktiv sind [21]. Obwohl viele zelluläre Komponenten mit Cisplatin interagieren, stellt die DNA die primäre Zielstruktur dar. Es kommt zu einer Adduktbildung. Der größte Anteil dieser Cisplatin-DNA-Addukte bildet Quervernetzungen innerhalb desselben DNA-Stranges aus, welche als *intrastrand crosslinks* bezeichnet werden. Sie führen zu einer Konformationsänderung der DNA, welche sich partiell entwindet und um 40 bis 70° abknickt. Zudem wurde auch bereits von DNA-Protein-Quervernetzungen berichtet [21, 22]. Aus der Adduktbildung resultiert unter anderem ein Arrest des Zellzyklus um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen. Falls diese fehlschlägt, wird über Signalkaskaden die Apoptose eingeleitet [23, 24]. Cisplatin wird gemäß der Körperoberfläche dosiert. Die individuelle Dosis richtet sich nach der jeweiligen Grunderkrankung und der zu erwartenden Reaktion. Ebenfalls ist für die Dosierung wichtig, ob Cisplatin im Rahmen einer Mono- oder einer Kombinationstherapie verabreicht wird [20]. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen haben einen dosislimitierenden Einfluss auf die Therapie. Dabei handelt es sich unter anderem um Nephro-, Oto- und Neurotoxizität sowie ein hohes emetogenes Potential [25–27].

1.5 Zielsetzung

Gemeinsames Kennzeichen aller Karzinome sind pathologisch veränderte Zellverbände mit charakteristischer Morphologie, deren unkontrolliertes Wachstum unter Verletzung der physiologischen Grenzen in Geweben und Organen erfolgt. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass das allen Karzinomen gemeinsame pathologische Wachstum der in der Regel knotigen Tumorzellverbände mit regelhaft auftretenden Veränderungen der Genexpression der Tumorzellen verbunden ist. Basierend auf dieser Hypothese sollten für verschiedene Karzinomzelllinien folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Welche Genexpressionsveränderungen sind mit diesem Wachstum als Tumorzellknoten verbunden?
2. Inwieweit werden für die verschiedenen Karzinomzelllinien Gemeinsamkeiten beobachtet, die nicht als rein zufällige Übereinstimmungen betrachtet werden können?

2. Material

2.1 Geräte

Binocular „MZ95“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Brutgerät für Eier „BSS 300/ BSS 420“	Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG, Emmendingen
Einfrierhilfe „Nalgene® Mr. Frosty“	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Gewebeeinbettautomat „STP-120“	Microm International GmbH, Walldorf
Hämocytometer	HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen
Paraffinausgießstation „EG 1150H“	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Mehrfachpipette “Multipette”	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop “Axiovert 40 C“	Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop „Leica DM LB2“	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar
Mikroskopkamera „Leica DC300“	Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge (UK)
Pipetten 0,5 - 10; 10 - 100; 20 - 200; 100 - 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe “Accu-jet® pro”	Brand GmbH + CoKG, Wertheim
Sicherheitswerkbank “HERAsafe®”	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Software “Leica Qwin”	Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge (UK)
Tischzentrifuge “Centrifuge 5702“	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator für Gewebe “TissueRuptor®“	Qiagen, Hilden
Trockenschrank	memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Waage „MXX-123“	Denver Instrument GmbH, Göttingen
Wasseraufbereiter „Milli-Q synthesis“	Merck Millipore, Billerica, MA (USA)

LightCycler® 480	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Combitip® 5; 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Costar Stripette 5; 10; 25; 50 ml	Corning Incorporated, Corning, NY (USA)
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einbettkassetten	Bio-Optica, Mailand (I)
Leukosilk 2,5 cm x 5 m	BSN medical GmbH, Hamburg
Microarray "Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 4x44K" (two-color)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA (USA)
Objektträger 75 x 25 x 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Paraffin Typ 6	Microm International GmbH, Walldorf
QIAshredder® Homogenisator (Zellen)	Qiagen, Hilden
RNeasy®-Plus-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
- gDNA Eliminator-Säule	
- RLT-Lysispuffer	
- RLT-Plus-Puffer	
- RNase-freies Wasser	
- RNeasy Säule	
- RPE-Puffer	
- Sammelröhrchen	
Skalpells (steril)	Rüttgers GmbH und Co.KG, Solingen
Stericup®/Steritop™ (500 ml)	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen 25; 75; 150 cm ²	TPP AG, Trasadingen (CH)
Zellkulturschalen Ø 100 x 20 mm	TPP AG, Trasadingen (CH)
Zentrifugenröhrchen 15; 50 ml (steril)	TPP AG, Trasadingen (CH)

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	peq-Lab, Erlangen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Cisplatin Teva® 10 mg/10 ml	Teva Deutschland
Kochsalzlösung 0,9 % („Cisplatin-Stammlösung“)	
Clear-Rite® 3	Microm International GmbH, Walldorf
DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Tabletten	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
dNTP Mix (PCR grade)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt
Eosin G	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eukitt® - Eindeckmedium	Kindler GmbH, Freiburg
Formalin (10 %, neutral gepuffert)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Formamid (> 99,5 %, deionisiert)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
H ₂ O, PCR grade	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill 3 für die Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
MOPS 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaAC	Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
NaOH-Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Random Hexamer Primer	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
RNALater [®]	Qiagen, Hilden
Sekundärer Antikörper, biotinyliert (anti-Maus)	Dako Denmark A/S, Glostrup
Sorafenib (p-Toluensulfonat)	LC Laboratories, Woburn, MA (USA)
Streptavidin-Peroxidase	Dako Denmark A/S, Glostrup
SybrGreen II	Molecular Probes [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt
TBE-Puffer	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Transcriptor RT Reaction Buffer (5 x)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
TRIS-Hydrochlorid ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \times \text{HCl}$)	Merck KgaA, Darmstadt
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ziegenserum	Dako Denmark A/S, Glostrup
Zytokeratin 8 Antikörper (Maus, anti- human)	Dako Denmark A/S, Glostrup

2.4 Hergestellte Lösungen und Puffer

Lösungen für die Rückführung der Zellen aus Tumorzellknoten in die *in vitro* Kultur

Kollagenasepuffer

den Zellen entsprechendes Zellkulturmedium ohne Zusätze (s.Tab. 3.1)	50 mL
Kollagenase V	0,5 µL

Waschpuffer

den Zellen entsprechendes Zellkulturmedium ohne Zusätze (s.Tab. 3.1)	50 mL
Gentamicin [10 mg/mL]	0,5 µL

Sorafeniblösungen für die Inkubation der HepG2- Zellen *in vitro*

Sorafenibstammlösung [2,56 mg/mL]

Sorafenib	0,41 mg
DMSO	160 µL

Sorafeniblösung K1 [0,256 µg/mL]

Sorafenibstammlösung [2,56 mg/mL]	21,0 µL
Zellkulturmedium	21,0 mL

Sorafeniblösung K2 [0,128 µg/mL]

Sorafeniblösung K1	7,0 mL
Zellkulturmedium	7,0 mL

Kontrolle

DMSO	14,0 µL
Zellkulturmedium	14,0 mL

Cisplatinlösungen für die Inkubation der A2780-Zellen *in vitro*Cisplatinlösung K1 [0,64 µg/mL]

Cisplatinstammlösung [1 mg/mL]	14,72 µL
Zellkulturmedium, FKS-frei	23,0 mL

Cisplatinlösung K2 [0,32 µg/mL]

Cisplatinlösung K1	7,0 mL
Zellkulturmedium, FKS-frei	7,0 mL

Kontrolle

Kochsalzlösung [0,9 %]	8,96 µL
Zellkulturmedium, FKS-frei	14,0 mL

Lösungen für die H&E-FärbungEssigsäure [0,8 %]

Eisessig	0,4 mL
H ₂ O	ad 500 mL

Eosin G-Lösung

Eosin G	7,5 g
Eisessig	5 mL
Ethanol [70 %]	995 mL

Lösungen für die Immunperoxidase-FärbungPBS-Puffer

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,38 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,62 g
NaCl	5,84 g
H ₂ O	900 mL
mit NaOH [10 M] auf pH=7,4 einstellen	
H ₂ O	ad 1000 mL

TRIS-Puffer [0,05 M] pH=7,6

TRIS-HCl	7,88 g
NaCl	8,77 g
H ₂ O	900 mL

mit NaOH [10 M] auf pH=7,6 einstellen

H ₂ O	ad 1000 mL
Tween 20	0,5 mL

Proteinase K

Proteinase K [10 mg/mL]	20 µL
TRIS-Puffer [10 mM]	980 µL

PBS mit Triton[®] X-100

Triton [®] X-100	0,5 mL
PBS	100 mL

DAB-Lösung

DAB	1 Tablette
TRIS-Puffer [50 mM]	15 mL

Gut lösen, durch einen Filter der Porengröße 0,45µm filtrieren, aliquotieren (à 1 mL), bei -20°C lagern.

Aliquot der DAB-Lösung	1 mL
H ₂ O ₂ [30 %]	1,5 µL

Lösungen für das denaturierende AgarosegelMOPS [1 M]

MOPS	15,7 g
H ₂ O, autoklaviert	75 mL

NaAc [3 M]

NaAc	61,52 g
H ₂ O, autoklaviert	250 mL

Formaldehydgel-Laufpuffer (5 x)

MOPS [1 M]	25 mL
NaAc [3 M]	3,3 mL
EDTA [0,5 M]	2,5 mL
H ₂ O, autoklaviert	ad 250 mL

pH-Wert mit NaOH [10 M] einstellen; anschließend durch einen 0,2 µm Filter filtrieren. Aufbewahrung lichtgeschützt bei 4 °C.

Formaldehydgel-Laufpuffer (1 x)

Formaldehydgel-Laufpuffer (5 x)	100 mL
H ₂ O, autoklaviert	400 mL

Probenpuffer

Glycerin	5 mL
EDTA [0,5 M]	20 µL
Bromphenolblau	0,025 g
Xylen Cyanol FF	0,025 g
H ₂ O, autoklaviert	ad 10 mL

2.5 Primer für die Polymerase Kettenreaktion

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und aufgereinigt.

Primary Sequence Name	Primer	Sequenz
COL7A1	A	5'-TGACCCTGAGGAGCTGAAGCGAGTT-3'
COL7A1	B	5'-GGCTGTGGGCTGTGGTATTCTGGAT-3'
DLX3	A	5'-AGCGCTCCCCAGCACGATTACTACT-3'
DLX3	B	5'-GGTCCACTCAGGTTCTGTGCGTGAT-3'
ETS1	A	5'-GCCGACTCTCACCATCATCAAGACG-3'
ETS1	B	5'-GTGGAACACACTGGGCATGCTCAAT-3'
GOLGA8A	A	5'-GCGAAGAGGAACACGAAAGCAAATG-3'
GOLGA8A	B	5'-CCTCCTTCAATGTGCAAACCTCCTG-3'
HBA1	A	5'-TCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCA-3'
HBA1	B	5'-GAGGTCAGCACGGTGCTCACAGAAG-3'
HBE1	A	5'-TTACTGCTGAGGAGAAGGCTGCCGT-3'
HBE1	B	5'-AAGGAGGGTGTGAGGGTCACAGGAA-3'
HBQ1	A	5'-GGAAGAAGCTGGGCAGCAACGTC-3'
HBQ1	B	5'-CCCACAGTTCAGCGGTACTIONCGGA-3'
HMOX1	A	5'-GGAGGAGGAGATTGAGCGCAACAAG-3'
HMOX1	B	5'-CAACTGTCGCCACCAGAAAGCTGAG-3'
IGF1	A	5'-TGGTGGATGCTCTTCAGTTCGTGTGT-3'
IGF1	B	5'-GATCCTGCGGTGGCATGTCACTCT-3'
IGF2	A	5'-GCCTCGTGCTGCATTGCTGCTTA-3'
IGF2	B	5'-GGGTCTTGGGTGGGTAGAGCAATCA-3'
KLF12	A	5'-CCAGTTTCCATGACAGCATCTGCCT-3'
KLF12	B	5'-TCTGTGGATACGCCGTTTTCTGGAG-3'
KRT7	A	5'-ACTTCAGCTCCCCGGTATTCACCTC-3'
KRT7	B	5'-CTGCAGCTCTGTCAACTCCGTCTCA-3'
KRT75	A	5'-GGAGGCATCCAAGAGGTCACTGTCA-3'
KRT75	B	5'-TGCAGCTCCTCGTACTTGGTCTGGT-3'
LCK	A	5'-AACACTCACGGCTCCTTCCTCATCC-3'
LCK	B	5'-CTTCAATGAATGCCATGCCTTCTGC-3'
MAFB	A	5'-GCGAGCAACTACCAGCAGATGAACC-3'
MAFB	B	5'-GCTGGACGCGTTTTATACCTGCAAGA-3'
MT1E	A	5'-TCCAAGTGCCTGACTGCTTGTTCGT-3'
MT1E	B	5'-CACTTCTCCGATGCCCTTTGC-3'

Primary Sequence Name	Primer	Sequenz
MT1G	A	5'-CTCTAGTCTCGCCTCGGGTTGCAAT-3'
MT1G	B	5'-GAGCAGGGCTGTCCCGACATCA-3'
MT1X	A	5'-ACTCCTGCTTCTCCTTGCCCTCGAAAT-3'
MT1X	B	5'-GCTGCACTTGTCTGACGTCCCTTTG-3'
MT2A	A	5'-CTGTCCCGACTCTAGCCGCCTCTT-3'
MT2A	B	5'-CTTTACATCTGGGAGCGGGGCTG-3'
OR8H1	A	5'-AAGGCTGTGTTGCGCTCTTGCTCACT-3'
OR8H1	B	5'-GCCACTTGATCCCTTCCCAAAGAAT-3'
P4HA2	A	5'-GTGCAGGCCGAATTCTTCACCTCTA-3'
P4HA2	B	5'-TCAAAGTACCGCAGATTCCCTCCAG-3'
PARD3B	A	5'-TGGTGAGGAGAAGCAGTGACCCAGT-3'
PARD3B	B	5'-GCGAGAGTGAGGGAGAGGATGGTTT-3'
PHKG1	A	5'-AGATCATGCGAGCTCTGCTGGAGGT-3'
PHKG1	B	5'-CCATAGATTCGGAAAGCGTAGGCGT-3'
PIGL	A	5'-CACCTGACGATGAAGCCATGTTTT-3'
PIGL	B	5'-AAGATAATGTAGAGGCGGCGGAACC-3'
TRPM3	A	5'-GGCCTGCAGAACTTTGAACTCCAGC-3'
TRPM3	B	5'-CGAGATCACATTGGGTCCCTCCTTCC-3'
TSPAN 10	A	5'-CTCTCCAACCTTCCCCTTCTCCCTGC-3'
TSPAN 10	B	5'-GCAGCCCTCCAGGTACACCACTCTC-3'
TSPAN32	A	5'-GAGTCAGGGTTGCCAAATGCCAGAT-3'
TSPAN32	B	5'-GGCAAACACAGGAAGGAGCTGAAG-3'
VEGFC	A	5'-CGGGAGGTGTGTATAGATGTGGGGA-3'
VEGFC	B	5'-GATTTAGGGGTTGATTTCTGGGGCA-3'
WISP1	A	5'-AGCCCCTACGACCATGGACTTTACC-3'
WISP1	B	5'-GGCGTTAACATTGGAGATCCGAGTG-3'

2.6 Zellkultur

2.6.1 Tumorzelllinien

A204	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
A2780	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jaehde, Arbeitskreis Klinische Pharmazie, Universität Bonn
A431	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
A498	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Calu-1	ATCC – American Type Culture Collection Manassas, VA, USA
Daoy	ATCC – American Type Culture Collection Manassas, VA, USA
HCT-8	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jaehde, Arbeitskreis Klinische Pharmazie, Universität Bonn
HeLa	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
HepG2	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
HT-1197	ATCC – American Type Culture Collection Manassas, VA, USA
LNCaP	ATCC – American Type Culture Collection Manassas, VA, USA
LS513	ATCC – American Type Culture Collection Manassas, VA, USA
PC-3	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
SK-Hep1	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
SW-480	DSMZ – Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

2.6.2 Lösungen Zellkultur

Zellkulturmedium RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Zellkulturmedium DMEM (4,5 % Glucose)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Zellkulturmedium MEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Zellkulturmedium Ham's F12	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Zellkulturmedium McCoy's 5A	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Dulbecco's PBS 1x (ohne Calcium und Magnesium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Gentamicin 10 mg/ml	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Penicillin/Streptomycin (10.000 I.E. Penicillin G/mL; 10 mg Streptomycin/mL)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Trypsin-EDTA-Lösung (10x) (5 mg/mL Trypsin; 2,2 mg/mL EDTA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)

2.7 Fertilisierte Puteneier

Die Puteneier wurden von der Thole Geflügelzucht GmbH aus Bösel bezogen. Sie wurden vor Durchführung der Versuche bis zu einer Woche nach Lieferung bei einer Temperatur von 6 °C gelagert. Die Eier wurden mittels einer hellen Lichtquelle durchleuchtet und so auf Risse untersucht und gegebenenfalls verworfen. Unversehrte Eier wurden mit Bleistift mit einer fortlaufenden Nummer beschriftet, um sie vor, während und nach den Versuchen eindeutig identifizieren zu können. Anschließend wurden die Eier gewogen und das durchschnittliche Eigewicht bestimmt. Alle Eier, deren Gewicht um mehr als 10 % vom Mittelwert abwich, wurden aussortiert. Auf diese Weise wurde die Variabilität innerhalb des Versuches eingeschränkt.

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die humanen Tumorzelllinien wurden ausschließlich unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank kultiviert. Auf diese Weise wurde eine Kontamination der Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen vermieden. Alle verwendeten Tumorzelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ als einschichtiger Zellrasen im entsprechenden Nährmedium kultiviert. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Arbeitsabläufe im Zusammenhang mit der Zellkultur näher erläutert.

3.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums

450 mL des der jeweiligen Zelllinie entsprechenden Zellkulturmediums (s. Tab. 3.1) wurde mit 50 mL FKS, 5 mL L-Glutamin und 5 mL Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt und anschließend sterilfiltriert.

Tab. 3.1 Verwendete Tumorzelllinien und entsprechende Zellkulturmedien.

Zelllinie	Zellkulturmedium
HepG2	DMEM (4,5 % Glucose)
A2780	RPMI-1640
HCT-8	RPMI-1640
SK-Hep-1	RPMI-1640
A-498	MEM
PC-3	225 mL Ham's F12 225 mL RPMI-1640
A204	McCoy's 5A
DAOY	MEM
CALU 1	McCoy's 5A
HT1197	MEM
SW-480	RPMI-1640
A431	RPMI-1640

3.1.2 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer). Diese besteht aus neun großen Quadraten, die in jeweils sechzehn kleinere Quadrate unterteilt sind. Jedes der großen Quadrate hat eine Fläche von 1 mm². Daraus ergibt sich bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µL [28]. Zur Differenzierung lebender und toter Zellen wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Während lebendige Zellen dazu fähig sind, Trypanblau auszuschließen, und folglich hell bleiben, nehmen tote Zellen den Farbstoff auf und färben sich tiefblau.

Zunächst wurden 20 µL der Zellsuspension mit 180 µL Trypanblaulösung gemischt. Anschließend wurde eine ausreichende Menge der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen wurden ausgezählt. Dazu wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt, aus den sich ergebenden Werten wurde der Mittelwert berechnet. Dieser wurde mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor (10) multipliziert. Das Ergebnis ist die Zellkonzentration pro Milliliter (s. Formel 3.1).

$$\text{Zellen x mL}^{-1} = \text{Zellzahl}_{4 \text{ Großquadrate}} / \text{Zahl der Großquadrate} \times 10 \times 10^4 \times \text{mL}^{-1}$$

Formel 3.1 Berechnung der Zellkonzentration pro Milliliter nach Auszählung der Großquadrate einer Neubauer-Zählkammer.

Wird dieser Wert mit dem Gesamtvolumen multipliziert, resultiert daraus die Zellzahl insgesamt.

3.1.3 Kryokonservierung

Nach Erhalt einer Zelllinie in einem Einfrierröhrchen wurden die Zellen zunächst vermehrt und anschließend eingefroren, um einen stets gleichbleibenden Zellpool für geplante Versuche zur Verfügung zu haben. Zu Beginn des Tages, an dem das Einfrieren erfolgte, wurde eine Einfrierhilfe („Mr. Frosty“) mit 4 °C kaltem Isopropanol befüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die benötigte Menge an Vollmedium (entsprechend der einzufrierenden Zelllinie) wurde auf Eis gestellt. Zudem wurde ein spezielles Einfriermedium angesetzt. Dieses bestand aus 90 % Vollmedium und 10 % DMSO und wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Die Einfrierröhrchen wurden mit Zelllinie, Passagenzahl, Datum und Kürzel des Experimentators beschriftet und ebenfalls auf Eis gelagert. Die Zellen wurden nach Protokoll passagiert (s. 3.1.6) und nach dem letzten Zentrifugationsschritt (280 rcf) im vorbereiteten eiskalten Vollmedium aufgenommen (50 % des benötigten Gesamtvolumens). Anschließend wurde das eiskalte Einfriermedium langsam der Zellsuspension zugegeben und vorsichtig mit der bereits vorhandenen Suspension gemischt. Darauf folgend wurden je 1,8 mL der Zellsuspension in eines der auf Eis gelagerten Einfrierröhrchen gegeben und für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Einfrierröhrchen in die Einfrierhilfe gestellt und verblieben mindestens über Nacht im Gefrierschrank (-70 °C). Die Langzeitlagerung erfolgte in der Gasphase des Stickstofftanks, in der eine Temperatur von -150 bis -160 °C herrscht.

3.1.4 Auftauen von Zellen aus dem Stickstoff-Tank

Eine Zellkulturflasche (T75) wurde mit Zellkulturmedium (22 mL) gefüllt und in den Brutschrank gestellt. Weitere 9 mL des gebrauchsfertigen Zellkulturmediums wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und im Wasserbad (37 °C) warm gestellt. Darauf folgend wurden die Zellen dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schwenken des Einfrierröhrchens im Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Anschließend wurde die Zellsuspension umgehend in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen mit dem mittlerweile erwärmten Zellkulturmedium pipettiert und mit diesem vorsichtig vermischt. Die Zentrifugation erfolgte im Anschluss für 3 min bei 280 rcf. Der Überstand mit Resten von DMSO wurde verworfen, das Pellet in warmem Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die zu Beginn vorbereitete Zellkulturflasche mit warmem Zellkulturmedium pipettiert. Die Flasche wurde leicht geschwenkt, um die Zellen zu verteilen und verblieb daraufhin für mindestens 12 h im Brutschrank.

3.1.5 Mediumwechsel

Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, da nach dieser Zeit die Nährstoffe aufgebraucht sind, der pH-Wert verändert ist und sich Abfallstoffe angesammelt haben. Das alte Zellkulturmedium wurde abgesaugt. Im Zuge eines Waschschrilles wurde eine geringe Menge an angewärmtem PBS in die Zellkulturflasche pipettiert und diese anschließend leicht geschwenkt. Auch das PBS wurde wieder abgesaugt und durch neues, vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt.

3.1.6 Subkultivierung

Für alle Versuche wurden adhärente Zelllinien verwendet. Diese Zellen bewachsen den Boden der Zellkulturflasche als einschichtiger Zellrasen. Nach einiger Zeit ist der Boden dicht bewachsen und es tritt Kontaktinhibition zwischen den Zellen ein. Da nicht mehr ausreichend Platz vorhanden ist, hemmen sich die Zellen gegenseitig in ihrem Wachstum. Deshalb ist es notwendig, die Zellen durch Subkultivierung zu verdünnen. Unter dem Begriff „Subkultivierung“ versteht man im Falle von adhärennten Zelllinien die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche und das anschließende Überführen in eine neue Zellkulturflasche in geringerer Zellzahl. Das Ablösen erfolgte enzymatisch mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung in je nach Zelllinie unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei baut Trypsin die Zell-Matrix-Verbindungen an und löst die Zellen vom Zellkulturflaschenboden. EDTA als Ca^{2+} -Chelator löst vor allem die Zell-Zell-Verbindungen [28]. Die Vorbereitung erfolgte bei allen Zelllinien nach folgendem Schema. Zu Beginn wurde die der Flaschengröße entsprechende Menge an Medium in

neue Zellkulturflaschen pipettiert und in diesen im Brutschrank warm gestellt. Das Zellkulturmedium wurde aus der Zellkulturflasche, an deren Boden die Zellen adhärirt waren, entfernt. Das weitere Vorgehen erfolgte individuell nach jeweiliger Zelllinie.

3.1.6.1 HepG2

Im Falle der HepG2-Zellen wurde 0,25 %ige Trypsin/EDTA-Lösung vorsichtig zu den Zellen pipettiert und die Flasche leicht geschwenkt. Diese Waschlösung wurde entfernt, woraufhin 1 %ige Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben wurde. Die Flasche wurde so lange im Brutschrank belassen, bis die Zellen sich lösten. Dies geschah nach ca. 10 min, es erfolgte eine visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop. Das doppelte Volumen an Zellkulturmedium bezogen auf die Menge an Trypsin/EDTA-Lösung wurde hinzu pipettiert, um die Wirkung des Trypsins mit dem im Medium enthaltenen FKS zu inaktivieren. Die Zellen wurden vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche gespült und die entstandene Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 280 rcf. Der Überstand wurde verworfen und frisches Medium zum Zellpellet pipettiert. Das Zellpellet wurde durch erneutes Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Mittels einer Multipette mit einem 5 mL Combitip-Aufsatz wurden die HepG2-Zellen, die zum Zusammenhaften neigen, vereinzelt. Daraufhin wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung in die bereits vorbereiteten Zellkulturflaschen ausgesät. Die Verteilung erfolgte durch leichtes Schwenken der Flasche. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für mindestens 12 h in den Brutschrank gestellt.

3.1.6.2 A2780

Die Passagierung der Zelllinie A2780 erfolgte im Wesentlichen wie die der HepG2-Zellen. Jedoch wurde vor der enzymatischen Ablösung lediglich mit PBS gespült. Die enzymatische Ablösung erfolgte mit 0,5 %iger Trypsin/EDTA-Lösung. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in Zellkulturmedium mittels einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden in gewünschter Verdünnung in den bereits vorbereiteten Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.6.3 HCT-8

Im Falle der HCT-8-Zellen erfolgte der Waschschrift ebenfalls mit 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung. Anschließend wurde die entsprechende Menge an 1 %iger Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche gegeben, welche für ca. 8 min im Brutschrank verblieb. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu den A2780-Zellen.

3.1.6.4 Weitere Zelllinien

In Tab. 3.2 sind die Zellkulturbedingungen in Bezug die Art und Dauer des Waschschrilles und des Ablösens der Zellen während des Passagierens aufgelistet.

Tab. 3.2 Benötigte Lösungen und Bedingungen bei der Passagierung.

Zelllinie	Waschschritt	Ablösen
HepG2	1 x 0,25 % Trypsin/EDTA	1 % Trypsin/EDTA ca. 10 min, 37 °C
A2780	1 x PBS	0,5 % Trypsin/EDTA ca. 8 min, 37 °C
HCT-8	1 x 0,25 % Trypsin/EDTA	1 % Trypsin/EDTA ca. 8 min, 37 °C
SK-Hep-1	1 x PBS	1 % Trypsin/EDTA ca. 5 min, RT
A-498	1 x PBS	1 % Trypsin/EDTA ca. 5 min, 37 °C
PC-3	1 x PBS	1 % Trypsin/EDTA ca. 5 min, 37 °C
A204	1 x PBS	1 % Trypsin/EDTA ca. 10 min, 37 °C
DAOY	1 x 0,25 % Trypsin/EDTA	1 % Trypsin/EDTA ca. 5 min, 37 °C
CALU 1	1 x 0,25 % Trypsin/EDTA	1 % Trypsin/EDTA ca. 5 min, RT
HT1197	1 x 0,25 % Trypsin/EDTA	1 % Trypsin/EDTA ca. 12 min, 37 °C
SW-480	1 x PBS	1 % Trypsin/EDTA ca. 10 min, 37 °C
A431	1 x PBS	1 % Trypsin/EDTA ca. 10 min, 37 °C

3.2 Herstellung der Zellsuspension für den CAM-Versuch

Die jeweils benötigten Zellen wurden nach individuellem Protokoll vom Flaschenboden abgelöst. Zellen derselben Zelllinie aus verschiedenen Flaschen wurden gemischt und bei 100 rcf für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Ergebnis war eine konzentrierte Zellsuspension. War dies nach 5 min noch nicht erreicht, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Anschließend wurden 50 µL der Zellsuspension (ca. 1×10^7 Zellen), sofort auf die CAMs pipettiert.

3.3 Zellkulturversuche mit Sorafenib und Cisplatin

3.3.1 Grundlagen

Die EC_{50} -Werte von HepG2-Zellen und Sorafenib bzw. A2780-Zellen und Cisplatin wurden aus der Literatur recherchiert. Der Mittelwert wurde aus verschiedenen EC_{50} -Werten gebildet.

Sorafenib

Für Sorafenib wurden folgende EC_{50} -Werte herangezogen: 4,5 µM [29], 6,3 µM [30] und 5,7 µM [31]. Der Mittelwert ergab 5,5 µM.

Cisplatin

Für Cisplatin wurden folgende EC_{50} -Werte herangezogen: 1,72 μM [24], 2,1 μM [32], 1,4 μM [33] und 3 μM [34]. Der Mittelwert ergab 2,1 μM .

Der berechnete durchschnittliche Mittelwert für den jeweiligen Arzneistoff diene als höchste Konzentration. Für den Fall, dass bei den berechneten Konzentrationen zu wenige Zellen für die RNA-Isolierung überleben, wurde eine weitere Konzentration festgelegt. Dafür wurde die bereits festgelegte Konzentration halbiert. Als Kontrolle diene im Fall von A2780-Zellen serumfreies Zellkulturmedium mit dem Zusatz der gleichen Menge an isotonischer Kochsalzlösung, die in der Cisplatinstammlösung enthalten war. Im Fall von HepG2-Zellen wurde Zellkulturmedium mit DMSO (0,1 %) versetzt.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Am Versuchstag wurden die jeweiligen Zellen nach Protokoll (s. 3.1.6) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Nach Zentrifugieren und Zählen der Zellen wurde eine definierte Zellzahl (je $8,8 \times 10^6$ A2780-Zellen bzw. je $1,129 \times 10^7$ HepG2-Zellen) in drei Zellkulturschalen mit dem Durchmesser 10 cm ausgesät. Nach fünf Stunden, innerhalb derer die Zellen am Boden der Zellkulturschalen adhärirt sind, wurde der Versuch fortgeführt. Die Zellkulturschalen wurden dem Inkubator entnommen, das Zellkulturmedium wurde entfernt. Jede Zellkulturschale wurde mit PBS gespült. Anschließend wurden die verschiedenen konzentrierten Lösungen in die entsprechenden Zellkulturschalen gegeben. Die Zellkulturschalen verblieben für 24 h im Inkubator. Danach wurden die Zellkulturschalen dem Inkubator entnommen und das Sorafenib- oder Cisplatin-haltige Zellkulturmedium bzw. die Kontrolllösung wurde entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen nach Protokoll (s. 3.1.6) vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und in insgesamt 10 mL Zellkulturmedium aufgenommen. Nach der Zählung wurde jeweils das Volumen an Zellsuspension, das einer Zahl von 4×10^6 Zellen entsprach, in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Herstellung des Zellhomogenats und die Isolierung der RNA erfolgte nach Protokoll (s. 3.7).

3.4 Hypoxie-Versuche

Zellen, die auf der CAM als Tumorzellknoten wachsen, unterliegen unterschiedlichen Stressfaktoren. Einer davon, die Hypoxie, wurde ausgewählt, um den Einfluss auf die Genexpression näher zu untersuchen. Es wurden HepG2-Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, um deren Genexpression anschließend mit der von HepG2-

Zellen, die unter normoxischen Bedingungen gewachsen sind, zu vergleichen. Außerdem konnten auf diese Weise Rückschlüsse daraus gezogen werden, ob bestimmte Genexpressionsveränderungen, die beim Übergang zum nodulären Wachstum aufgetreten waren, ebenfalls mit Hypoxie in Verbindung stehen.

Die Hypoxie-Versuche wurden durch Dr. Nadja Pfetzer an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg durchgeführt. Dazu wurden HepG2-Zellen nach Auftauen in Zellkulturflaschen ausplattiert und nach Anwachsen für 48 h unter unterschiedlichen O₂-Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in eine speziell dafür vorgesehene Hypoxiekammer gebracht und entweder unter 1 %, 5 % oder 20 % O₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, homogenisiert und die RNA wurde isoliert (vgl. 3.7). Diese Versuche wurden sowohl mit HepG2-Zellen, die aus dem BfArM stammten, als auch mit HepG2-Zellen der Universitäts-Frauenklinik Würzburg durchgeführt, um einen laborübergreifenden Vergleich zu erhalten.

3.5 Generierung der Tumorzellknoten

3.5.1 Auswahl der Zelllinien

Es wurden mehrere humane Tumorzelllinien im Hinblick darauf geprüft, ob sie in ausreichender Zahl und Größe Tumorzellknoten auf der CAM erzeugen können. Diese sind im Folgenden (s. Tab. 3.3) aufgeführt. Als Wachstumskontrolle diente die Zelllinie HepG2, die sich in vorangegangenen Versuchen durch eine hohe Erfolgsrate in Bezug auf die Bildung von Tumorzellknoten und ausreichende Tumorzellknotengröße bewährt hat.

Tab. 3.3 *Verwendete humane Tumorzelllinien.*

Zelllinie	Tumorart
A204	Rhabdomyosarkom
A2780	Ovariakarzinom
A431	Epidermoides Karzinom
A-498	Nierenkarzinom
CALU 1	Epidermoides Karzinom der Lunge (Pleura)
DAOY	Desmoplastisches zerebelläres Medulloblastom
HCT-8	Ileozökales kolorektales Adenokarzinom
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom
HT1197	Blasenkarzinom
PC-3	Prostatakarzinom
SK-Hep-1	Leber-Adenokarzinom
SW-480	Kolorektales Adenokarzinom

3.5.2 Beimpfung der CAM

- Start des Versuches

Die fertilisierten Puteneier wurden am ersten Versuchstag (Tag 0) in einen Brutschrank für Vogeleier gebracht, in dem sie für insgesamt 25 Tage bei 37 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit und mit vier Umdrehungen pro Tag bebrütet wurden. Diese Bedingungen sollen diejenigen im Nest simulieren.

- Vitalitätsprüfung

An Tag 7 wurden die Eier in einem abgedunkelten Raum mit einer starken Lampe durchleuchtet. Auf diese Weise konnten unbefruchtete und abgestorbene von befruchteten Eiern mit sich entwickelnden Embryonen unterschieden werden.

- Verlagerung der Luftblase

An Tag 10 wurden die zuvor liegenden Eier in aufrechte Position gebracht, die apikale Seite zeigte dabei nach oben. Zweck der Positionsänderung ist die Verlagerung der Luftblase nach oben. Die Eier verblieben für die restliche Versuchszeit in dieser Position.

- Senkung der CAM

An Tag 11 wurde die Eischale am apikalen Ende mit Hilfe einer spitzen, zuvor desinfizierten Schere punktiert, um die CAM abzusenken. Das entstandene Loch wurde mit Fixierpflaster (Leukosilk®) abgeklebt.

- Aufbringen der Zellsuspension

An Tag 12 wurde eine größere Öffnung mit einem Durchmesser von ca. 1 cm in das apikale Ende des Puteneis geschnitten. Ein Silikonring von 0,8 cm Außendurchmesser wurde auf der nun freiliegenden CAM platziert. In diesen Ring wurden ca. 50 µL der vorbereiteten Tumorzellsuspension appliziert (vgl. 3.2). Darauf folgend wurde die Öffnung in der Eischale mittels eines sterilen Uhrglases abgedeckt und dieses mit drei Streifen Fixierpflaster dicht abgeschlossen. Abgestorbene Eier sowie Eier mit einer nur schwach ausgebildeten beziehungsweise verletzten CAM wurden verworfen. Die übrigen Eier verblieben bis zum Versuchsende im Brutschrank.

- Versuchsende

Am letzten Versuchstag (Tag 24) wurde das Uhrglas entfernt. Auf der CAM entstandene Tumoren wurden herausgeschnitten und der Embryo wurde umgehend dekapitiert. Tumoren bzw. Teile davon wurden zur späteren histologischen Auswertung

in Formaldehydlösung (4 %, gepuffert) eingelegt. Teile des Tumors, die zur späteren Untersuchung der Genexpression bestimmt waren, wurden in RNAlater[®] gegeben. Bei RNAlater[®] handelt es sich um ein kommerziell erworbenes Reagenz zur Stabilisierung der RNA.

3.6 Histologie

3.6.1 Vorbereitung des Tumorgewebes zur histologischen Auswertung

Die Tumoren beziehungsweise Teile davon, die zur späteren histologischen Auswertung bestimmt waren, wurden zur Fixierung für ca. 24 bis 48 h in Formaldehydlösung (4 %, gepuffert) bei 8 °C belassen. Bevor die Gewebestücke in Paraffin eingebettet wurden, wurde jedes von beiden Seiten zusammen mit einem Zentimetermaß fotografiert, um Aussehen und Größe zu dokumentieren. Anschließend wurde das Gewebestück zwischen einem Filterpapier in eine beschriftete Einbettkassette entsprechender Größe gelegt. Die bestückten Einbettkassetten wurden in den Probenkorb des Gewebeeinbettautomaten gebracht. Der Gewebeeinbettautomat durchlief das in Tab. 3.4 dargestellte Programm. Gewebeteile, die das Programm des Einbettautomaten durchlaufen haben, wurden an einer Gießstation in einen Paraffinblock eingegossen.

Tab. 3.4 Programmverlauf des Gewebeeinbettautomaten.

Reagenz	Zeit (hh:mm)
Ethanol 70 %	01:30
Ethanol 80 %	01:30
Ethanol 96 %	01:30
Ethanol 100 %	01:00
Ethanol 100 %	01:00
Ethanol 100 %	01:00
Clear-Rite [®] 3	01:30
Clear-Rite [®] 3	01:30
Paraffin	02:00
Paraffin	02:00

3.6.2 Anfertigung der Gewebeschnitte

Aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren bzw. Tumorteilen wurden an einem Mikrotom Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Die Objektträger waren beschriftet mit Einummer, Tumorzelllinie und Datum. Die getrockneten Schnitte wurden bis zur jeweils durchzuführenden Färbung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur verwahrt.

3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist eine Färbemethode zur histologischen Anfärbung von Gewebeschnitten. Dabei werden saure Strukturen mittels Hämalaun blau angefärbt, basische Strukturen durch Eosin rot. Saure Strukturen sind vor allem die Zellkerne mit der DNA. Basische Strukturen stellen hauptsächlich die Zellplasmaproteine dar. Für die Verdünnung und Herstellung der Lösungen wurde Wasser aus dem Wasseraufbereiter „Milli-Q synthesis“ verwendet. Dieses hat die Qualität Reinstwasser vom Typ1 und wird im Folgenden einfach als H₂O bezeichnet. Jeweils 200 mL der Lösungen wurden in die dafür vorgesehenen Glasbehälter gegeben. Die zuvor angefertigten und getrockneten Schnitte wurden in ein spezielles Glasgestell gesteckt, welches mittels eines Bügels von Behälter zu Behälter bewegt werden kann. Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger 2 h bei 60 °C gelagert, so dass überflüssiges Paraffin ablaufen konnte. Der Ablauf der Färbung ist im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Ablauf der H&E-Färbung.

Dauer	Lösung	Schritt
5 min	Clear-Rite [®] 3	Entparaffinierung
5 min	Clear-Rite [®] 3	
3 min	Ethanol (100 %)	
3 min	Ethanol (100 %)	
3 min	Ethanol (96 %)	
3 min	Ethanol (80 %)	
3 min	Ethanol (70 %)	
5 min	H ₂ O	Färbung
1 min	Hämalaunlösung	
1 min	H ₂ O	
1 min	Essigsäure 0,8 %	
1 min	H ₂ O	
1 min	Leitungswasser, lauwarm	
1 min	Leitungswasser, lauwarm	
1 min	Ethanol (70 %)	
1 min	Eosin G-Lösung	
5 s	Ethanol (70 %)	
5 s	Ethanol (80 %)	
5 s	Ethanol (96 %)	
5 s	Ethanol (100 %)	
10 s	Ethanol (100 %)	
10 s	Clear-Rite [®] 3	Klärung
10 s	Clear-Rite [®] 3	
10 s	Clear-Rite [®] 3	

Durch die ansteigende Alkoholkonzentration am Ende des Färbeprozesses wurde das Wasser aus dem Schnitt verdrängt. Nach einer abschließenden Behandlung mit dem Xylol-Ersatz Clear-Rite[®] 3 wurde der Gewebeschnitt mit Eindeckmittel bedeckt und

darauf folgend möglichst frei von Luftbläschen mit einem Deckglas versehen. Das Eindeckmedium trocknete bei Raumtemperatur innerhalb von 24 h. Die Verwahrung der Objektträger erfolgte in dafür vorgesehenen Kästen bei Raumtemperatur.

3.6.4 Immunperoxidasefärbung des Zytokeratin 8

Die Methode, mit deren Hilfe die Immunperoxidasefärbung durchgeführt wurde, ist die *labelled (strept)avidin biotin*-Methode. Die vorbereitete Probe wird zunächst mit einer Lösung eines primären Antikörpers gegen Zytokeratin 8 behandelt. Anschließend reagiert der biotinylierte sekundäre Antikörper mit dem primären Antikörper. Streptavidin, an welches die Meerrettichperoxidase gebunden ist, bindet an den biotinylierten sekundären Antikörper. Dabei wird die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin genutzt. Nach der Zugabe des Chromogens, in diesem Fall DAB (3,3'-Diaminobenzidin) versetzt mit H_2O_2 , wird das Substrat (H_2O_2) durch die Peroxidase katalysiert. Die freigesetzten Protonen oxidieren das Chromogen (DAB), es kommt zu einer Braunfärbung. Für die Verdünnung und Herstellung der Lösungen wurde Wasser, welches aus dem Wasseraufbereiter „Milli-Q synthesis“ stammte, verwendet. Dieses hat die Qualität Reinstwasser vom Typ1 und wird im Folgenden kurz als H_2O bezeichnet.

3.6.4.1 Vorbereitung der Zellen für die Immunperoxidasefärbung

- Aussäen der Zellen auf Objektträgern

Die zu 70 % konfluenten Zellen wurden nach Protokoll vom Flaschenboden abgelöst und die enzymatischen Reaktionen des Trypsins mit serumhaltigem Zellkulturmedium beendet (vgl. 3.1.6). Durch Zentrifugation der Suspension entstand ein Zellpellet, dessen Überstand abgesaugt wurde. Das Zellpellet wurde in 10 mL Zellkulturmedium wieder aufgenommen und resuspendiert. In eine oder mehrere Petrischalen wurde je ein Objektträger gelegt, der mit Zelllinie, Einummer, Passagenzahl und Datum beschriftet wurde. 500 μ L der entstandenen Zellsuspension wurden auf den in der Zellkulturschale liegenden Objektträger pipettiert. Anschließend wurden 10 mL des Zellkulturmediums um den Objektträger herum in die Zellkulturschale gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden Medium und Zellsuspension vermischt und verteilt. Die Zellkulturschalen wurden anschließend für 24 h in den Brutschrank gestellt, damit die Zellen auf dem Objektträger adhären konnten.

- Fixierung und Vorbereitung

Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium aus der Petrischale abgesaugt und die Objektträger wurden dreimal mit je 7 mL PBS (37 °C) gespült. Anschließend wurden die Objektträger in einen Färbetrog mit Halterungen für Objektträger überführt und zur Fixierung der Zellen 15 min in Formaldehyd-Lösung (4 %, gepuffert) inkubiert. Dieser Schritt und auch die folgenden fanden bei Raumtemperatur statt. Danach fand ein Waschschrift statt. Ein „Waschschrift“ beinhaltete dreimal eine je fünfminütige Spülung in PBS. Mit Hilfe eines Diamantschreibers wurden auf jeden Objektträger zwei Rechtecke (1 cm²) geritzt, in die im weiteren Ablauf der Färbung die Lösungen pipettiert wurden. Die Zellen außerhalb der Rechtecke wurden abgewischt. Anschließend wurden die Objektträger 30 min in 0,5 %iger Triton[®] X-100-Lösung inkubiert, worauf ein Waschschrift mit PBS folgte (vgl. Tab. 3.6).

Tab. 3.6 Vorbereitung der Zellen auf die Färbung.

Reaktionsschritt	Lösung	Inkubation
Fixierung	Formaldehyd (3,7 %)	15 min, RT
Erhöhung der Membranpermeabilität	Triton X-100	30 min, RT

3.6.4.2 Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Immunperoxidase-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden für 2 h bei 60 °C im Trockenschrank stehend gelagert, damit überschüssiges Paraffin abtropfen konnte. Anschließend wurden vorhandene Paraffinreste mittels einer absteigenden Alkoholreihe entfernt. Dazu wurden die Objektträger zweimal für je 5 min in Clear-Rite[®] 3, zweimal für je 3 min in 100 % Ethanol, und für je 3 min in 96, 80, 70 % Ethanol gebracht. Es folgte ein Waschschrift mit PBS. Die histologischen Schnitte wurden mit je 100 µL Proteinase K-Lösung bedeckt und für 15 min bei 30 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in PBS. Danach wurden die Objektträger in einem Färbetrog mit Halterungen für Objektträger für 15 min in 0,3 % H₂O₂ in Methanol inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit PBS (vgl. Tab. 3.7).

Tab. 3.7 Vorbereitung der Paraffinschnitte auf die Färbung.

Reaktionsschritt	Lösung	Inkubation
Entparaffinierung	Clear-Rite [®] 3	2 x 5 min, RT
	100 % Ethanol	2 x 3 min, RT
	96; 80; 70 % Ethanol	je 3 min, RT
Antigenretrieval, Demaskierung	Proteinase K	15 min, 30 °C
Peroxidase-Block	0,3 % H ₂ O ₂ in Methanol	15 min, RT

3.6.4.3 Ablauf der Immunperoxidase-Färbung

Sämtliche der folgenden Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Auf jeden der vorbereiteten Objektträger mit Zellen bzw. Paraffinschnitten wurden 100 µL Ziegenserum zur Blockierung unspezifischer Bindungen gegeben. An eine 15minütige Inkubation schloss sich eine 30minütige Inkubation mit einem Antikörper gegen Zytokeratin 8 (80 µL/Schnitt bzw. Zellen) an, auf die Nullkontrollen wurde Ziegenserum gegeben. Anschließend wurde ein Waschschrift durchgeführt. Der zweite Antikörper (biotinyliert) verblieb ebenfalls für 30 min auf dem Objektträger (80 µL/Schnitt bzw. Zellen). Nach einem Waschschrift wurden 80 µL der gebrauchsfertigen Streptavidin-Lösung auf den Objektträger gegeben, die Inkubationszeit betrug 30 min. Daraufhin folgte ein Waschschrift. Auf jeden Objektträger wurden anschließend 80 µL gebrauchsfertige DAB-Lösung pipettiert, welche für 10 min dort verblieb. Es folgten ein Waschschrift und ein fünfminütiges Spülen mit H₂O, nach dem jeder Objektträger für 10 s in Hämalaunlösung getaucht und anschließend in einen Färbetrog mit H₂O gebracht wurde. Im nächsten Schritt verblieben die Objektträger für 1 min in essigsaurer Lösung (0,8 %) und wurden danach für 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Entwässerung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Die Objektträger wurden für jeweils 20 s in Gefäße mit 70, 80, 96, 100, 100 % Ethanol und dreimal für jeweils 20 s in Färbekammern mit Clear-Rite® 3 gebracht. Abschließend wurden die Präparate mit Eindeckmedium bedeckt und mit einem Deckglas versehen. Eine Übersicht ist in Tab. 3.8 gegeben.

Tab. 3.8 Färbevorgang für Zellen und Paraffinschnitte.

Reaktionsschritt	Lösung	Inkubation
Blockierung unspezifischer Bindungen	Ziegenserum	15 min, RT
Antigen-Antikörper-Reaktion	Primärantikörper gegen Zytokeratin 8 (Maus, anti-human)	30 min, RT
sekundäre Antigen-Antikörper-Reaktion	Sekundärantikörper (biotinyliert, anti-Maus)	30 min, RT
Bindung an Biotin des Sekundärantikörpers	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	30 min, RT
Katalyse des Substrates (H ₂ O ₂) durch Peroxidase → Umwandlung des Chromogens (DAB) → Braunfärbung	Chromogen (DAB)	10 min, RT
Gegenfärbung	Hämalaunlösung nach Gill 3	10 s, RT

3.7 RNA-Isolierung

Für alle Arbeiten mit RNA wurde Wasser aus dem Wasseraufbereiter „Milli-Q synthesis“ verwendet. Dieses hat die Qualität Reinstwasser vom Typ1 und wird im Folgenden einfach als „H₂O“ bezeichnet.

3.7.1 Herstellung des Homogenats

3.7.1.1 Lösungen

Der RLT-Lysispuffer (RLT-Plus-Puffer) lag als gebrauchsfertige Lösung vor. Falls sich eine Präzipitation gebildet hatte, wurde er bei 20 bis 25 °C erwärmt. Es wurden 10 µL β-Mercaptoethanol pro mL RLT-Puffer hinzugefügt.

3.7.1.2 Homogenat aus *in vitro* gewachsenen Tumorzellen

Die Zellen wurden nach ihrem jeweiligen Protokoll vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 280 rcf für 5 min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl pro mL mittels des Hämocytometers bestimmt. Eine Menge der Lösung, die 4 x 10⁶ Zellen entsprach, wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden 6 mL PBS pro Röhrchen zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension erneut 5 min lang bei 300 rcf zentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und pro Röhrchen wurden 600 µL des gebrauchsfertigen RLT-Lysispuffers hinzugefügt, um die Zellen zu lysieren. Das Homogenisieren durch Auf- und Abpipettieren erfolgte aufgrund der nun viskosen Flüssigkeit langsam und vorsichtig. Das Lysat wurde auf einen QIAshredder[®] überführt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der untere Teil des QIAshredders[®] wurde mit einem passenden Deckel versehen und bei -80 °C gelagert.

3.7.1.3 Homogenat aus Tumorgewebe

30 - 150 µg des frisch entnommenen Tumorgewebes wurden für 24 h bei 7 °C in RNALater gelagert (10 µL pro 10 µg Gewebe). Danach wurde die Lösung entfernt und das Tumorgewebe bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert. 15 bis 20 µg des Gewebes, welches zuvor in RNALater[®] stabilisiert worden war, wurden mit 600 µL RLT-Lysispuffer in einem 2 mL-Röhrchen mit Hilfe des Gewebehomogenisators TissueRuptor[®] 0,5 bis 1 min bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert, eine Schaumbildung war zu vermeiden. Anschließend wurde das Lysat für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin wie unter „RNA-Isolierung“ (3.7.2) beschrieben verwendet.

3.7.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®]-Plus-Mini-Kits. Das Protokoll für die RNA-Isolierung ist für beide Arten von Homogenat gleich. Das Homogenat wurde auf eine gDNA Eliminator[®]-Säule pipettiert und 30 s bei 8000 rcf zentrifugiert, um genomische DNA zu entfernen. Anschließend wurde der Durchfluss in ein Röhrchen mit 600 µL 70 %igem Ethanol pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Probe wurde auf eine RNeasy[®]-Säule überführt und für 30 s bei 8000 rcf zentrifugiert, das Eluat wurde anschließend verworfen. 700 µL des RW1-Puffers wurden darauf folgend auf die RNeasy[®]-Säule pipettiert und 30 s bei 8000 rcf zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden 500 µL RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und 30 s bei 8000 rcf zentrifugiert, auch bei diesem Schritt wurde das Eluat verworfen. Danach wurden erneut 500 µL RPE-Puffer auf die Säule gegeben, diesmal wurde 2 min lang zentrifugiert. Sowohl der Säulendurchfluss als auch das Sammelröhrchen wurden verworfen, die Säule auf ein neues Sammelröhrchen überführt und bei maximaler Geschwindigkeit 1 min lang zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5 mL-Röhrchen gesteckt, mit 50 µL RNase-freiem Wasser bedeckt und für 1 min bei 8000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die RNA. Davon wurde 1 µL verwendet um den RNA-Gehalt mittels des Spektrophotometers NanoDrop[®] zu bestimmen. Der Rest wurde sofort bei -80 °C eingefroren.

3.7.3 Denaturierendes Agarosegel

3.7.3.1 Vorbereitung der Proben-RNA

Proben-RNA	4,5 µL
Formaldehydgel-Laufpuffer (5 x)	2 µL
Formaldehyd (37 %)	3,5 µL
Formamid	10 µL

Die Mischung wurde für 15 min bei 65 °C erwärmt, um die RNA denaturieren zu lassen. Anschließend wurde sie auf Eis gelagert. Zuletzt wurden 2 µL Probenpuffer hinzugefügt.

3.7.3.2 Vorbereitung des Agarosegels (1 %ig)

Zunächst wurden 0,25 g Agarose eingewogen, mit 15,5 mL autoklaviertem H₂O gemischt, in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend bis zu einer Temperatur von 50 bis 60 °C abgekühlt. In dieser Zeit wurde die Gießapparatur eingeklemmt und die Probenkammer eingesetzt. Nach Erreichen einer Temperatur von 50 bis 60 °C wurde die Gellösung mit 5 mL des Formaldehydgel-Laufpuffers (5 x) und 4,45 mL

Formaldehyd (37 %) versetzt. Daraufhin wurde sie in den vorbereiteten Gelschlitten gefüllt und konnte für ca. 30 min bei Raumtemperatur gelieren. Nach Ablauf der Zeit wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingelegt, gegebenenfalls wurde Laufpuffer nachgefüllt. Die Proben wurden in die Probestaschen des Agarosegels gefüllt und bei 50 V im Gel aufgetrennt. Dabei wandert die RNA im elektrischen Feld zum positiven Pol. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit SybrGreen® II in TBE (1:5000) für 45 min gefärbt, auf einem Transilluminator betrachtet und fotografiert.

3.8 Microarray

3.8.1 Grundlagen

Bei Microarrays handelt es sich um modifizierte Glasobjektträger, auf denen eine Vielzahl unmarkierter DNA-Sequenzen, auch Sonden genannt, systematisch angeordnet ist. Die Nukleinsäuren der zu untersuchenden Probe werden markiert und hybridisieren mit den entsprechenden Nukleinsäuren auf dem Microarray. Die gemessene Signalintensität ist proportional zur Menge der hybridisierten Probe [35]. Mit Hilfe von Microarrays lässt sich der Genexpressionsstatus einzelner Zellpopulationen darstellen. Es erfolgt eine simultane Überprüfung vieler Gene aus einem komplexen Gemisch. Dabei wird bestimmt, welche Gene aktiviert und welche Gene reprimiert sind. Dargestellt werden immer relative Genexpressionsunterschiede zwischen zwei verschiedenen Populationen, wie z.B. *in vitro* vs. *in vivo*. Als Maß für die Genexpression dient die Menge an mRNA (*messenger-RNA*). Diese hat einen Anteil von 2 % an der Gesamt-RNA und steht stellvertretend für alle von einer Zelle exprimierten Proteine.

Im Laufe der Arbeiten wurden die Microarrays vom Hersteller aktualisiert, sodass nicht auf allen durchgeführten Microarrays dieselben Gensonden auf der Oberfläche aufgebracht waren. Aus diesem Grund wurde die Schnittmenge der Gensonden auf den verschiedenen Microarrays ermittelt und als Grundlage für die Auswertungen verwendet. Für die Auswertung der Microarrays wurden nur diejenigen Gensequenzen herangezogen, denen ein *Primary Sequence Name* zugeordnet war.

3.8.2 Durchführung und Auswertung

Die RNA-Proben wurden auf Trockeneis zu Miltenyi Biotech gesendet. Folgende Schritte sind aus dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotech übernommen. Dort wurde die RNA zunächst auf ihre Qualität hin geprüft. Die Ergebnisse eines Bioanalyzers wurden für eine visuelle Kontrolle mittels eines Gelbildes und eines Elektropherogramms dargestellt (s. Abb. 3.1). Zusätzlich wurde mit Hilfe verschiedener Parameter die *RNA integrity number* (RIN) bestimmt. Ein Wert von 10 bedeutet hohe Qualität der RNA, ein Wert von 1 bedeutet niedrige Qualität der RNA. Für Genexpressions-Profiling-Experimente ist eine RIN > 6 ausreichend (s.Tab. 3.9).

Tab. 3.9 RIN für alle durchgeführten DNA-Arrays.

Microarray	RIN
Tumor HepG2	8,2-10
Tumor A2780	9,7-10
Tumor HCT-8	9,6-10
Rückführung HepG2	9,4-10
Hypoxie HepG2	9,4-10
Sorafenib + HepG2	7,7-10
Cisplatin + A2780	7,7-10

In Abb. 3.1 werden Gelbild und Elektropherogramme am Beispiel von HCT-8-Tumorzellknoten gezeigt.

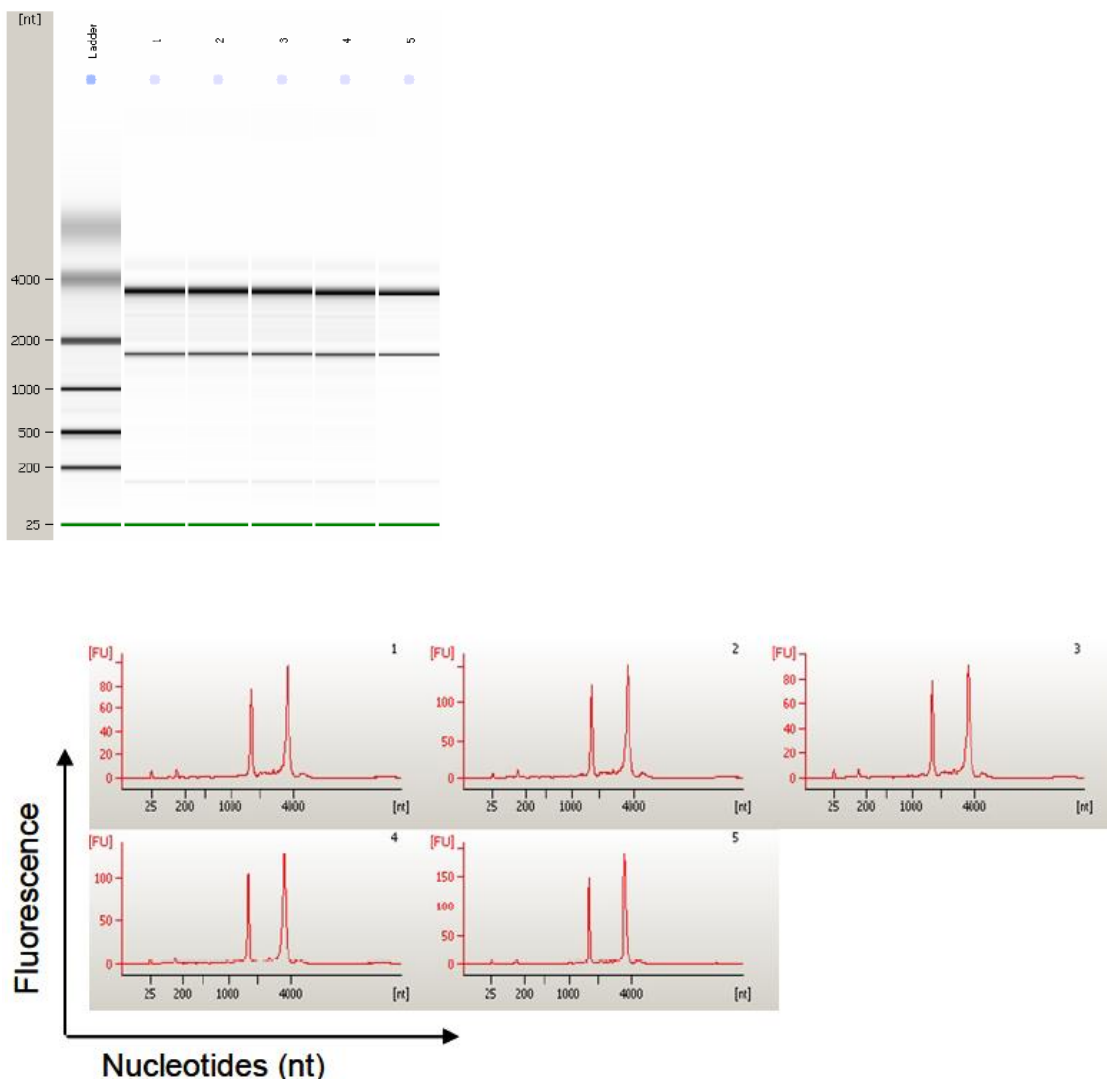


Abb. 3.1 Gelbild und Elektropherogramm am Beispiel der HCT-8-Proben (Gesamt-RNA; 1-4: Tumoren; 5: *in vitro* Zellen). Als Referenz diente die RNA „molecular weight ladder“, gezeigt in der ersten Reihe. Bei der niedrigsten Bande (grün) handelt es sich um einen internen Standard.

Die beiden prominenten Peaks in den Elektropherogrammen zeigen ribosomale RNA: links 18S RNA, rechts 28S RNA. Die Skalierung der Ordinate erfolgte automatisch, bezogen auf das stärkste Signal eines Einzellaufes. Im Falle von HCT-8 haben alle RNA-Proben RIN Werte zwischen 9,6 und 10. Nachdem die Qualität der jeweiligen RNA-Proben gezeigt war, wurde eine lineare T7-basierte RNA-Amplifikation durchgeführt. Ebenfalls im Gemisch vorhanden waren Cyanin5- oder Cyanin3-CTP. Ziel war es, Cy5- und Cy3-markierte cRNA zu erhalten. Bei Cy5 und Cy3 handelt es sich um Fluorophore aus der Familie der Cyanfarbstoffe. Cy5 emittiert Licht bei 670 nm im roten Spektrum, Cy3 emittiert Licht bei ca. 570 nm im grünen Spektrum. Proben-RNA wurde mit Cy5 markiert, Kontroll-RNA mit Cy3. Die Hybridisierung erfolgte nach Protokoll des *Agilent 60-mer oligo microarray*. Dafür wurde das *Agilent Gene Expression Hybridization Kit* verwendet. 825 ng der korrespondierenden Cy3- und Cy5-markierten fragmentierten cRNA wurden gemischt. Über Nacht (17 h, 65 °C) fand die Hybridisierung an *Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 4x44K* statt. Dazu wurden die von Agilent empfohlene Hybridisierungskammer und der -ofen verwendet. Anschließend wurde der Microarray einmal mit dem *Agilent Gene Expression Wash Buffer 1* für 1 min bei RT gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschgang mit angewärmtem *Agilent Gene Expression Wash Buffer 2* (37 °C) für 1 min.

Die Fluoreszenzsignale des hybridisierten Microarray wurden mit dem zugehörigen Microarray-Scanner detektiert, ein Falschfarbenbild wurde erstellt (s. Abb. 3.2). Rotfärbung zeigt, dass die Cy5 Signalintensität höher ist als die Cy3 Signalintensität. Daraus folgt, dass die zugehörige Sequenz in der Probe überexprimiert ist im Vergleich zur Kontrolle. Grünfärbung zeigt eine Überexpression der Sequenz in der Kontrolle im Vergleich zur Probe. Eine Gelbfärbung bedeutet, dass die zugehörige Sequenz in Probe und Kontrolle gleich stark exprimiert ist.

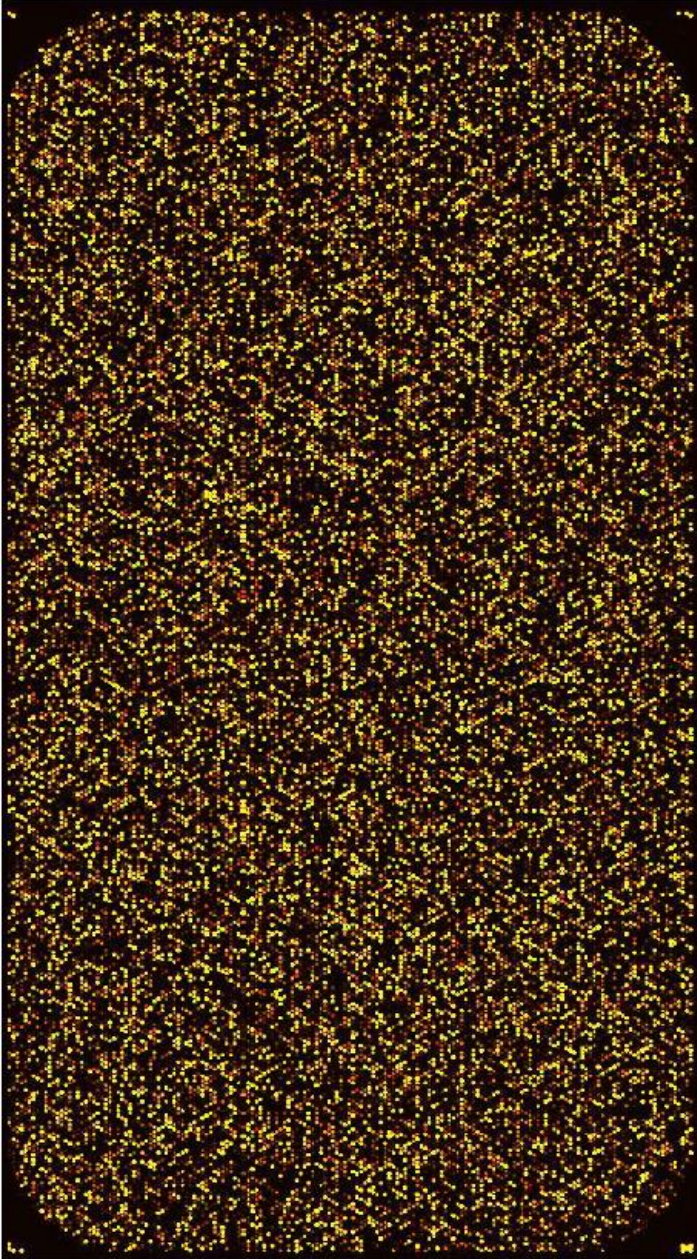


Abb. 3.2 Cy5/Cy3 Falschfarbenbild am Beispiel eines HCT-8-Tumorzellknotens verglichen mit den entsprechenden Zellen aus Zellkultur in vitro.

Die Microarray-Bilddateien wurden mittels der Agilent Feature Extraction Software ausgelesen und verarbeitet. Die Software bestimmt dabei die jeweiligen Intensitäten und Ratios (vgl. 3.8.4).

3.8.3 Übersicht Microarrays - Proben und Kontrollen

Mit Hilfe der Microarrays wurde das Genexpressionsmuster von ausgewählten Proben mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Verglichen wurden zum Beispiel die *in ovo* gewachsenen Tumorzellknoten verschiedener Zelllinien mit den *in vitro* gewachsenen Zellen derselben Zelllinien. Alle Proben mit zugehörigen Kontrollen sind in folgender Übersichtstabelle aufgelistet (Tab. 3.10).

Tab. 3.10 Übersichtstabelle Microarrays - Proben und Kontrollen.

Versuch	Probe	Kontrolle
noduläres Wachstum HepG2	4 x Tumorzellknoten HepG2	HepG2-Zellen (70 % konfluent)
noduläres Wachstum A2780	4 x Tumorzellknoten A2780	A2780-Zellen (70 % konfluent)
noduläres Wachstum HCT-8	4 x Tumorzellknoten HCT-8	HCT-8-Zellen (70 % konfluent)
Cisplatininkubation Tumorzellknoten	4 x Tumorzellknoten A2780 + Cisplatin	4 x Tumorzellknoten A2780 + NaCl
Sorafenibinkubation Tumorzellknoten	4 x Tumorzellknoten HepG2 + Sorafenib	4 x Tumorzellknoten HepG2 + DMSO
Rückführung	4 x HepG2-Zellen aus erneut in Kultur genommenen Tumorzellknoten	HepG2-Zellen (70 % konfluent)
Hypoxie	4 x HepG2-Zellen (1 % und 5 % O ₂ Bonn und 1 % und 5 % O ₂ Würzburg)	HepG2-Zellen (20 % O ₂ Bonn und 20 % O ₂ Würzburg)
Cisplatininkubation A2780-Zellen	4 x A2780-Zellen + Cisplatin (2,1 µM)	4 x A2780-Zellen + NaCl
Sorafenibinkubation HepB2-Zellen	4 x HepG2-Zellen + Sorafenib (5,5 µM)	4 x HepG2-Zellen + DMSO

3.8.4 Darstellung der Ergebnisse

Wie in 3.8.1 beschrieben, liegen als Ergebnis eines Microarrays keine absoluten Werte vor. Vielmehr handelt es sich um Veränderungen in Bezug auf die Expression gegenüber der Kontrolle. Die Unterschiede werden in Faktoren angegeben. Bei dem als „Ratio“ bezeichneten Wert handelt es sich um den Quotienten aus der Intensität des roten Signals (Probe) dividiert durch den Quotienten des grünen Signals (Kontrolle). Somit nimmt die Ratio einen Wert von 1 an, wenn die entsprechende Gensequenz in Probe und Kontrolle gleich stark exprimiert ist. Ist die Gensequenz in der Probe stärker exprimiert, kann die Ratio Werte von größer gleich 1 bis unendlich annehmen. Ist die Gensequenz in der Kontrolle stärker exprimiert, nimmt die Ratio Werte zwischen 0,99 und 0 ein. Der Nachteil dieser Darstellung ist, dass herauf- und herunterregulierte Gensequenzen anders behandelt werden. So hat beispielsweise eine Gensequenz, die um den Faktor 2 hochreguliert ist, auch eine Ratio von 2. Eine

Gensequenz, die um denselben Faktor herunterreguliert ist, hat jedoch eine Ratio von 0,5. Aus diesem Grund wird die Ratio häufig in den Logarithmus mit der Basis 2 umgewandelt, da auf diese Weise alle Gensequenzen gleich behandelt werden und mittels kontinuierlicher Werte dargestellt werden können [36]. Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tab. 3.11 dargestellten Grenzwerte verwendet. Diese bieten sich nach Erfahrung des Microarray-Herstellers zur Interpretation der Stärke der Genexpressionsveränderung an.

Tab. 3.11 Stärke der Genexpressionsveränderung.

Ratio	Faktor	Definition
$\leq 0,33$	-3	stark herunterreguliert
$\leq 0,5$	-2	herunterreguliert
0,51 - 1,99	> -2 und < +2	keine Veränderung
≥ 2	+2	hochreguliert
≥ 3	+3	stark hochreguliert

Zunächst wurden die Genexpressionsveränderungen separat für jedes Paar aus Probe und Kontrolle betrachtet. Dazu wurde die Anzahl der Gensequenzen, die in jedem Paar um Faktor 2 und Faktor 3 herauf- bzw. herunterreguliert waren, erfasst. Um zu bestimmen, welche Gensequenz als verändert betrachtet werden kann, wurde für jede einzelne Gensequenz der Median aus den vier individuellen Werten der vier Proben bestimmt. Als Grenzwerte wurden wie in Tab. 3.11 beschrieben jeweils Faktor 2 oder 3 für den entstandenen Median gewählt. Daraus ließ sich ableiten, ob eine bestimmte Gensequenz generell in allen vier Proben eher herauf- oder herunterreguliert bzw. unverändert war. Ein Beispiel für die Darstellung der jeweiligen Anzahl der Genexpressionsveränderungen in dieser Arbeit liefert Tab. 3.12.

Tab. 3.12 Vereinfachtes Beispiel für die Darstellung der Zahlen der Auswertung eines Microarrays; n: Anzahl der veränderten Gensequenzen in der jeweiligen Probe.

Gensequenz	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3	Ratio 4	\bar{x}
A	3,42	4,98	0,54	3,02	3,22
B	1,03	0,43	0,35	0,12	0,39
C	1,38	0,91	4,85	1,10	1,24
n ($\geq 2,00$)	1	1	1	1	/
n ($\leq 0,50$)	0	1	1	1	/

Nach den Werten in Tab. 3.12 wäre Gensequenz A um Faktor 3 hochreguliert, Gensequenz B um mindestens Faktor 2 herunterreguliert und Gensequenz C unverändert. In Probe 1 ist eine Gensequenz mindestens um Faktor 2 heraufreguliert und keine Gensequenz um Faktor 2 herunterreguliert. In Probe 2 ist jeweils eine Gensequenz um mindestens Faktor 2 herauf- und herunterreguliert.

3.8.5 Begriffsdefinitionen

3.8.5.1 Verändert exprimierte Sequenzen (VES)

Die verändert exprimierten Sequenzen (**VES**) sind alle Gensequenzen, die im Microarray in der jeweiligen Probe gegenüber der zugehörigen Kontrolle verändert exprimiert sind. Es kann sich sowohl um eine erhöhte als auch um eine erniedrigte Expression gegenüber der Kontrolle handeln.

3.8.5.2 Tumor-assoziierte VES (TA-VES)

Bei den Tumor-assoziierten **VES (TA-VES)** handelt es sich um eine weitere Eingrenzung der VES. Es handelt sich dabei um diejenigen Sequenzen, deren Expression im Microarray in Tumoren gegenüber der entsprechenden Zellkultur-Kontrolle verändert sind. Das heißt, die Veränderungen in der Genexpression treten beim Übergang zum nodulären Wachstum der Tumorzellen auf. Es handelt sich in dieser Arbeit im Speziellen um die TA-VES HepG2, TA-VES A2780 und TA-VES HCT-8.

3.8.5.3 A3T

Bei den A3T handelt es sich um die Schnittmenge der Gensequenzen aus den TA-VES HepG2, TA-VES A2780 und TA-VES HCT-8. Es wurden die Gensequenzen bestimmt, die in allen drei Tumorarten jeweils um Faktor 2 oder Faktor 3 in die gleiche Richtung herauf- oder herunterreguliert waren. Da diese Gensequenzen in allen 3 Tumorzellarten verändert waren, wurde zur Vereinfachung die Abkürzung **A3T** gewählt.

3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Nach Durchführung der Microarrays wurden interessante Gene, deren Expression nach den vorliegenden Ergebnissen in Tumorzellknoten im Vergleich zu *in vitro* kultivierten Tumorzellen verändert war, für eine Untersuchung mittels PCR ausgewählt. Da mittels einer PCR 500-700 Basenpaare (bp) abgedeckt werden, ist diese wesentlich spezifischer als die Untersuchung mit verwendetem Microarray, dessen Sonden aus 60mer Oligonukleotiden bestehen. Da eine quantitative Aussage darüber getroffen werden sollte, welche Gene in der jeweiligen Probe im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle über- bzw. unterexprimiert waren, wurde RNA aus der zu untersuchenden Probe und aus der Kontrolle isoliert. Diese RNA wurde mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA konnte dann für die PCR eingesetzt werden.

3.9.1 Reverse Transkription

Die RNA wurde zunächst mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben, die anschließend für die PCR zur Verfügung stand. Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Um das Risiko einer RNase-Kontamination so gering wie möglich zu halten, wurden alle Gefäße und Pipettenspitzen vor Gebrauch autoklaviert. Zunächst wurden alle benötigten Komponenten aufgetaut und auf Eis gelagert. Die folgenden Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß, welches ebenfalls auf Eis gelagert wurde, pipettiert:

Wasser (PCR grade)	9,5 µL
Template RNA	2 µL
Random Hexamer Primer	2 µL
Transcriptor RT Reaction Buffer, 5 x	4 µL
dNTP-Mix, 10 mM	2 µL
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 µL
	Σ 20 µL

Die oben genannten Mengenangaben beziehen sich auf einen Probenansatz. Für alle Proben wurde eine Mischung angesetzt. Anschließend wurden die Komponenten mittels eines Vortex-Schüttelgerätes gemischt. Um Reste aus dem Deckel und vom Rand zu entfernen, wurde das Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert. Die Komponenten wurden im Mastercycler[®] gradient für 10 min bei 25 °C und anschließend für 30 min bei 55 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 85 °C inaktiviert. Das Reaktionsgefäß wurde danach wieder auf Eis gelagert. Es ist

möglich, das Reaktionsgefäß mit der darin enthaltenen Probe für 1-2 h bei 2-8 °C oder für längere Zeit bei -15 bis -25 °C zu lagern.

3.9.2 Ablauf der PCR

Der Reaktionszyklus einer PCR erfolgt in drei Schritten: Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Amplifizierung. Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang geteilt, die DNA liegt in Einzelsträngen vor. Anschließend kommt es zur Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA. Während des letzten Schrittes, der Amplifizierung, wird der Sequenzabschnitt, der zwischen den beiden Primern liegt, durch die Taq-Polymerase kopiert. Die PCR wurde mit Hilfe des LightCycler® 480 durchgeführt. Auch hier erfolgte das Vorgehen nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurde ein Röhrchen des *LightCycler® 480 SYBR Green I Master (hot start reaction Master Mix)* aufgetaut. Dabei war darauf zu achten, dass der Master Mix lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Der gebrauchsfertig erworbene Master Mix enthält *FastStart Taq DNA Polymerase*, Reaktionspuffer, dNTP-Mix, SYBR Green® I Farbstoff und MgCl₂. Ein 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde für die PCR-Mischung auf Eis gesetzt. Folgende Komponenten wurden hinein pipettiert.

PCR-Primer (5 µM)	je 0,5 µL → insges. 1 µL
„Master Mix“ (2 x konzentriert)	5,0 µL
	∑ 6 µL

Die oben genannten Mengenangaben beziehen sich auf einen Probenansatz. Die Komponenten wurden vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die PCR-Mischung (je 6 µL) wurde in jede Vertiefung einer Multiwellplatte pipettiert. Anschließend wurden 5 µL der 1:4 verdünnten cDNA-Lösung hinzupipettiert. Die Multiwellplatte wurde mit der dafür vorgesehenen Folie versiegelt und bei 1500 rcf für 2 min zentrifugiert. Danach wurde die Multiwellplatte in den LightCycler® 480 gestellt. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt (s. Tab. 3.13).

Tab. 3.13 Programm des LightCycler® 480.

Programm-Name	Zyklen	Verweilzeit (Hold) (mm:ss)	Temperatur (°C)	Ramp Rate (°C/s)
Prä-Inkubation	1	10:00	95	4,4
Amplifikation	45	00:10	95	2,2
		00:15	72	2,2
		01:30	72	4,4
		00:01	82	4,4
Schmelzkurve	1	00:01	95	4,4
		00:15	65	2,2
		kontinuierlich	95	0,03
Abkühlung	1	00:10	40	2,2

Die Prä-Inkubation wurde einmalig zu Beginn des Laufes durchgeführt. Sie diente der Aktivierung der Polymerase, dem sogenannten „Hot-start“. Der Programmschritt „Amplifikation“ wurde über mehrere Zyklen wiederholt. Dabei diente das Erhitzen für 10 s bei 95 °C der Denaturierung der jeweils neu entstandenen Amplifikate. Die ersten beiden Schmelzkurvenmessungen (für 1 bzw. 15 s) sind Einzelmessungen innerhalb dieses Programmschrittes. Die sich anschließende Messung erfolgte kontinuierlich. Sie begann bei 65 °C und endete bei 95 °C.

3.10 Rückführung

3.10.1 Grundlagen

Die Expressionsmuster zwischen Zellen, die als Tumorzellknoten auf der CAM gewachsen sind, und Zellen, die als Rasen *in vitro* kultiviert wurden, waren verändert. Die Mechanismen, die dazu führten, sollten untersucht werden. Zwei Möglichkeiten sind denkbar:

- Die Veränderungen sind eine adaptive Reaktion auf die Umgebung und sind reversibel. Die Unterschiede im Expressionsmuster zwischen als Tumor auf der CAM gewachsenen Zellen und als Rasen in Kultur gewachsenen Zellen können durch die äußeren Bedingungen wie Nährstoffversorgung, Hypoxie, pH-Wert oder vergleichbare Stressoren bedingt sein.
- Die Veränderungen sind irreversibel. In diesem Falle können sie zum einen Folge einer klonalen Selektion sein. Beim Wechsel der als Rasen in Kultur gewachsenen Zellen auf die CAM könnte das Wachstum als Tumor von einer Subpopulation abhängen, die besonders gut an die Wachstumsbedingungen auf der CAM angepasst ist. Zum anderen wäre es denkbar, dass keine Subpopulationen entstehen, sondern alle Tumorzellen, die auf die CAM gegeben werden, irreversiblen

Veränderungen unterliegen. Diese könnten beispielsweise durch embryonale Wachstumssignale ausgelöst werden.

Um die beiden Möglichkeiten der reversiblen und irreversiblen Veränderungen zu unterscheiden, sollten HepG2-Zellen, die zuvor knotig auf der CAM gewachsen sind, wieder *in vitro* als einschichtiger Zellrasen kultiviert werden. Das Expressionsmuster dieser Zellen sollte untersucht werden.

3.10.2 Durchführung

Zunächst wurden nach Protokoll HepG2-Tumorzellknoten auf der CAM generiert (s. 3.5.2). Der jeweilige Tumor bzw. ein Teil davon wurde nach Resektion aus der CAM unter die Sterilwerkbank gebracht und dort mittels zweier Skalpellklingen in einer sterilen Petrischale so klein wie möglich geschnitten. Der zerkleinerte Tumor wurde in 10 mL des Kollagenase-Puffers aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde 40 min lang im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C belassen und gelegentlich kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Mischung bei 400 rcf für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und durch 5 mL Waschpuffer ersetzt. Das Pellet wurde resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 5 mL Waschpuffer ersetzt. Nach Resuspendieren wurde zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Als nächstes wurde Vollmedium hinzugegeben und die entstandene Suspension in einer Zellkulturflasche ausplattiert. Diese verblieb für mindestens 5 h im Brutschrank. Nach Ablauf der Zeit erfolgte ein Mediumwechsel.

Die Zellen wurden über ca. 8 Passagen kultiviert. Innerhalb dieser Zeit erfolgte eine Gewöhnung an die *in vitro*-Kultur. Außerdem verminderte sich die Anzahl eventuell mitkultivierter Putenzellen. Bevor die rückkultivierten HepG2-Zellen schließlich eingefroren wurden, erfolgte eine Kontrolle auf mögliche Anwesenheit aviärer Zellen mittels Anfärbung von Zytokeratin 8. Dieses lässt sich mithilfe eines Antikörpers in humanen Zellen und Geweben anfärben. In Putenzellen und -geweben ist dies nicht möglich, wie in Vorversuchen der Arbeitsgruppe festgestellt wurde. Nach Anfärbung der rückkultivierten Zellen nach acht Passagen zeigte sich, dass nahezu keine Putenzellen mehr vorhanden waren.

3.10.3 Microarray

Zunächst wurden Zellen aus vier Tumoren aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen erneut in Kultur genommen. Die RNA wurde nach Protokoll isoliert (s. 3.7). Mit diesen Proben wurde ein Microarray durchgeführt. Als Kontrolle dienten zu 70 % konfluent gewachsene, ausschließlich *in vitro* kultivierte HepG2-Zellen. Diese stammten aus derselben Passage wie die HepG2-Zellen, die an Tag 12 auf die CAM

appliziert worden waren. Alle Proben des ersten Microarrays wurden gegen dieselbe Kontrolle gemessen. Um zu vermeiden, dass scheinbar konsistente Veränderungen beispielsweise in allen vier Tumorzellproben nicht durch eine Expressionsveränderung in den Tumoren, sondern durch eine außergewöhnliche Abweichung in der Kontrolle bedingt ist, wurde ein zweiter Microarray mit neuen Proben und einer neuen Kontrolle durchgeführt. Die Ergebnisse beider Microarrays wurden später miteinander verglichen. Für den zweiten Microarray wurden in einem weiteren Versuch erneut Zellen aus vier CAM-Tumoren in Kultur genommen. Mit der RNA aus diesen Proben wurde ebenfalls ein Microarray durchgeführt. Als Kontrolle dienten zu 70 % konfluent gewachsene, ausschließlich *in vitro* kultivierte HepG2-Zellen. Diese stammten aus derselben Passage wie die HepG2-Zellen, die an Tag 12 auf die CAM appliziert worden waren.

Insgesamt wurden zwei Microarrays mit je vier unterschiedlichen Proben hergestellt. Die Genexpression aller Einzelproben wurde miteinander verglichen und die Gene, deren medianer Wert der Veränderung bei ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ in allen acht Proben lag, wurden in die Kategorien „hoch-“ bzw. „herunterreguliert“ eingeteilt. Alle Gensequenzen, die einen Wert von 0,51 bis 1,99 aufwiesen, fielen in die Kategorie „keine Veränderung“ und hatten keine Bedeutung für die weitere Auswertung. In die weitere Auswertung wurden nur die Sequenzen einbezogen, die sowohl in Microarray 1 als auch in Microarray 2 verändert waren. Sie werden im Folgenden als „VES Rückführung“ bezeichnet. Die auf diese Weise ermittelten Gensequenzen (herauf- und herunterreguliert) wurden mit veränderten Gensequenzen verschiedener anderer Microarrays.

3.11 Dosisfindung von Sorafenib und Cisplatin

3.11.1 Sorafenib

3.11.1.1 Dosisberechnung

Zunächst wurde näherungsweise eine Anfangsdosierung bestimmt. Die Tagesgesamtdosis für einen Erwachsenen (800 mg Sorafenib [16]) wurde auf das durchschnittliche Eigewicht von 95 g berechnet. Als Anfangsdosis wurden somit 1,1 mg pro Ei eingesetzt. Für eine erste Orientierung wurden zwei weitere Dosierungen jeweils um Faktor 5 nach unten gewählt. Die Dosierungen für den ersten Versuch waren 1,1, 0,22 und 0,044 mg Sorafenib pro Ei. Da sich bis zu 10 mg Sorafenib in 50 μ L DMSO lösen, wurden für die berechneten Dosierungen jeweils 50 μ L DMSO verwendet. Das Volumen des DMSO wurde später mit steigenden Dosierungen (ab Versuch Sf02)

jedoch permanent für alle Dosierungen auf 100 µL erhöht, um einen möglichen Volumeneinfluss auszuschließen. Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über die durchgeführten Versuche (s. Tab. 3.14).

Tab. 3.14 Übersicht über die Versuche mit und Dosierungen von Sorafenib *in ovo*.

Versuch	Sorafenib [mg/Ei]				DMSO [µL]	Faktor
	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4		
Sorafenib 1	1,1	0,22	0,044	/	50	0,2
Sorafenib 2	24	7,3	2,2	/	100	3,33
Sorafenib 3	7,3	2,2	1,1	0,22	100	
Sorafenib 4	2,1	1,8	1,4	1,1	100	

3.11.1.2 Applikationsweg

Die Humandosierung von Sorafenib wird in Form von Tabletten per os verabreicht. Um einen ähnlichen Applikationsweg im Ei zu erzielen, wurde Sorafenibtosylat in DMSO gelöst und ins Eiklar injiziert. Da der Putenembryo das Eiklar im Laufe seiner Entwicklung zu sich nimmt, wurde angenommen, dass auf diese Weise ebenso das verabreichte Sorafenib aufgenommen wird. Als Applikationszeitpunkt wurde Tag 7 gewählt, da etwa ab diesem Tag die Entwicklung der Putenleber beginnt. Auch wurde gewährleistet, dass ausreichend Zeit zur Aufnahme des Sorafenib durch den Embryo vorhanden war. Vor der Applikation wurde die Vitalität des Embryos ermittelt.

3.11.1.3 Durchführung

Die Eier wurden bis zu Tag 7 wie unter 3.5.2 beschrieben behandelt. Nach dem Durchleuchten der Eier und Aussortieren nicht verwendbarer Eier erfolgte eine Einteilung in Sorafenib- (2/3) und Kontrollgruppe (1/3). Die Eier der Sorafenibgruppe erhielten die jeweilige Dosis Sorafenib in 50 bzw. 100 µL DMSO, die Eier der Kontrollgruppe je 50 bzw. 100 µL DMSO. Die Applikation der Lösung erfolgte via Injektion ins Eiklar. Dazu wurde das Ei in liegende Position gebracht, das apikale Ende zeigte leicht nach unten. Etwa 1 cm oberhalb des apikalen Endes wurde eine Markierung mit Bleistift gesetzt. An dieser Stelle wurde nach Desinfektion mit Ethanol (70 %) mittels einer spitzen Schere eine kleine Öffnung in die Eischale gestochen. Die Injektion erfolgte durch die Öffnung, dabei wurde die Kanüle etwa 0,5 cm tief in das Ei geführt. Anschließend wurde die Öffnung mittels eines transparenten Klebestreifens versiegelt. Die Eier wurden zurück in den Brutschrank gelegt. An Tag 24 wurde der Versuch beendet und die Überlebenszahlen dokumentiert.

3.11.2 Cisplatin

3.11.2.1 Dosisberechnung

Cisplatin wurde als gebrauchsfertige Lösung (Konzentrat, 1 mg/mL) erworben. Als Anfangsdosis wurde die maximale Humandosis von 120 mg Cisplatin pro m² Körperoberfläche gewählt [20]. Diese wurde auf das durchschnittliche Eigewicht von 95 g berechnet. Somit wurde als Anfangsdosis 0,328 mg Cisplatin pro Ei festgesetzt. Ausgehend von dieser Dosierung wurden zwei weitere Dosierungen gewählt. Dabei handelte es sich zum einen um eine Dosierung, die um Faktor 5 gegenüber der Ausgangsdosis erhöht und zum anderen um eine Dosierung, die um Faktor 5 gegenüber der Ausgangsdosis erniedrigt war (s. Tab. 3.15).

Tab. 3.15 Übersicht über die Verdünnungsschritte der Cisplatinlösung aus dem Versuch „Cisplatin 1“; Stammlösung = 1 mg Cisplatin pro 1 mL NaCl [0,9 %]; Gesamtvolumen 2 mL.

Cisplatin [mg/Ei]	Faktor
1,64	5
0,328	1
0,066	0,2

3.11.2.2 Applikationsweg

Die Applikation von Cisplatin erfolgt im Falle von humanen Patienten via intravenöser Infusion in die Blutbahn [20]. Um ähnliche Bedingungen zu simulieren, wurde die Cisplatinlösung im Falle der Putenembryonen über die CAM appliziert. Cisplatin lag auf der CAM in NaCl-Lösung [0,9 %] ungeladen vor. Es wird angenommen, dass Cisplatin auf diese Weise über das Gefäßnetz der CAM in die Blutbahn des Embryos diffundieren konnte.

3.11.2.3 Durchführung

Die Eier wurden an Tag 0 in den Brutschrank eingelegt und an Tag 7 durchleuchtet. An Tag 10 wurden sie aufgestellt. Einen Tag später wurde die Eischale am apikalen Ende mit Hilfe einer spitzen, zuvor desinfizierten Schere punktiert, um die CAM abzusenken. Das entstandene Loch wurde mit Fixierpflaster (Leukosilk[®]) abgeklebt. An Tag 20 wurde eine Öffnung von ca. 1 cm Durchmesser in das apikale Ende der Eischale geschnitten, durch welche die Cisplatinlösung beziehungsweise im Falle der Kontrollgruppe isotonische Kochsalzlösung vorsichtig auf die CAM getropft wurde. Anschließend wurde die Öffnung mittels eines sterilen Uhrglases und Fixierpflaster

verschlossen. Die Eier verblieben bis Tag 24 im Brutschrank. An Tag 24 wurde der Versuch beendet und die Überlebenszahlen dokumentiert.

3.12 Bestimmung der Gewebekonzentration von Cisplatin

3.12.1 Behandlung der Eier mit Cisplatin

Die Eier wurden wie unter 3.11.2 beschrieben behandelt. Die applizierten Cisplatinkonzentrationen waren 1 bzw. 2 mg pro Ei und wurden an Tag 20 bzw. 23 verabreicht. Die Kontrolleier waren unbehandelt. An Tag 24 erfolgte das Versuchsende. Die Embryonen wurden dekapitiert und die Lebern entnommen. Die Lebern wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.12.2 Atomabsorptionsspektrometrie

Die Quantifizierung des Cisplatin im Lebergewebe des Putenembryos erfolgte mittels flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie. Bei dieser Methode werden Lösungen von Metallsalzen zunächst verdampft. Die gebildeten Atome werden durch Lichteinstrahlung angeregt. Daraufhin wird die absorbierte Lichtintensität gemessen und der Messwert zur quantitativen Analyse verwendet. Die Atomisierungseinrichtung besteht bei der flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie aus einem Graphitrohrföfen, in dem die Lösung zuerst verdampft und der Rückstand anschließend durch Erhitzen auf 2000-3000 °C atomisiert wird. Bei diesem Prozess spielt das Temperaturprogramm, welches fünf Phasen durchläuft, eine wesentliche Rolle. Zunächst wird die Probe getrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Dabei wird die Temperatur langsam gesteigert, um Siedeverzüge zu verhindern. Anschließend folgen die Phasen der Vorveraschung und der Veraschung, die dazu dienen, Matrixbestandteile wie beispielsweise Proteine zu entfernen. An diese schließt sich die Atomisierungsphase an, die bei 2700 °C erfolgt. Das Metall wird in den atomaren Zustand überführt und die Signalaufzeichnung findet statt. Die Reinigung stellt die finale Phase dar, in der durch einige Sekunden Ausheizen des Rohres mögliche Reste aus diesem entfernt werden und der Ofen abgekühlt wird. Die eingesetzte Methode zur Platinmessung wurde von C. Kloft et al. [37] entwickelt und von A.C. Pieck [38] modifiziert und validiert. Die Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Jaehde im Bereich Klinische Pharmazie der Universität Bonn vermessen.

3.12.3 Probenaufarbeitung und Messung

Die tiefgefrorenen Lebern wurden aufgetaut und gewogen, 1:1 mit H₂O in ein Röhrchen gegeben und mit Hilfe des TissueRuptor® 90 s lang homogenisiert. Die folgenden Schritte wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Jaehde durchgeführt. Das

Gewebehomogenat wurde mit dem 1,5fachen an HNO_3 (65 %) bezogen auf die Masse versetzt und so lange bei einer Temperatur von 80 °C auf dem Wasserbad belassen, bis die Probe lysiert und die Flüssigkeit klar war. Dieser Schritt nahm ca. 24 h in Anspruch. Nachdem das Lysat auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde es mit Purelab Plus® Wasser um den Faktor 10 verdünnt. Eine Kalibrierung erfolgte vor jedem Probenlauf mit Hilfe von sechs Kalibratoren mit den Konzentrationen 50, 100, 200, 300, 400 und 500 µg/L. Mittels linearer Regression wurde eine Kalibriergerade erstellt, anhand der die Platinkonzentration der Proben berechnet wurde. Die Linearität der Kalibriergeraden wurde überprüft. Eine Kalibriergerade wurde nur dann herangezogen, wenn der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden $\geq 0,99$ war und wenn die anhand der Kalibriergeraden berechnete Konzentration von mindestens vier der Kalibratoren um nicht mehr als 15 % (20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) von ihrer jeweiligen nominalen Konzentration abwich. War die Absorption einer Probe oberhalb des Kalibrierbereiches, wurde die Probe durch den Autosampler des Gerätes selbstständig während des Messvorgangs verdünnt. Zur Sicherstellung der Präzision wurden jeder Kalibrator und jede Probe mindestens zweimal in das Gerät injiziert. Bei einer Abweichung der Messsignale um mehr als 5 % erfolgte eine dritte und gegebenenfalls noch eine vierte Messung. Lag die Standardabweichung dann nicht unter 15 % beziehungsweise im Bereich der Bestimmungsgrenze unter 20 %, wurde die entsprechende Probe im folgenden Analysenlauf erneut vermessen. Zur Überprüfung der Richtigkeit und Präzision der Messung wurden pro Analysenlauf mindestens 10 % Qualitätskontrollproben (100, 250 und 450 µg Platin pro L Purelab Plus® Wasser) analysiert. Der jeweilige Analysenlauf wurde akzeptiert, wenn bei mindestens 67 % der Qualitätskontrollproben die anhand der Kalibriergeraden berechnete Konzentration um nicht mehr als 15 % (20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) von der jeweiligen nominalen Konzentration abwich. Der so bestimmte relative Fehler wurde als Maß für die Richtigkeit der Messung herangezogen.

3.13 Behandlung der Tumorzellknoten *in ovo*

3.13.1 Behandlung der HepG2- Tumorzellknoten mit Sorafenib

Die Eier wurden bis zu Tag 7 nach Standardprotokoll behandelt. Nach Durchleuchten der Eier und Aussortieren der abgestorbenen Eier erfolgte eine Einteilung in Sorafenib- (2/3) und Kontrollgruppe (1/3). Die Eier der Sorafenibgruppe erhielten je 0,5 mg Sorafenib in 100 μ L DMSO, die Eier der Kontrollgruppe je 100 μ L DMSO. Die Applikation der Lösung erfolgte via Injektion ins Eiklar. Dazu wurde das Ei in liegende Position gebracht, das apikale Ende zeigte leicht nach unten. Etwa 1 cm oberhalb des apikalen Endes wurde mit Bleistift eine Markierung gesetzt. An dieser Stelle wurde mittels einer spitzen Schere eine kleine Öffnung in die Eischale gestochen. Die Injektion erfolgte durch die Öffnung, dabei wurde die Kanüle maximal 0,5 cm tief in das Ei geführt. Anschließend wurde die Öffnung mittels eines transparenten Klebestreifens versiegelt. Die Eier wurden zurück in den Brutschrank gelegt. Der weitere Versuchsablauf erfolgte nach Protokoll (s. 3.5.2 sowie Tab. 3.16).

Tab. 3.16 Versuchsübersicht der Behandlung der HepG2-Tumorzellknoten *in ovo* mit Sorafenib.

Versuchstag	Versuchsschritt
d0	Einlegen der Eier
d7	Injektion Sorafenib in DMSO
d10	Aufstellen der Eier
d11	Lochen der Eier
d12	Applikation der HepG2-Zellsuspension
d24	Versuchsende, Entnahme der Tumoren

3.13.2 Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin

Die Eier wurden bis zum vorletzten Versuchstag (Tag 23) nach Standardprotokoll behandelt. An Tag 23 wurden sie nach Größe der vorhandenen Tumoren stratifiziert. Ziel war es, nicht durch Zufall überwiegend Tumoren einer Größe in der späteren Cisplatin- oder Kontrollgruppe zu haben. Die Stratifizierung lief wie folgt ab. Das Fixierpflaster wurde einige Zentimeter eingeschnitten, die Uhrgläser halb aufgeklappt und der Zustand der CAM kontrolliert. Dabei erfolgten eine visuelle Beurteilung und anschließende Unterteilung der Tumoren in die Klassen „groß“, „mittel“ und „klein“ sowie „kein Tumor“. Die Eier der Klasse „kein Tumor“ wurden verworfen. Jede der übrigen Klassen wurde erneut unterteilt in Cisplatin- (2/3) und Kontrollgruppe (1/3). Die Cisplatingruppe erhielt 1 mL einer gebrauchsfertigen Cisplatinlösung (1 mg/mL in NaCl (0,9 %)) pro Ei, die Kontrollgruppe 1 mL NaCl (0,9 %). Die jeweilige Lösung wurde vorsichtig auf die freiliegende CAM pipettiert. Das Uhrglas wurde wieder über die

Öffnung der Eischale gelegt und mit Fixierpflaster befestigt. Die Eier wurden in den Brutschrank gestellt, der weitere Versuchsablauf entsprach dem Protokoll (s. 3.5.2). Eine entsprechende Übersicht liefert Tab. 3.17.

Tab. 3.17 Versuchsübersicht der Behandlung der A2780-Tumorzellknoten in ovo mit Cisplatin.

Versuchstag	Versuchsschritt
d0	Einlegen der Eier
d10	Aufstellen der Eier
d11	Lochen der Eier
d12	Applikation der A2780-Zellsuspension
d23	Stratifizierung, Applikation Cisplatin- bzw. NaCl-Lösung
d24	Versuchsende, Entnahme der Tumoren

4. Ergebnisse

4.1 Methodenoptimierung

4.1.1 Zelllinienauswahl

Zunächst wurde eine breite Auswahl an verschiedenen Tumorzelllinien in Bezug auf ihr Wachstum auf der CAM überprüft (Tab. 4.1). Ziel war es, drei Zelllinien zu finden, die sowohl in Kultur schnell wachsen als auch auf der CAM Tumoren in verwendbarer Größe und in ausreichender Menge generieren (Tumorigenität). Zudem sollten die drei Tumorzelllinien möglichst verschieden voneinander sein.

Tab. 4.1 Übersicht über Wachstumsraten und Tumorgößen der verwendeten Zelllinien vor Auswahl der finalen drei Zelllinien; d: Versuchstag.

Name	Beschreibung	beimpfte CAMs	vital (d24)	Tumoren (d24)	knotig	Wachstum [%]	Größe [mm]
A-204	humanes Rhabdomyosarkom	15	12	0	/	0	/
A-431	humanes Epidermoidkarzinom	24	18	2	1	11,1	1
A-498	humanes Nierenzellkarzinom	11	10	10	8	100	1-6
A2780	humanes Ovarialkarzinom	14	8	8	8	100	1,5-22
Calu-1	humanes Lungenkarzinom (grade III)	7	7	5	3	71,4	1,5x1 bis 5x4
Daoy	humanes Medulloblastom	9	7	2	2	28,6	6
HCT-8	humanes kolorektales Adenokarzinom, ileozökäl	15	14	9	1	64,3	0,5-2,5
HepG2	humanes hepatozelluläres Karzinom						
	Versuch C01-09	30	24	23	22	95,8	2,5-20
	Versuch C02-09	3	3	3	3	100	9,5-11
	Versuch C03-09	6	6	5	4	83,3	2-15
	Versuch C04-09	11	10	10	10	100	9-15
	Versuch C05-09	5	4	4	4	100	0,5-10
HT-1197	humanes Blasenkarzinom	11	11	1	0	9,1	1
PC-3	humanes Prostatakarzinom	15	13	11	10	84,6	1x1 bis 5,5x4
SK-Hep1	humanes Leber-Adenokarzinom	11	10	8	5	80	1-6
SW-480	humanes Kolon-Adenokarzinom	15	12	7	7	58,3	1-1,5

Unter den Bedingungen auf der Chorion-Allantois-Membran sind die Zelllinien mit unterschiedlichem Erfolg gewachsen. Die humane hepatozelluläre Tumorzelllinie HepG2, welche sich in Vorversuchen bereits als erfolgreich erwiesen hatte, wurde als Positivkontrolle und Standard von vorneherein in die Auswahl eingeschlossen. Ebenfalls ausgewählt wurde die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780, deren Wachstumserfolg im Erstversuch bei 100 % lag. Zudem war an dieser Zelllinie interessant, dass sie ebenfalls vom Arbeitskreis Klinische Pharmazie der Universität Bonn mit gutem Erfolg verwendet wird. Des Weiteren in der engeren Auswahl befanden sich die humane ileozökale kolorektale Adenokarzinomzelllinie HCT-8, die humane Prostatakarzinomzelllinie PC-3 und die humane Leber-Adenokarzinomzelllinie SK-Hep1. Da drei möglichst voneinander unterschiedliche Tumorzelllinien miteinander verglichen werden sollten, wurde SK-Hep1 auf Grund der Ähnlichkeit zu HepG2 ausgeschlossen. Die verbliebenen Zelllinien HCT-8 und PC3 wurden nach jeweils einem bereits erfolgten Versuch in zwei gemeinsamen Versuchen einander direkt gegenüber gestellt (vgl. Tab. 4.2). Die Tumorzellknötchen, die durch HCT-8 generiert werden konnten, hatten für die Folgeversuche eine besser verwertbare Größe. Außerdem war mit der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 bereits eine Tumorzelllinie des Reproduktionstrakts festgelegt worden, weshalb die Entscheidung gegen die Prostatakarzinomzelllinie PC3 und für die humane ileozökale kolorektale Adenokarzinomzelllinie HCT-8 fiel. Die Wachstumserfolge der drei finalen Zelllinien nach Auswahl ist in Tab. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.2 Vergleichsversuche zwischen HCT-8 und PC-3.

Name	Versuch	beimpfte CAMs	vital (d24)	Tumoren (d24)	knotig	Wachstum [%]	Größe [mm]
HCT-8	C07-09	20	15	7	4	46,7	1-3
	C09-09	42	39	30	4	76,9	0,5-6
PC-3	C07-09	14	13	7	5	53,8	0,5-8
	C09-09	21	21	18	16	85,7	0,5-4

Tab. 4.3 Wachstum HepG2, A2780, HCT-8 nach Festlegung der finalen drei Zelllinien.

Name	Versuch	beimpfte CAMs	vital (d24)	Tumoren (d24)	knotig	Wachstum [%]	Größe [mm]
HepG2	C07-09	10	8	7	7	87,5	1-19
	C08-09	19	15	12	12	80	1-14
A2780	C06-09	27	23	22	22	95,7	1-20
	C08-09	42	38	38	38	100	0,5-18
	C10-09	27	25	23	23	92	1-16
	C11-09	15	12	12	12	100	0,5-25
HCT-8	C12-09	43	39	25	3	64,1	1-7

4.1.2 Makroskopisches Bild der Tumorzellknoten

4.1.2.1 HepG2

In vitro kultivierte HepG2-Zellen, die in Form einer konzentrierten Suspension auf die CAM aufgebracht werden, generieren zuverlässig einander ähnliche, annähernd kugelförmige Tumorzellknoten mit Durchmessern von 0,5 bis zu 20 mm (Abb. 4.1). Die Tumorzellknoten sind stark durchblutet, Gefäße sind makroskopisch gut erkennbar. Große Koagel bedecken teils große Flächen der CAM. Sehr häufig zeigen die Tumorzellknoten nekrotische Anteile.

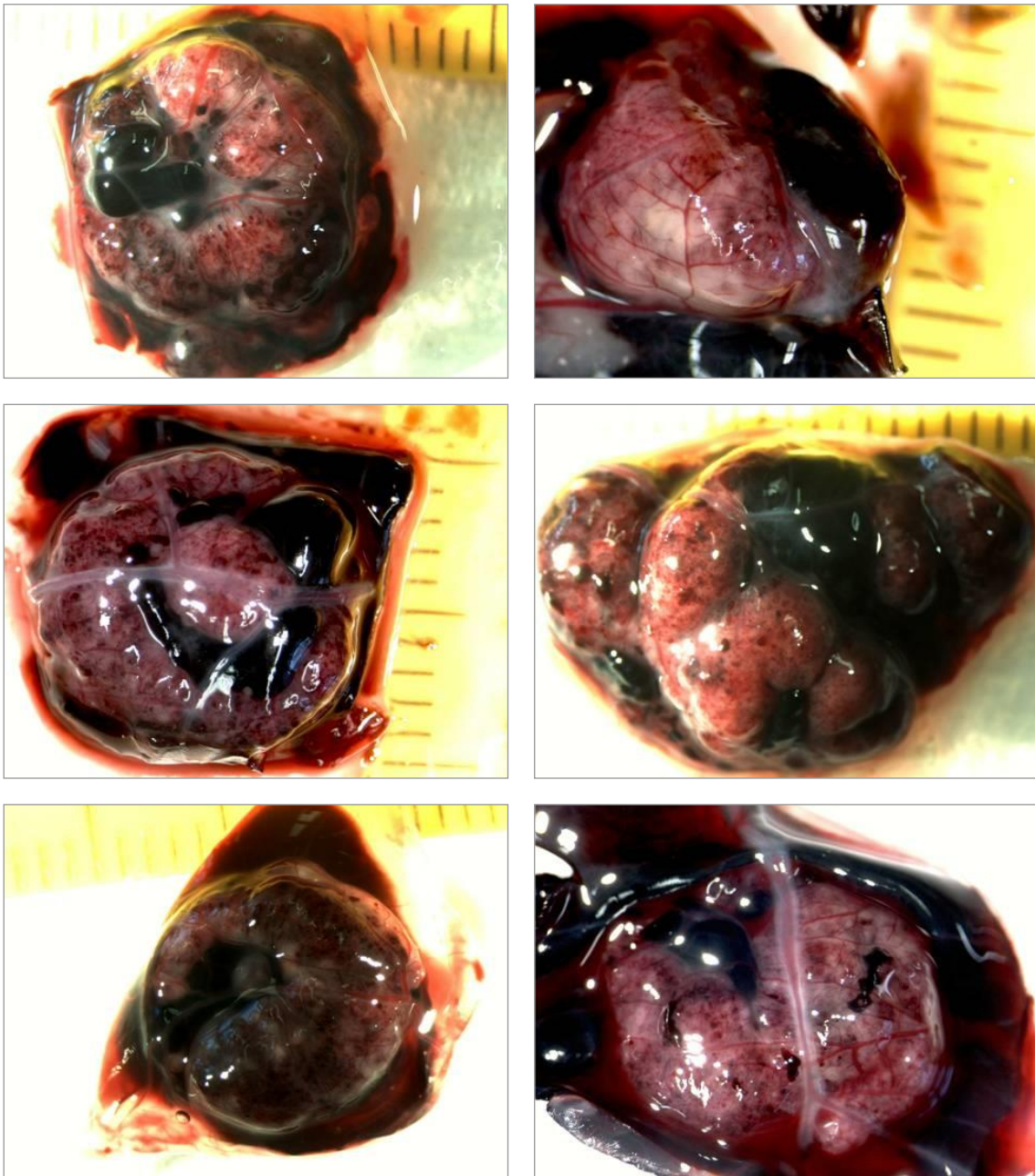


Abb. 4.1 HepG2-Tumorzellknoten zu Versuchsende.

4.1.2.2 A2780

In vitro kultivierte A2780-Zellen erzeugen auf der CAM verlässlich Tumorzellknoten ähnlichen Aussehens. Die Tumorzellknoten erreichen Größen von 0,5 bis zu 25 mm Durchmesser (Abb. 4.2). Die A2780-Tumorzellknoten sind sehr gut durchblutet. Die Gefäßversorgung ist bereits makroskopisch gut erkennbar. Häufig führen Einblutungen zu großen Koageln auf der CAM. Stellenweise treten Nekrosen auf.

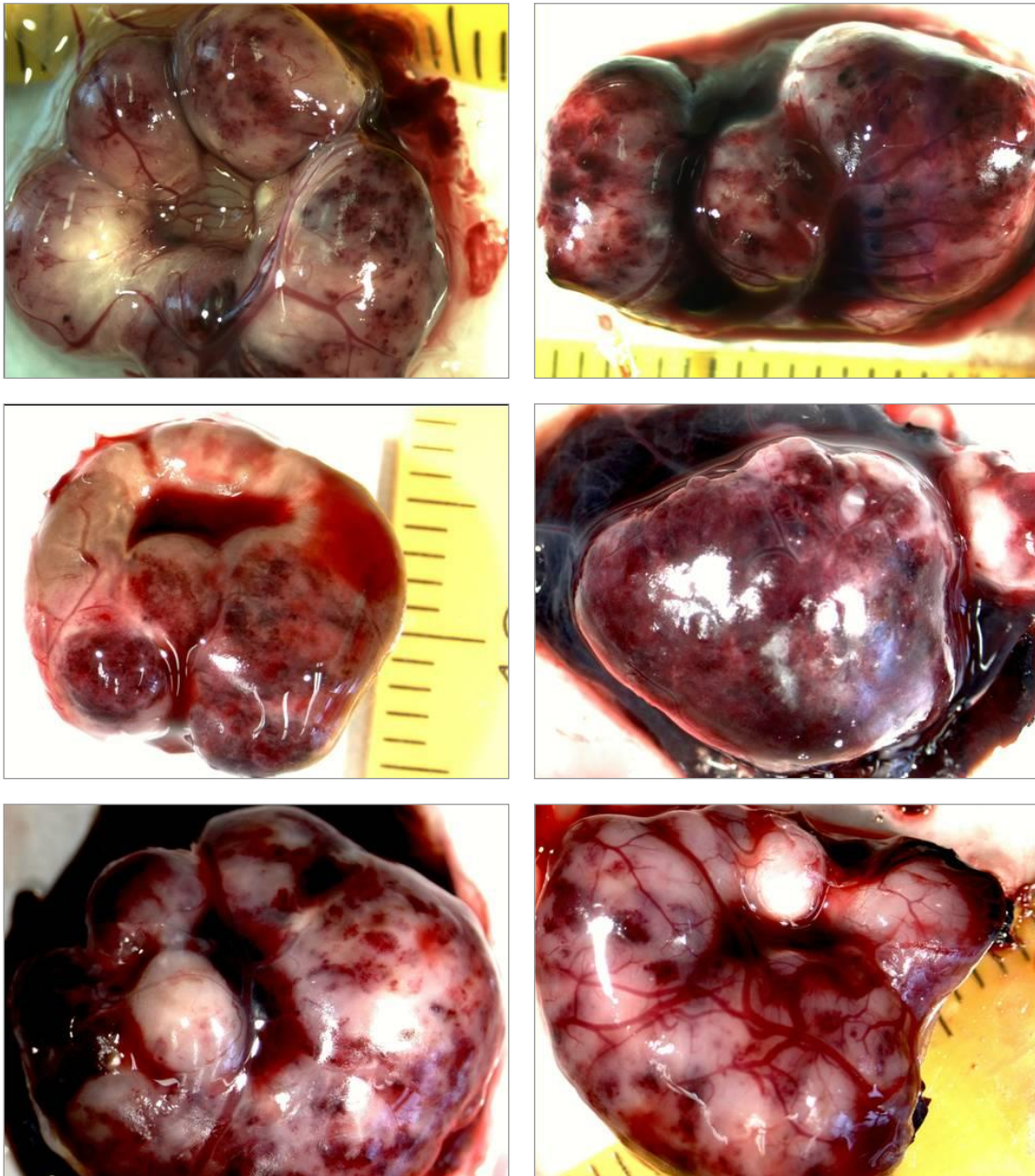


Abb. 4.2 A2780-Tumorzellknoten zu Versuchsende.

4.1.2.3 HCT-8

HCT-8-Zellen wachsen auf der CAM als blasse abgeflachte Tumorzellknötchen (Abb. 4.3). Diese haben nur eine geringe Tumormasse. Die Größe reicht von 0,5 bis zu 7 mm im Durchmesser. Eine Gefäßversorgung ist makroskopisch nicht eindeutig zu erkennen. Auch Nekrosen sind makroskopisch nicht sichtbar.

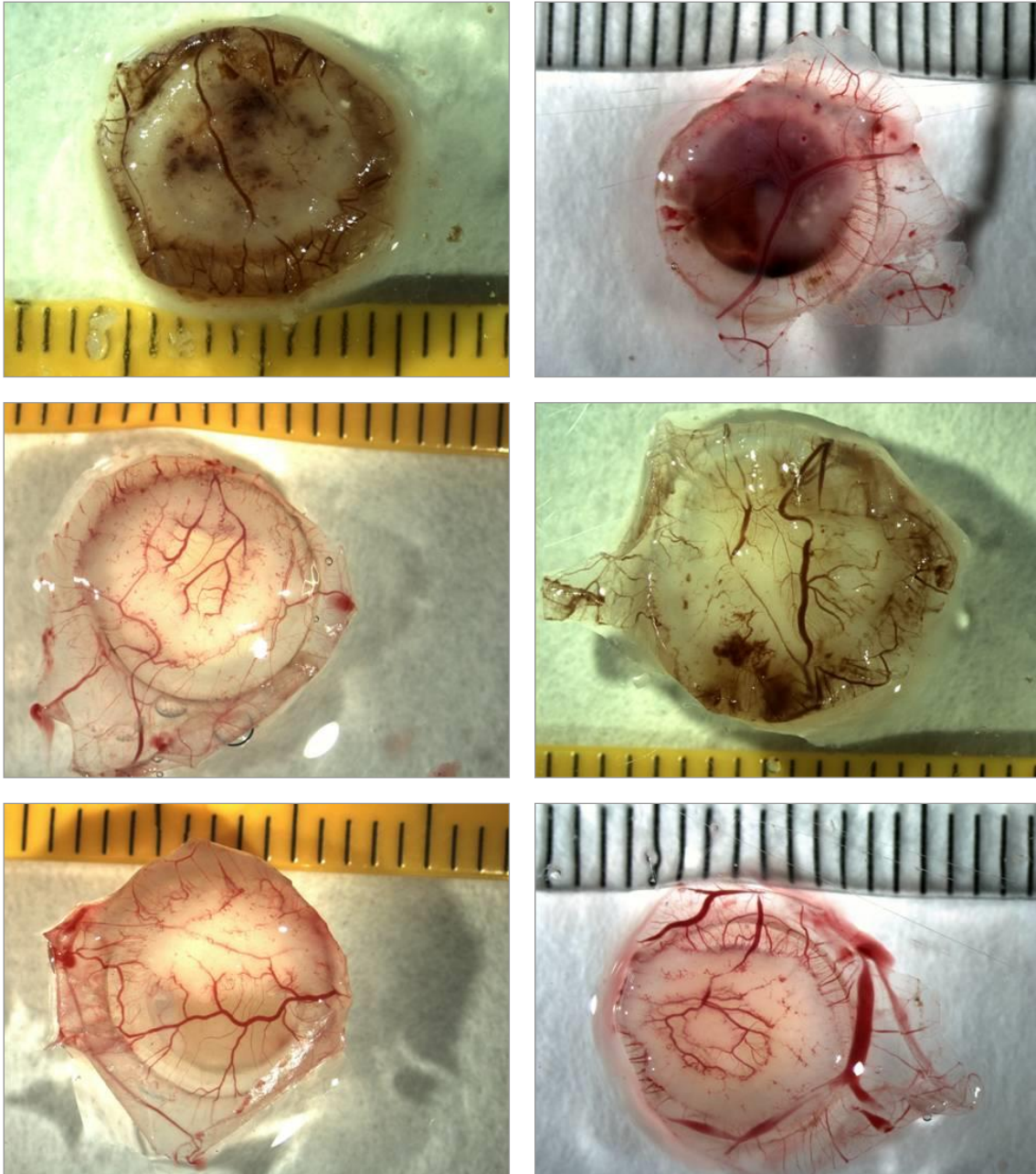
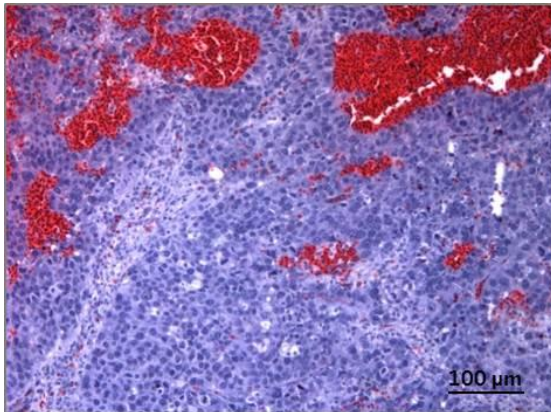


Abb. 4.3 HCT-8-Tumorzellknötchen zu Versuchsende.

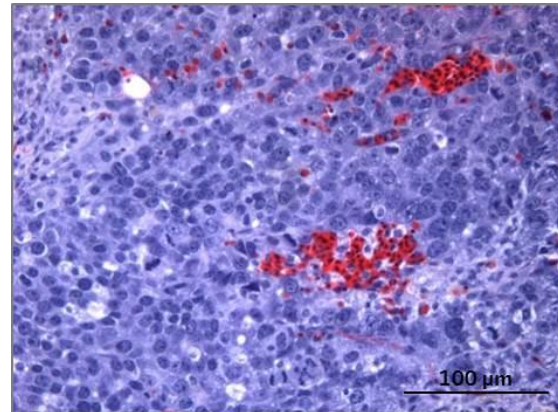
4.1.3 Histologisches Bild der Tumorzellknoten

4.1.3.1 HepG2

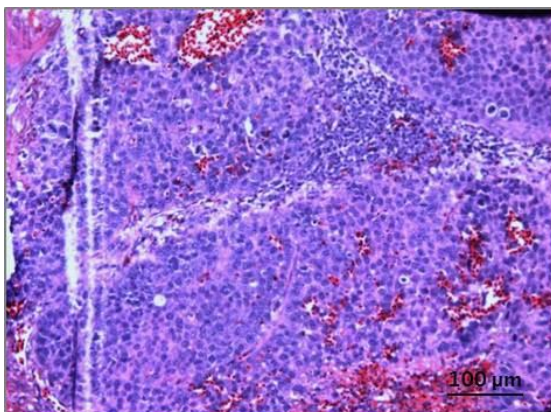
Tumorzellknoten, die aus der Zelllinie HepG2 entstanden sind, gleichen einander sowohl im makroskopischen Aussehen (Abb. 4.1) als auch im histologischen Bild (Abb. 4.4). Gefäße sind deutlich erkennbar, die Tumorzellknoten sind gut durchblutet. Ebenso sind viele Mitosen zu sehen. Gleichzeitig sind große nekrotische Bereiche zu erkennen.



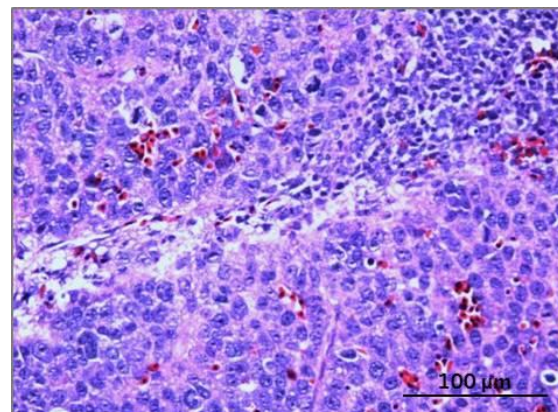
13901 HepG2 100 x C07-09



13901 HepG2 200 x C07-09



11036 HepG2 100 x C01-09

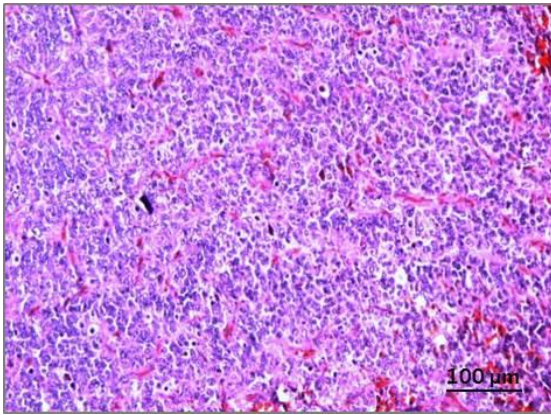


11036 HepG2 200 x C01-09

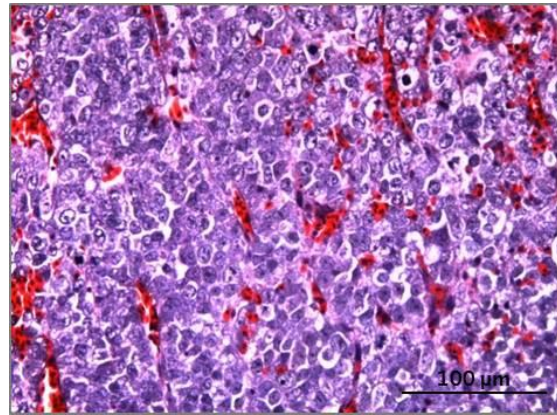
Abb. 4.4 Histologisches Bild von gesundem Gewebe in HepG2-Tumorzellknoten; H&E-Färbung.

4.1.3.2 A2780

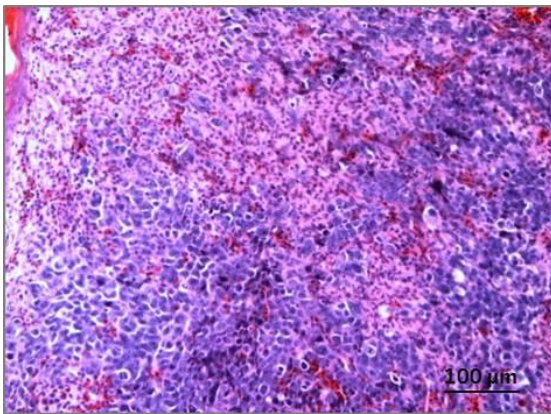
Auf der CAM gewachsene A2780-Tumorzellknoten weisen auch histologisch starke Ähnlichkeit untereinander auf (Abb. 4.5). Sie sind gut durchblutet, was durch Gefäße ersichtlich ist. Häufig auftretende Mitosen weisen auf eine hohe Teilungsrate hin. Ebenso ist absterbendes Gewebe großflächig erkennbar.



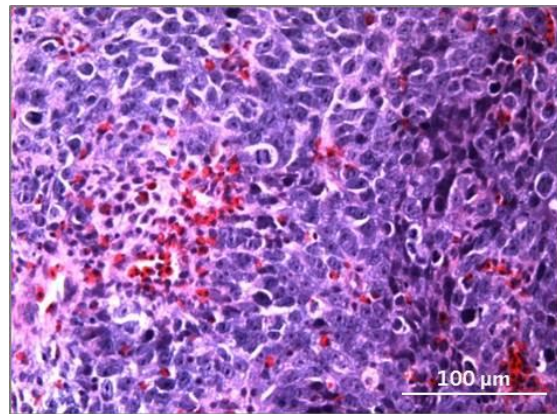
12811 A2780 100 x C05-09



12811 A2780 200 x C05-09



16076 A2780 100 x C10-09

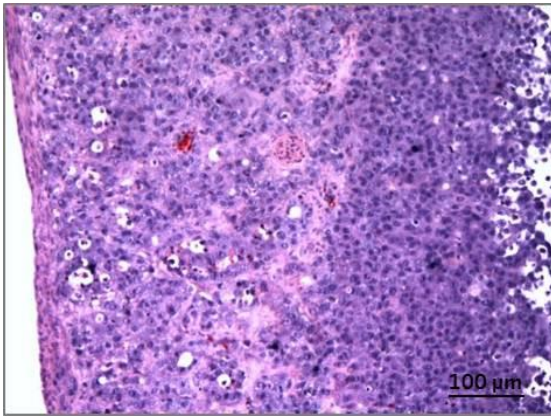


16076 A2780 200 x C10-09

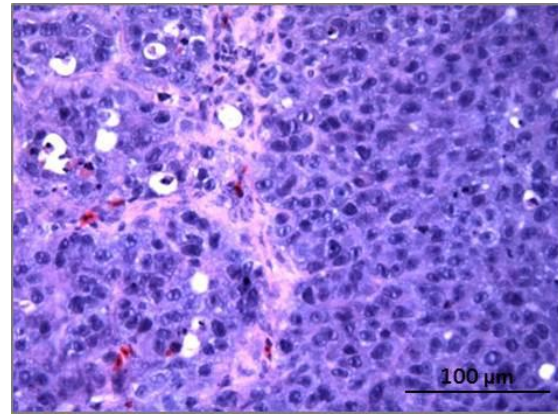
Abb. 4.5 Histologisches Bild von gesundem Gewebe in A2780-Tumorzellknoten; H&E-Färbung.

4.1.3.4 HCT-8

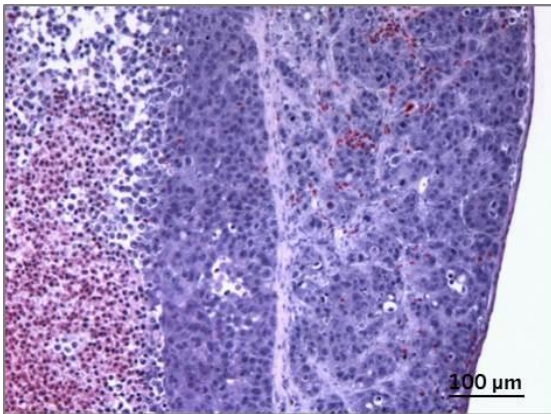
Die Zelllinie HCT-8 liefert histologisch ein ähnliches Bild in allen Tumorzellknötchen (Abb. 4.6). Diese sind kaum durchblutet und weisen kaum Nekrosen auf.



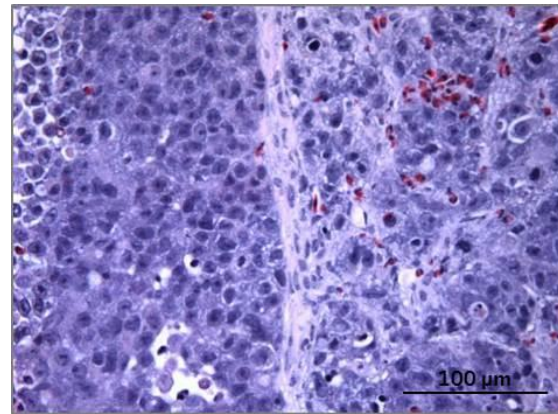
15258 HCT-8 100 x C09-09



15258 HCT-8 200 x C09-09



16641 HCT-8 100 x C12-10



16641 HCT-8 200 x C12-10

Abb. 4.6 Histologisches Bild von gesundem Gewebe in HCT-8-Tumorzellknötchen; H&E-Färbung.

4.1.4 Immunperoxidasefärbung

Es ist möglich, Gewebe humaner Tumorzellknoten mittels einer Antikörperfärbung von Putengewebe zu unterscheiden (s. Abb. 4.7). Humanes Gewebe wird durch die Antikörperfärbung (Zytokeratin 8) braun gefärbt. Aviäres Gewebe hingegen lässt sich nicht auf diese Weise anfärben, wie in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe gezeigt wurde. Durch die Färbung wurde bewiesen, dass es sich bei den entstandenen Knötchen in der Tat um Tumorzellknoten und nicht um knotige Veränderungen der CAM handelt. Sowohl HepG2- als auch HCT-8-Zellen sowie durch sie entstandene Tumorzellknoten ließen sich anfärben. Wie schon zuvor durch die Literaturrecherche erwartet, war dies mit A2780-Tumorzellknoten nicht möglich [39].

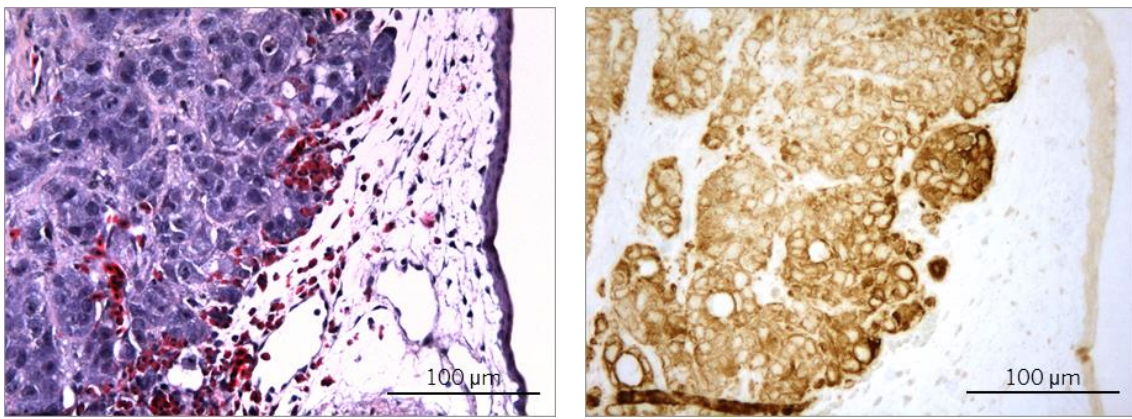


Abb. 4.7 Gewebeschnitte eines HCT-8-Tumorzellknötchens; links: H&E-Färbung; rechts: Immunperoxidase-Färbung von Zytokeratin 8; Vergrößerung 200 x.

4.1.5 Genexpressionsmuster

4.1.5.1 Anzahl der veränderten Gensequenzen

Das Genexpressionsmuster innerhalb der Zelllinien ist reproduzierbar. Wie in Tab. 4.4 (3fache Veränderungen) und Tab. 4.5 (2fache Veränderungen) zu erkennen, befindet sich die Anzahl der jeweils hoch- und herunterregulierten Sequenzen bei allen Einzeltumoren jeweils einer Zelllinie im selben Bereich.

Tab. 4.4 Anzahl der 3fach verändert exprimierten Sequenzen (VES) in jedem individuellen Tumor.

	$\geq 3,00$				\bar{x}	$\leq 0,33$				\bar{x}
	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4		Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	
HepG2	2313	3289	4297	3636	3289	1381	1772	1861	1848	1398
A2780	1108	1271	2023	1962	1409	953	1092	1149	1199	781
HCT-8	1653	1849	1651	2014	1601	911	943	990	822	375

Tab. 4.5 Anzahl der 2fach verändert exprimierte Sequenzen (VES) in jedem individuellen Tumor.

	$\geq 2,00$					$\leq 0,50$				
	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\bar{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\bar{x}
HepG2	4485	5789	6526	6095	5717	3781	4822	5375	5082	3958
A2780	2775	3080	3974	3653	3097	2451	2701	3079	3252	2207
HCT-8	3472	3703	3953	4038	3471	3035	2994	3432	3045	2072

4.1.5.2 Übereinstimmung der Veränderungen in den Tumorzellknoten der einzelnen Zelllinien

Jeder Tumorzellknoten hat unterschiedlich viele Gensequenzen, die im Vergleich zu Zellen in Zellkultur herauf- bzw. herunterreguliert sind. Diese werden im Folgenden als „VES“ (= verändert exprimierte Sequenzen) bezeichnet. Die VES der jeweils vier Tumoren einer Zelllinie wurden paarweise miteinander verglichen. Dabei wurde die jeweilige Schnittmenge an VES, die sich zwischen den Paaren (Paar 1 gegen Paar 2, Paar 1 gegen Paar 3, Paar 1 gegen Paar 4, Paar 2 gegen Paar 3, ...) ergaben, bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte sowohl für die herauf- als auch für die herunterregulierten VES.

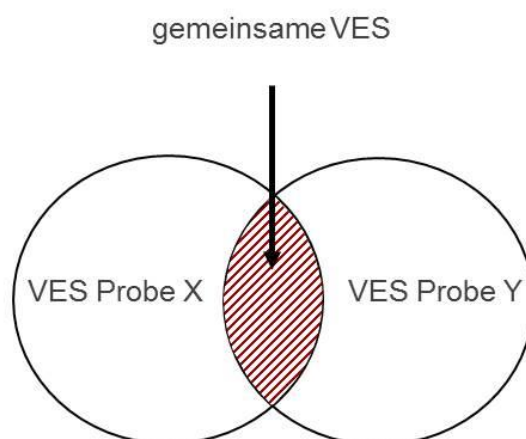


Abb. 4.8 Schematische Mengenübersicht.

In Tab. 4.4 und Tab. 4.5 ist die Anzahl der jeweiligen VES angegeben. Außerdem wurde die prozentuale Wiederfindungsrate ermittelt. Dazu wurde die Anzahl der VES, die in beiden Tumoren in dieselbe Richtung reguliert war ($\leq 0,33$ bzw. $\geq 3,00$) auf die Anzahl der VES des Tumors bezogen, der die geringere Anzahl an veränderten Gensequenzen aufwies. Das Ergebnis war die Übereinstimmung [%] des Tumors mit der niedrigeren Anzahl an veränderten Gensequenzen. In unten stehendem Beispiel wurde 75 % der VES ($\geq 3,00$) aus Tumor 1 in Tumor 2 wiedergefunden.

Tab. 4.6 Beispielrechnung für die Wiederfindungsrate.

Tumor 1	2313 VES	$\geq 3,00$
Tumor 2	3289 VES	$\geq 3,00$
Schnittmenge	1726 VES	$\geq 3,00$
Wiederfindungsrate	$1726/2313 \times 100$	$= 75 \%$

Wie aus den folgenden Korrelationstabellen (Tab. 4.7 bis Tab. 4.9) zwischen den Einzeltumoren einer Zelllinie ersichtlich wird, ist die Übereinstimmung der verändert exprimierten Gensequenzen zwischen Einzeltumoren innerhalb einer Zelllinie sehr hoch. Dabei wurden nur Gensequenzen berücksichtigt, deren Genname beziehungsweise Funktion bekannt war. Für HepG2-Tumorzellknoten wurden für den hochregulierten Bereich Wiederfindungsraten von 75-83 % und für den herunterregulierten Bereich Werte von 66-73 % ermittelt (s. Tab. 4.7). A2780-Tumorzellknoten zeigten Wiederfindungsraten von 42-73 % im hochregulierten Bereich und 54-66 % im herunterregulierten Bereich (s. Tab. 4.8). Für HCT-8 Tumorzellknoten ergaben sich im hochregulierten Bereich Wiederfindungsraten von 65-75 %. Im herunterregulierten Bereich waren die Wiederfindungsraten mit 30-41 % niedriger als bei HepG2 und A2780 (s. Tab. 4.9). Die starke Übereinstimmung der Tumoren einer Zelllinie untereinander zeigt die Konstanz der mit dem Übergang zum Knotenwachstum verbundenen zellbiologischen Veränderungen. Diese Übereinstimmungen beruhen nicht auf einer rein zufälligen Überschneidung. Im Folgenden ist für zwei Tumorzellknoten die statistisch zufällige Übereinstimmung im hoch- als auch im herunterregulierten Bereich beispielhaft angegeben. In Tumor 2 sind 3632, in Tumor 3 4624 Gensequenzen um mehr als Faktor 3 nach oben reguliert im Vergleich zu Zellen in Zellkultur. Insgesamt sind 41079 Gensequenzen auf dem Microarray vorhanden. Die erwartete rein zufällige Übereinstimmung der HepG2-Tumorzellknoten läge im Falle Tumor 2 versus Tumor 3 im hochregulierten Bereich bei

$$3632 \times 4624 : 41079 = 409.$$

Eine erwartete zufällige Übereinstimmung wären 409 Gensequenzen von insgesamt 41079. Die tatsächliche Übereinstimmung liegt für diese Tumorzellknoten jedoch mit 2774 Gensequenzen deutlich darüber. In Tumor 2 sind 1937, in Tumor 3 2029 Gensequenzen um mehr als Faktor 3 nach unten reguliert. Die erwartete rein zufällige Übereinstimmung läge in diesem Fall bei rund 96 Gensequenzen. Die tatsächliche Übereinstimmung liegt bei 1171 Gensequenzen.

Tab. 4.7 Übereinstimmung der HepG2-Einzeltumorzellknoten untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl der Gensequenzen				Wiederfindungsrate [%]					
HepG2 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				HepG2 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		1726	1839	1892	1		75	80	82
2	994		2774	2544	2	72		84	77
3	919	1171		3013	3	67	66		83
4	1011	1212	1227		4	73	68	66	

HepG2 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				HepG2 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\leq 0,33$)			
--	--	--	--	--	--	--	--

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Tumor 2 gegen Tumor 3;
n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=409	n=2774
$\leq 0,33$	n=96	n=1171

Tab. 4.8 Übereinstimmung der A2780-Einzeltumorzellknoten untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl Gensequenzen				Wiederfindungsrate [%]					
A2780 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				A2780 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		758	807	532	1		68	73	48
2	629		812	534	2	66		64	42
3	629	625		1306	3	66	57		67
4	564	585	638		4	59	54	56	

A2780 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4
($\leq 0,33$)

A2780 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4
($\leq 0,33$)

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Tumor 2 gegen Tumor 4;
n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=74	n=534
$\leq 0,33$	n=43	n=585

Tab. 4.9 Übereinstimmung der HCT-8-Einzeltumorzellknoten untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl Gensequenzen				Wiederfindungsrate [%]					
HCT-8 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				HCT-8 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		1215	1069	1232	1		74	65	75
2	275		1082	1356	2	30		66	73
3	308	298		1203	3	34	32		75
4	299	260	339		4	36	32	41	
HCT-8 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				HCT-8 Übereinstimmung Tumor 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Tumor 1 gegen Tumor 2;
n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=92	n=1215
$\leq 0,33$	n=24	n=275

4.2 Tumor-assoziierte Veränderungen der Genexpressionsmuster

4.2.1 Tumorzellknoten HepG2

Beim Vergleich von HepG2-Tumorzellknoten mit *in vitro* kultivierten Zellen war die Expression der in Tab. 4.10 angegebenen Anzahl von Gensequenzen verändert. Es waren deutlich mehr Gensequenzen hoch- als herunterreguliert.

Tab. 4.10 Anzahl TA-VES in HepG2 3fach und 2fach verändert; \tilde{x} : Median.

$\geq 3,00$					$\leq 0,33$				
Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}
2313	3289	4297	3636	3289	1381	1772	1861	1848	1398

$\geq 2,00$					$\leq 0,50$				
Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}
4485	5789	6526	6095	5717	3781	4822	5375	5082	3958

In HepG2-Tumorzellknoten waren beim Übergang zum knotigen Wachstum unter anderem einige Sequenzen für Mucine, Cadherine und Matrixmetallopeptidasen um mehr als Faktor 2 erhöht (s. Tab. 4.11). Ebenfalls aufgelistet sind die Sequenzen, die herunterreguliert sind. Deren Anzahl ist jedoch wesentlich geringer.

Tab. 4.11 Überexprimierte Gensequenzen: Vergleich HepG2-Tumorzellknoten zu einschichtigem HepG2-Zellrasen; MUC: Mucin; CDH: Cadherin; MMP: Matrixmetallopeptidase.

Mucine		Cadherine		Matrixmetallopeptidasen	
≥ 2	$\leq 0,5$	≥ 2	$\leq 0,5$	≥ 2	$\leq 0,5$
MUC2	MUC20* ¹	CDH3	CDH1* ²	MMP1	MMP11
MUC3A		CDH4	CDH16	MMP2	MMP15
MUC4		CDH5		MMP7	
MUC5AC		CDH6		MMP16	
MUC6		CDH7		MMP17	
MUC15		CDH9		MMP19	
MUC16		CDH11		MMP21	
MUC20* ¹		CDH18		MMP28	

*¹ eine Sonde hoch- und eine herunterreguliert; *² entspricht E-Cadherin

4.2.2 Tumorzellknoten A2780

A2780-Tumorzellknoten wurden mit *in vitro* kultivierten A2780-Zellen verglichen. Die Expression der in Tab. 4.12 angegebenen Anzahl von Gensequenzen war verändert. Es waren mehr Gensequenzen hoch- als herunterreguliert.

Tab. 4.12 Anzahl TA-VES in A2780 3fach und 2fach verändert; \tilde{x} : Median.

$\geq 3,00$					$\leq 0,33$				
Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}
1108	1271	2023	1962	1409	953	1092	1149	1199	781

$\geq 2,00$					$\leq 0,50$				
Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}
2775	3080	3974	3653	3097	2451	2701	3079	3252	2207

In A2780-Tumorzellknoten waren beim Übergang zum knotigen Wachstum unter anderem die Sequenzen für ENO1 (alpha-Enolase) und ENO2 (gamma-Enolase) um mehr als Faktor 2 erhöht. Die Sequenz für ENO3 (beta-Enolase) zeigte keine Veränderung.

4.2.3 Tumorzellknoten HCT-8

Die Genexpressionsmuster von HCT-8-Tumorzellknötchen wurden mit denen von HCT-8-Zellen aus Zellkultur verglichen. Dabei zeigten sich viele Veränderungen (s. Tab. 4.13). Es waren mehr Gensequenzen hoch- als herunterreguliert.

Tab. 4.13 Anzahl TA-VES in HCT-8 3fach und 2fach verändert; \tilde{x} : Median.

$\geq 3,00$					$\leq 0,33$				
Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}
1653	1849	1651	2014	1601	911	943	990	822	375

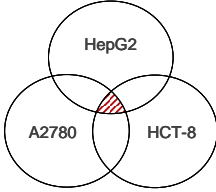
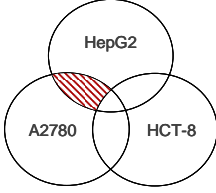
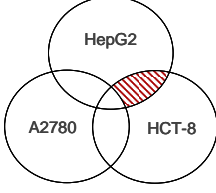
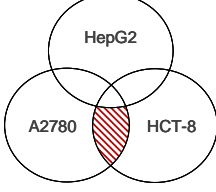
$\geq 2,00$					$\leq 0,50$				
Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}	Tu 1	Tu 2	Tu 3	Tu 4	\tilde{x}
3472	3703	3953	4038	3471	3035	2994	3432	3045	2072

In HCT-8-Tumorzellknötchen waren beim Übergang zum knotigen Wachstum unter anderem die Sequenzen für ANTXR2 (Anthrax-Toxin-Rezeptor 2) und EphA2 (Eph-Rezeptor A2, Familie der Ephrin-Rezeptor-Tyrosinkinasen) um mehr als Faktor 2 erhöht.

4.2.4 Tumor-assoziierte Genexpressionsmusteränderungen in allen drei Tumorarten

Es wurden die Gensequenzen ermittelt, die in allen 3 Tumorarten um Faktor 3 bzw. Faktor 2 gemeinsam herauf- oder herunterreguliert waren (A3T). Dazu wurde der Median, der sich aus den jeweils vier Tumoren einer Zelllinie ergab, herangezogen. Es zeigte sich, dass im hochregulierten Bereich wesentlich mehr gemeinsame Veränderungen auftraten als im herunterregulierten Bereich (s. Anhang Tab. 8.2 und Tab. 8.3). Auch diese Gemeinsamkeiten sind nicht das Ergebnis eines Zufalls. Nach Berechnung wären vier Gensequenzen durch eine erwartete zufällige Übereinstimmung in allen drei Tumorzelllinien um den Faktor 3 hochreguliert und 0,2 Gensequenzen um den Faktor 3 herunterreguliert (Berechnung s. Kap. 4.1.5).

Tab. 4.14 Anzahl der Gensequenzen, die in der jeweiligen Schnittmenge der Tumoren um den Faktor 3 bzw. 2 herauf- oder herunterreguliert waren. Die Anzahl wurde nach dem Median der jeweils vier Tumoren einer Zelllinie ermittelt ($n=4$, Median).

Schnittmenge	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> <p>HepG2 A2780 HCT-8</p> </div>	290	14	916	95
 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> <p>HepG2 A2780 HCT-8</p> </div>	1022	160	2177	622
 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> <p>HepG2 A2780 HCT-8</p> </div>	894	93	2017	565
 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> <p>HepG2 A2780 HCT-8</p> </div>	354	39	1108	206

4.2.4.1 Heatmap

Die Genexpression der einzelnen Tumorzellknoten ist grafisch in der nachfolgenden Heatmap (Abb. 4.9) dargestellt. Je stärker eine Gensequenz hochreguliert ist, desto intensiver erscheint die Rotfärbung. Je weiter eine Gensequenz herunterreguliert ist, desto intensiver ist die Grünfärbung. Die einzelnen Tumorzellknoten einer Zelllinie sind sich untereinander sehr ähnlich. Ausnahme ist „Tumor 1“ der Zelllinie HCT-8, der sichtbar von den anderen drei Tumorzellknoten derselben Zelllinie abweicht. Das Bild der Heatmap für diesen Tumorzellknoten zeigt ein Bandenmuster, welches für ein Artefakt spricht (s. Abb. 8.1 im Anhang). Die Genexpressionsmuster ähneln sich stark innerhalb einer Zelllinie und sind auch in voneinander unabhängigen Versuchen reproduzierbar. Zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien gibt es deutliche Unterschiede, aber auch sichtbar viele Gemeinsamkeiten.

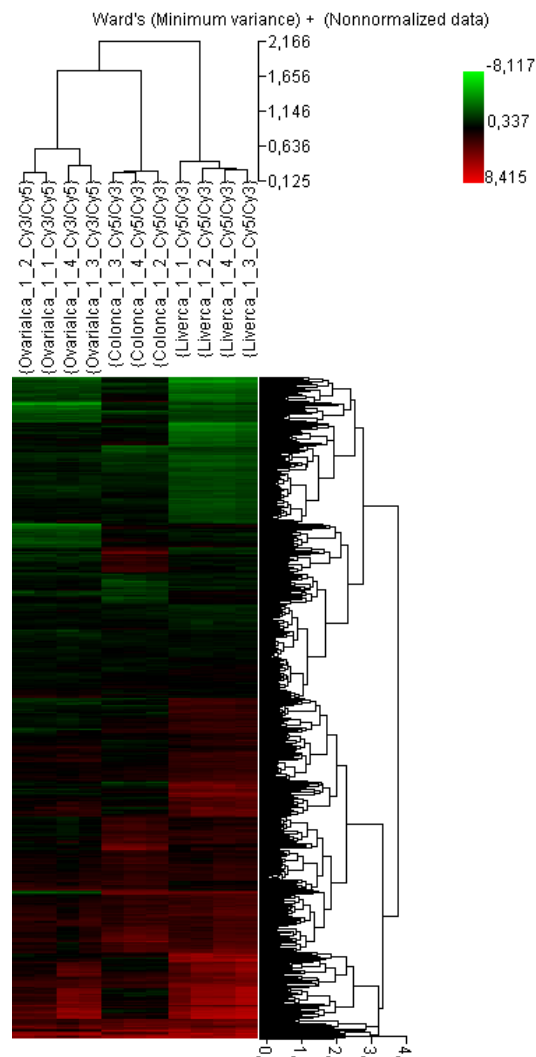


Abb. 4.9 Heatmap: Genexpression der einzelnen Tumorzellknoten. Je stärker eine Gensequenz hochreguliert, desto intensiver die Rotfärbung. Je weiter eine Gensequenz herunterreguliert, desto intensiver die Grünfärbung; Ovarialca_1_1 bis 1_4: A2780-Tumorzellknoten; Colonca_1_2 bis 1_4: HCT-8-Tumorzellknoten; Liverca_1_1 bis 1_4: HepG2-Tumorzellknoten.

4.2.4.2 Biostatistische Auswertung

Die Microarray-Daten wurden in Zusammenarbeit mit einer Biostatistikerin ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass 14 Gene signifikant in allen drei Tumorzelllinien in die gleiche Richtung verändert waren (Tab. 4.15).

Tab. 4.15 Signifikant veränderte Gene.

Primary Sequence Name	Name (Beschreibung)	Ratio HepG2	Ratio A2780	Ratio HCT-8
PPP2R2C	Proteinphosphatase 2, regulator. Untereinheit B, Isoform gamma	13,53	6,70	9,17
MT1H	Metallothionein 1H	16,95; 16,92	4,40; 3,74	3,42; 4,00
MT1X	Metallothionein 1X	17,76; 19,12	4,88; 4,96	3,81
C21orf66	Chromosom 21 open reading frame 66	62,89	12,19	13,26
MT1L	Metallothionein 1L (Gen/Pseudogen)	18,90	5,12	4,03
MT2A	Metallothionein 2A	19,23; 22,27; 24,21	5,49; 5,70; 5,71	4,13
MT1B	Metallothionein 1B	19,05	4,26	3,87
AK124352		6,67	4,52	8,31
MT1G	Metallothionein 1G	18,55; 15,67	4,29	4,06
AK000420	nicht vorhanden	4,86	3,93	4,38
ENST00000311208	nicht vorhanden	14,06	29,20	4,19
C1QTNF1	C1q und Tumornekrosefaktor related Protein	101,01	35,10	3,06
HBA2	Hämoglobin alpha 2	34,60; 31,65	14,49	5,65
MVK	Mevalonatkinase	0,095	0,273	0,24

4.2.4.3 Das Cluster der Metallothioneine in A3T

Das Cluster der Metallothioneine ist in allen drei Tumorzelllinien vom Übergang Zelle zu Tumor hochreguliert (s. Tab. 4.16).

Tab. 4.16 Genregulation der Metallothioneine in den Tumorzellknoten der verschiedenen Zelllinien; \uparrow : hochreguliert (Microarray, Ratio ≥ 2); nc: no change (Microarray; Ratio zwischen 0,51 und 1,99).

Primary Sequence Name	HepG2	A2780	HCT-8
MT1A	\uparrow	(\uparrow)	\uparrow
MT1B	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MT1E	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MT1F	\uparrow	\uparrow	(\uparrow)
MT1G	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MT1H	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MT1M	\uparrow	\uparrow	nc
MT1X	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MT2A	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MT3	nc	nc	nc
MT4	nc	nc	nc

4.2.4.4 Das Cluster der Hämoglobine in A3T

Auch das Cluster der Hämoglobine war nach den Ergebnissen des Microarrays in den Tumorzellknoten aller drei Tumorzelllinien nach oben reguliert (s. Tab. 4.17). Mittels der statistischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass HBA2 im Microarray signifikant in den Tumorzellknoten aller drei Tumorzelllinien nach oben reguliert ist.

Tab. 4.17 Genregulation der Hämoglobine in den Tumorzellknoten der verschiedenen Zelllinien; \uparrow : hochreguliert (Microarray, Ratio ≥ 2); nc: no change (Microarray; Ratio zwischen 0,51 und 1,99).

Primary Sequence Name	HepG2	A2780	HCT-8
HBA1/HBA2	\uparrow	\uparrow	\uparrow
HBE1	\uparrow	\uparrow	\uparrow
HBQ1	\uparrow	\uparrow	\uparrow
HMOX1	\uparrow	\uparrow	nc

4.2.5 Bestätigung durch PCR

Die interessantesten der Gensequenzen, die beim Übergang zum nodulären Wachstum in allen drei Tumorzelllinien verändert waren, wurden mittels PCR untersucht. Folgende Gene konnten durch PCR vollständig bzw. nur für eine oder zwei Zelllinien bestätigt werden (Tab. 4.18).

Tab. 4.18 Gene in PCR und Microarray; ↑ hochreguliert im Microarray, Bestätigung durch PCR; ↓ herunterreguliert im Microarray, Bestätigung durch PCR; **nc** kein Unterschied zwischen Tumor und Zelle sowohl im Microarray als auch in PCR; ↑ hochreguliert im Microarray, konnte in PCR nicht bestätigt werden; **nc** kein Unterschied zwischen Tumor und Zelle im Microarray, konnte in PCR nicht bestätigt werden; ↑ hochreguliert in PCR, im Microarray kein Unterschied Tumor zu Zelle ersichtlich; ↓ herunterreguliert in PCR, im Microarray kein Unterschied Tumor zu Zelle ersichtlich.

Primary Sequence Name	HepG2	A2780	HCT-8
COL7A1	↑	↑	↑
KRT7	↑	↑	↑
KRT75	↑	↑	↑
MT1E	↑	↑	↑
MT1G	↑	↑	↑
MT1X	↑	↑	↑
MT2A	↑	↑	↑
HBA1/A2	↑	↑	↑
HBE1	↑	↑	↑
HBQ1	↑	↑	↑
HMOX1	↑	↑	nc
IGF1	↑	↑	nc
IGF2	↑	↑	↑
MAFB	↑	↑	↑
ETS1	↑	↑	↑
DLX3	↑	↑	↑
GOLGA8A	↑	↑	↑
KLF12	↑	↑	↑
LCK	↑	↑	↑
NR3C1	↑	nc	↑
OR8H1	↑	↑	↑↓
P4HA2	↑	↑	↑
PARD3B	↑	↑	↑

Primary Sequence Name	HepG2	A2780	HCT-8
PHKG1	↑	↑	↑
PIGL	↓	↓	↓
TSPAN10	↑	↑	↑
TSPAN32	↑	nc	↑
VEGFC	↑	↑	↑
WISP1	↑	↑	↑

4.3 Hypoxie

HepG2-Zellen unterschiedlicher Herkunft wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Es wurden sowohl HepG2-Zellen verwendet, die in den hauseigenen Labors kultiviert wurden, als auch HepG2-Zellen, die aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg stammten. Diese Zellen wurden verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Die verwendeten Sauerstoffkonzentrationen waren 1 % O₂ und 5 % O₂ (Hypoxie) sowie 20 % O₂ (Normoxie). Die unter Hypoxie kultivierten HepG2-Zellen wurden via Microarray mit den unter Normoxie kultivierten HepG2-Zellen verglichen. Die verändert exprimierte Gensequenzen, die unter den jeweiligen hypoxischen Bedingungen im Gegensatz zu normoxischen Bedingungen aufgetreten sind, werden im Folgenden beschrieben.

4.3.1 Anzahl der verändert exprimierten Sequenzen (VES)

Die Anzahl der VES in Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden waren, wurde ermittelt. Als Vergleich dienten Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert worden waren. Es stellte sich heraus, dass unter 1 % Sauerstoff mehr Sequenzen verändert reguliert waren als unter 5 % Sauerstoff (vgl. Tab. 4.19). Beispielsweise waren in HepG2-Zellen (Bonn) bei 1 % Sauerstoff 1408 Sequenzen um mehr als Faktor drei hochreguliert, bei 5 % Sauerstoff lediglich noch 467 Sequenzen. Im Vergleich zwischen HepG2-Zellen (Bonn) und HepG2-Zellen (Würzburg) zeigte sich, dass in HepG2-Zellen (Bonn) stets mehr VES auftraten als in HepG2-Zellen (Würzburg).

Tab. 4.19 Anzahl der unter Hypoxie aufgetretenen verändert exprimierten Sequenzen; „Bonn“: HepG2-Zellen, die aus dem BfArM stammten; „Würzburg“: HepG2-Zellen, die aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg stammten; 1 % O₂: Anzahl der VES, die bei Reduktion auf 1 % Sauerstoff auftraten; 5 % O₂: Anzahl der VES, die bei Reduktion auf 5 % Sauerstoff auftraten.

a) Veränderungen um Faktor 3

	$\geq 3,00$		$\leq 0,33$	
	1 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂	5 % O ₂
Bonn	1408	467	1566	241
Würzburg	1141	281	804	157

b) Veränderungen um Faktor 2

	$\geq 2,00$		$\leq 0,50$	
	1 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂	5 % O ₂
Bonn	3643	1320	4119	1035
Würzburg	2914	989	2930	763

4.3.2 Übereinstimmung der VES Hypoxie 1 % und 5 % Sauerstoff

Die Anzahl der VES unter 1 % O₂ war deutlich höher als die Anzahl der VES unter 5 % O₂. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um die Übereinstimmung zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass in HepG2-Zellen (Bonn) für den 3fach hochregulierten Bereich 62,1 % der VES 5 % O₂ in den VES 1 % O₂ wiedergefunden werden konnten, für den 2fach hochregulierten Bereich 51,1 %. Im herunterregulierten Bereich waren die Wiederfindungsraten mit 17,0 % ($\leq 0,33$) und 26,6 % ($\leq 0,50$) nicht ganz so hoch. Für die HepG2-Zellen aus Würzburg zeigte sich ein ähnliches Bild (vgl. Tab. 4.20).

Tab. 4.20 Wiederfindungsrate (WR) VES (5 % O₂) in VES (1 % O₂).

a) Bonn

	≥ 3,00	≤ 0,33	≥ 2,00	≤ 0,50
VES (1 % O ₂)	1408	1566	3643	4119
VES (5 % O ₂)	467	241	1320	1035
VES gemeinsam	290	41	675	275
WR [%]	62,1	17,0	51,1	26,6
Erwartete zufällige Übereinstimmung	19	11	141	125

b) Würzburg

	≥ 3,00	≤ 0,33	≥ 2,00	≤ 0,50
VES (1 % O ₂)	1141	804	2914	2930
VES (5 % O ₂)	281	157	989	763
VES gemeinsam	190	21	534	174
WR [%]	67,6	13,4	54,0	22,8
Erwartete zufällige Übereinstimmung	9	84	4	43

4.3.3 Übereinstimmung der VES der HepG2-Zelllinien Bonn und Würzburg

Die Hypoxieversuche wurden sowohl mit HepG2-Zellen, die im hauseigenen Zellkulturlabor des BfArM kultiviert wurden, als auch mit HepG2-Zellen, die in der Universitäts-Frauenklinik Würzburg kultiviert wurden, durchgeführt, um einen laborübergreifenden Vergleich zu haben. In Tab. 4.21 ist die Anzahl der Genexpressionsveränderungen um den entsprechenden Faktor sowohl für die Hypoxieversuche mit 5 % als auch mit 1 % Sauerstoff dargestellt. In den Bonner und in den Würzburger HepG2-Zellen traten viele Genexpressionsveränderungen auf. Im Vergleich waren die HepG2-Zellen aus Bonn unter Hypoxie stärker verändert. Die Anzahl der Veränderungen, die sowohl in Bonner als auch in den Würzburger HepG2-Zellen auftraten, ist ebenfalls in der Tabelle genannt.

Tab. 4.21 Übereinstimmung VES Hypoxie (Bonn) und VES Hypoxie (Würzburg).

a) 1 % O₂

	≥ 3,00	≤ 0,33	≥ 2,00	≤ 0,50
VES (Bonn)	1408	1566	3643	4119
VES (Würzburg)	1141	804	2914	2930
VES gemeinsam	739	510	1866	2013
WR [%]	64,8	63,4	64,0	68,7
Erwartete zufällige Übereinstimmung	47	37	311	353

b) 5 % O₂

	≥ 3,00	≤ 0,33	≥ 2,00	≤ 0,50
VES (Bonn)	467	241	1320	1035
VES (Würzburg)	281	157	989	763
VES gemeinsam	171	12	459	163
WR [%]	60,9	7,6	46,4	21,4
Erwartete zufällige Übereinstimmung	4	1	38	23

4.3.4 Vergleich der Gensequenzen, die in allen drei Tumorzelllinien hochreguliert waren, mit den Gensequenzen, die unter Hypoxie hochreguliert waren

Die Gensequenzen, die unter Hypoxie um den Faktor 2 hochreguliert waren, wurden mit den Gensequenzen, die in allen drei Tumorzelllinien um den Faktor 3 hochreguliert waren (n=290, s. Tab. 4.14), verglichen. Insgesamt waren davon 35 Gensequenzen sowohl in allen drei Tumorzelllinien als auch in mindestens einem der vier Hypoxie-Settings hochreguliert (s. Tab. 4.22). 9 der Gensequenzen waren in einem Hypoxie-Setting, 13 der Gensequenzen in zwei Hypoxie-Settings, 12 Gensequenzen in drei Hypoxie-Settings und eine Gensequenz in allen vier Hypoxie-Settings hochreguliert.

Tab. 4.22 Gensequenzen, die sowohl in den Tumorzellknoten **aller 3 Tumorzelllinien (A3T)** als auch unter hypoxischen Bedingungen (1 % und 5 % O₂; HepG2-Zelllinien aus Bonn und Würzburg) hochreguliert waren; A3T $\geq 3,00$; Gensequenzen (Hypoxie) $\geq 2,00$.

Gensequenz aus A3T ≥ 3	BN 1% O₂ ≥ 2	BN 5% O₂ ≥ 2	WÜ 1% O₂ ≥ 2	WÜ 5% O₂ ≥ 2
ABI3	ABI3	-	-	-
ABLIM2	ABLIM2	-	ABLIM2	ABLIM2
AEBP1	-	AEBP1	AEBP1	-
BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	-
COL5A1	COL5A1	-	-	-
COL7A1	COL7A1	COL7A1	COL7A1	-
CR597597	CR597597	-	CR597597	-
DRD5	DRD5	-	DRD5	-
ENST00000311208	ENST00000311208	-	ENST00000311208	-
GOLGA8A	-	-	GOLGA8A	-
HBA2	HBA2	-	-	-
HBE1	HBE1	-	-	HBE1
HLA-DOA	-	-	-	HLA-DOA
IGF2	IGF2	IGF2	IGF2	-
IL2RG	IL2RG	IL2RG	IL2RG	-
ITGB1BP3	ITGB1BP3	-	-	-
KRT14	KRT14	-	KRT14	KRT14
MAFB	MAFB	MAFB	MAFB	-
MIA	-	-	MIA	-
MT1B	MT1B	-	MT1B	-
MT1	MT1E	-	MT1E	MT1E
MT1G	-	-	MT1G	MT1G
MT1H	MT1H	-	MT1H	-
MT1L	MT1L	-	MT1L	-
MT1X	MT1X	-	MT1X	MT1X
MT2A	MT2A	-	MT2A	MT2A
NGLY1	NGLY1	-	NGLY1	-
NLRP1	-	-	NLRP1	-
OXTR	OXTR	-	-	-
PPFIA4	PPFIA4	PPFIA4	-	PPFIA4
RBM24	RBM24	-	RBM24	RBM24
SLC2A3	SLC2A3	SLC2A3	SLC2A3	SLC2A3
SYT11	SYT11	-	SYT11	-
TIE1	-	-	TIE1	TIE1
ZNF238	ZNF238	-	ZNF238	-

4.3.5 Vergleich der verändert exprimierten Sequenzen in HepG2 *in ovo* mit den verändert exprimierten Sequenzen unter Hypoxie *in vitro*

Die Gensequenzen, die in HepG2 beim Übergang zum knotigen Wachstum um den Faktor 2 hochreguliert waren (n=3613), wurden mit den Gensequenzen, die in HepG2-Zellen *in vitro* unter Hypoxie um den Faktor 2 hochreguliert waren, verglichen. Es waren 304 Gensequenzen in einem Hypoxie-Setting, 177 Gensequenzen in zwei Hypoxie-Settings, 61 Gensequenzen in drei Hypoxie-Settings und 53 Gensequenzen in allen vier Hypoxie-Settings hochreguliert.

4.4 Rückführung

4.4.1 Vergleich VES Rückführung beider Microarrays miteinander

HepG2-Zellen, die zuvor knotig auf der CAM gewachsen sind, wurden anschließend *in vitro* als einschichtiger Zellrasen kultiviert. Das Expressionsmuster dieser Zellen wurde mit demjenigen von HepG2-Zellen, die ausschließlich *in vitro* kultiviert worden waren, verglichen. Insgesamt wurden zwei Microarrays mit je vier unterschiedlichen Proben durchgeführt. Zunächst wurden beide Microarrays getrennt voneinander betrachtet. Die Gensequenzen, deren medianer Wert der Veränderung bei ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ in allen 4 Proben eines Microarrays lag, wurden in die Kategorien „hoch-“ bzw. „herunterreguliert“ eingeteilt. Alle Gensequenzen, die einen Wert von 0,51 bis 1,99 aufwiesen, fielen in die Kategorie „no change“ und hatten keine Bedeutung für die weitere Auswertung. Die Anzahl der Gensequenzen in der jeweiligen Kategorie sind für Microarray 1 und Microarray 2 in nachfolgender Tabelle angegeben (Tab. 4.23). Anschließend wurden Microarray 1 und Microarray 2 miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind ebenfalls in Tab. 4.23 aufgelistet. Auf Microarray 1 sind beispielsweise 462 Sequenzen mindestens um Faktor 3 hochreguliert, auf Microarray 2 166 Sequenzen. Von diesen Sequenzen sind 42 auf beiden Microarrays gemeinsam um mindestens Faktor 3 nach oben reguliert. Alles, was im Folgenden als „Rückführung“ bezeichnet ist, beinhaltet die Sequenzen, die in Microarray 1 und Microarray 2 nach dem Median aller 8 Einzelproben gleichsinnig um den jeweiligen Faktor verändert sind. Die auf diese Weise erhaltenen Gensequenzen dienten zum Vergleich mit veränderten Gensequenzen verschiedener anderer Microarrays.

Tab. 4.23 Vergleich der Anzahl an VES Rückführung aus beiden Microarrays.

	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
Microarray 1	462	304	1261	838
Microarray 2	132	51	444	320
gemeinsam	42	8	116	45

Die Wiederfindungsrate (vgl. Kap. 4.1.5) der einzelnen Proben untereinander wurde jeweils getrennt nach Microarray 1 und Microarray 2 bestimmt (s. Tab. 4.24). Dafür wurden die Gensequenzen herangezogen, die jeweils um den 3fachen Wert verändert waren. Bezogen auf Microarray 1 liegt die Wiederfindungsrate der Gensequenzen zwischen 53 und 65 %, auf Microarray 2 zwischen 46 und 56 %. Im herunterregulierten Bereich liegt die Wiederfindungsrate auf Microarray 1 zwischen 42 und 64 %, auf Microarray 2 zwischen 33 und 38 %.

Tab. 4.24 Übereinstimmung der Einzelproben VES Rückführung Microarray 1 untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl der Gensequenzen					Wiederfindungsrate [%]				
Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		243	212	228	1		61	53	57
2	156		322	338	2	42		54	57
3	178	234		384	3	48	56		65
4	174	228	321		4	47	54	64	
Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Probe 2 gegen Probe 3; n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=10	n=322
$\leq 0,33$	n=6	n=234

Tab. 4.25 Übereinstimmung der Einzelproben VES Rückführung Microarray 2 untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl der Gensequenzen					Wiederfindungsrate [%]				
Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		94	94	88	1		48	48	49
2	37		99	91	2	37		46	50
3	35	43		101	3	35	25		56
4	39	47	44		4	33	40	38	
Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					Rückführung Übereinstimmung Probe 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Probe 2 gegen Probe 3;
n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=2	n=94
$\leq 0,33$	n=1	n=43

4.4.2 Vergleich der verändert exprimierten Sequenzen nach Rückführung mit den Tumor-assoziierten Veränderungen bei HepG2

Die verändert exprimierten Sequenzen (VES) Rückführung wurden mit den Tumor-assoziierten VES (TA-VES) HepG2 verglichen. Als Grundlage dienten die Sequenzen, die in TA-VES HepG2 und VES Rückführung 2fach und 3fach verändert waren. Die jeweilige Anzahl der Gensequenzen im hoch- und herunterregulierten Bereich sind zur besseren Übersicht in Tab. 4.26 angegeben.

Tab. 4.26 Anzahl der Gensequenzen in TA-VES HepG2 und VES Rückführung.

	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
TA-VES HepG2	3613	1544	6208	4226
VES Rückführung	42	8	116	45

In VES Rückführung und TA-VES HepG2 sind gleichsinnig 40 Gensequenzen um Faktor 2 und 10 Gensequenzen um Faktor 3 hochreguliert (s. Tab. 4.27). Synergistisch herunterreguliert sind 20 Gensequenzen um Faktor 2 und 3 Gensequenzen um Faktor 3.

Es sind 5 Gensequenzen um Faktor 2 in der Rückführung herunter- und in TA-VES HepG2 heraufreguliert, um Faktor 3 ist es eine Gensequenz. Es sind 5 Gensequenzen um Faktor 2 in der Rückführung herauf- und in TA-VES HepG2 herunterreguliert, um Faktor 3 ist es eine Gensequenz.

Tab. 4.27 Übereinstimmende Gensequenzen aus TA-VES HepG2 und VES Rückführung.

a) Veränderungen um Faktor 2

	HepG2 $\geq 2,00$	HepG2 $\leq 0,50$
Rückführung $\geq 2,00$	n=40	n=5
Rückführung $\leq 0,50$	n=5	n=20

b) Veränderungen um Faktor 3

	HepG2 $\geq 3,00$	HepG2 $\leq 0,33$
Rückführung $\geq 3,00$	n=10	n=1
Rückführung $\leq 0,33$	n=1	n=3

Die Gensequenzen der jeweiligen Kategorien sind in Tab. 4.28 angeführt.

Tab. 4.28 Namen der Gensequenzen aus TA-VES HepG2 und VES Rückführung.

HepG2 $\leq 0,50$ Rückführung-VES $\geq 2,0$ antagonistisch n=5	ELK1 GDA LOC553137 MYBPC1	RNU12			
HepG2 $\geq 2,00$ Rückführung-VES $\leq 0,50$ antagonistisch n=5	HBE1 PAX6 RIN2 SIRPA	TMPRSS3			
HepG2 $\leq 0,50$ Rückführung-VES $\leq 0,50$ synergistisch n=20	ALDH8A1 ALDOB ALDOB ANXA13	CHST9 CYP19A1 CYP19A1 CYP19A1	DPP4 DTNA DTX4 EYA2	FURIN GC P2RY8 PNMA6A	SCNN1A SIRPA SLC16A7 TUSC3
HepG2 $\geq 2,00$ Rückführung-VES $\geq 2,00$ synergistisch n=40	ADAMTS6 APCDD1 ARHGEF7 C17orf72 C1QTNF1 CACNA1C CCDC8 CHRNA4 COL7A1	COLEC12 DPF3 DSCR6 FILIP1L GOLGA8A GOLGA8A HDAC9 KIAA1407 KIRREL	LEPR LEPR MFNG MPP3 NDUFA4L2 NR4A1 PRAME PRICKLE2 PRKD1	SALL4 SEC31B SESN3 SLC17A1 SLC19A3 SLC19A3 SPACA5 SPTBN5 SULT1C4	TLR2 TWIST2 WDR52 WDR52

4.4.3 Vergleich A3T mit VES Rückführung

Die verändert exprimierten Sequenzen (VES) der Rückführung wurden mit den Sequenzen verglichen, die in allen drei Tumorarten gleichsinnig verändert waren (A3T). Zur besseren Übersicht ist in Tab. 4.29 die Anzahl der jeweiligen Gruppen angegeben.

Tab. 4.29 Anzahl der Gensequenzen in A3T und VES Rückführung.

	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
A3T	290	14	916	95
Rückführung	42	8	116	45

Da die Anzahl der gemeinsamen Gensequenzen schon in der größeren Gruppe der zweifachen Veränderungen sehr niedrig war, wurde auf die weitere Auswertung der 3fach veränderten Gensequenzen verzichtet. Sowohl in VES Rückführung als auch in A3T sind drei Gensequenzen um den Faktor 2 nach oben reguliert. Eine Gensequenz ist antagonistisch reguliert. In VES Rückführung ist sie um den Faktor 2 nach unten

und in A3T um den Faktor 2 nach oben reguliert. Insgesamt sind in der Menge „A3T \leq 0,5“ so wenige Sequenzen vorhanden, dass keine Schnittmenge mit den VES-Rückführung zustande kam (s. Tab. 4.30). Die Namen der jeweiligen Gensequenzen sind in Tab. 4.31 angegeben.

Tab. 4.30 Übereinstimmende Gensequenzen in A3T und VES Rückführung, Veränderung um Faktor 2.

	A3T $\geq 2,00$	A3T $\leq 0,50$
Rückführung $\geq 2,00$	n=3	n=0
Rückführung $\leq 0,50$	n=1	n=0

Tab. 4.31 Namen der Gensequenzen aus A3T und VES Rückführung.

A3T-VES $\geq 2,00$ Rückführung-VES $\leq 0,50$ antagonistisch n=1	HBE1
A3T-VES $\geq 2,00$ TA-VES HepG2 $\geq 2,00$ synergistisch n=3	C1QTNF1 COL7A1 GOLGA8A

4.5 Dosisfindung von Sorafenib und Cisplatin

4.5.1 Sorafenib

Das Überleben der Putenembryonen nach Sorafenibapplikation war dosisabhängig. Auf Grund der Ergebnisse aus den Dosisfindungsversuchen wurde die Dosis von 1 mg Sorafenib pro Ei für die folgenden Zellversuche gewählt. Dosen $\leq 1,1$ mg/Ei wurden problemlos vertragen, Dosen $\geq 2,2$ mg waren zu 100 % letal. Der Bereich zwischen 1,1 und 2,2 mg zeigte eine klare Dosisabhängigkeit (s. Tab. 4.32). Eier, deren Schale geöffnet und deren CAM verlagert wurde, waren jedoch deutlich empfindlicher. Eine Dosis von 1 mg/Ei war bereits letal. Zudem waren die Tumorraten äußerst gering und die wenigen entstandenen Tumoren zu klein, um daraus genügend RNA zu isolieren. Die Sorafenibdosis wurde daraufhin für die Behandlung der HepG2-Tumorzellknoten auf 0,5 mg pro Ei reduziert.

Tab. 4.32 Überlebensraten der Embryonen in den Dosisfindungsversuchen Sorafenib 1 bis Sorafenib 4; n: Anzahl der Eier an Versuchstag 8; ÜR: Überlebensrate von Versuchstag 8 bis Versuchstag 24; Sorafenib^a: 50 µL Injektionsvolumen; Sorafenib^b: 100 µL Injektionsvolumen.

Dosis Sorafenib [mg/Ei]	Sorafenib ^a 1		Sorafenib ^b 2		Sorafenib ^b 3		Sorafenib ^b 4	
	n	ÜR [%]	n	ÜR [%]	n	ÜR [%]	n	ÜR [%]
0 (DMSO)	15	73	8	75	7	100	15	73
0,044	14	79			18	72		
0,22	15	60			18	56		
1,1	15	87					25	72
1,4							25	68
1,8							25	40
2,1							25	12
2,2			15	0	18	0		
7,3			15	0	18	0		
24			15	13				

4.5.2 Cisplatin

Das Überleben der Putenembryonen nach Cisplatinapplikation war dosisabhängig (s. Tab. 4.33). Im Bereich von 2,0 mg Cisplatin/Ei bis 0,066 mg Cisplatin/Ei stiegen die Überlebensraten von 0 % auf 85 % an. Für die weiteren Versuche wurden eine Dosis von 1 mg/Ei und eine Inkubationsdauer von 24 h gewählt.

Tab. 4.33 Überlebensraten der Embryonen in den Dosisfindungsversuchen Cisplatin 1 bis Cisplatin 3; n: Anzahl der Eier an Versuchstag 20; ÜR: Überlebensrate von Versuchstag 20 bis Versuchstag 24.

Dosis Cisplatin [mg/Ei]	Cisplatin1		Cisplatin2		Cisplatin 3	
	n	ÜR [%]	n	ÜR [%]	n	ÜR [%]
0 (NaCl)	6	100	11	82	12	92
0,07	10	70				
0,33	10	80	11	64	22	73
0,77			11	73	22	77
1,21			11	36	22	59
1,65	10	10	11	19		
2			11	0		

4.6 Behandlung der HepG2-Tumorzellknoten mit Sorafenib

4.6.1 Tumorwachstum unter Sorafenib

An Tag 7 wurden in jedes Ei der Behandlungsgruppe 0,5 mg Sorafenib in 100 µL DMSO injiziert. Die Eier der Kontrollgruppe erhielten jeweils 100 µL DMSO. An Tag 12 wurden die Eier, deren CAM nicht intakt war, aussortiert. Eine HepG2-Zellsuspension wurde auf die intakten CAMs appliziert. An Tag 24 wurden die entstandenen Tumoren herausgeschnitten. In Versuch CAM-Sorafenib 1 hatten 65 % der Embryonen der Sorafenibgruppe an Tag 24 einen Tumorzellknoten entwickelt und 39 % der Embryonen der Kontrollgruppe. 29 % der Embryonen der Sorafenibgruppe in Versuch CAM-Sorafenib 2 hatten an Tag 24 einen Tumorzellknoten entwickelt, 53 % der Embryonen der Kontrollgruppe (s. Tab. 4.34).

Tab. 4.34 Übersicht über das Tumorwachstum in den Versuchen CAM-Sorafenib 1 und 2; n: Anzahl.

Dosis Sorafenib [mg/Ei]	CAM-Sorafenib 1			CAM-Sorafenib 2		
	n [Eier]	n [Tumoren]	Tumorrates [%]	n [Eier]	n [Tumoren]	Tumorrates [%]
0,5	23	15	65	31	9	29
0 (DMSO)	18	7	39	15	8	53

Sowohl im makroskopischen als auch im histologischen Bild zeigten die mit Sorafenib behandelten Tumoren große nekrotische Bereiche im Vergleich zu mit DMSO behandelten Tumoren. Dennoch war es möglich, aus den vitalen Bereichen RNA zu isolieren, die für einen Microarray verwendet werden konnte.

4.6.2 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Sorafenib *in ovo*

Das Genexpressionsmuster eines mit Sorafenib behandelten HepG2-Tumorzellknotens wurde jeweils mit dem Genexpressionsmuster eines DMSO-Kontrolltumorzellknotens verglichen. Insgesamt wurden auf diese Weise vier Tumorpaaire betrachtet. In unten angeführter Tabelle ist die jeweilige Anzahl der Gensequenzen, die im behandelten Tumorzellknoten im Vergleich zum unbehandelten Tumorzellknoten hoch- bzw. herunterreguliert sind, für jedes Tumorpaaire aufgelistet. Außerdem wurde für jede Gensequenz ein medianer Wert aus allen vier Ratios gebildet. Gensequenzen, für die dieser Median um das entsprechende Vielfache verändert war, sind ebenfalls angegeben (vgl. Tab. 4.35). Der Median gibt die Tendenz „hochreguliert“ bzw. „herunterreguliert“ für die entsprechende Gensequenz an.

Tab. 4.35 Anzahl der VES Sorafenib in ovo.

	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
Paar 1	223	309	805	1043
Paar 2	669	230	1701	958
Paar 3	175	170	653	713
Paar 4	332	257	977	802
\tilde{x}	174	12	528	135

Jeder Tumor, der mit Sorafenib behandelt wurde, weist unterschiedlich viele Gensequenzen auf, die im Vergleich zu Kontrolltumoren herauf- bzw. herunterreguliert sind. Im Folgenden wurden diese Veränderungen, die sich vom jeweiligen behandelten Tumor zum unbehandelten Tumor ergaben, innerhalb der Paare miteinander verglichen. Im 3fach hochregulierten Bereich liegt die Wiederfindungsrate zwischen 15 und 57 %, im 3fach herunterregulierten Bereich zwischen 4 und 13 % (s. Tab. 4.36).

Tab. 4.36 Übereinstimmung der Paare VES Sorafenib in ovo untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl Gensequenzen					Wiederfindungsrate [%]				
Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		96	26	59	1		43	15	26
2	29		99	177	2	13		57	53
3	6	15		64	3	4	9		37
4	13	17	8		4	7	9	5	
Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Paar 2 gegen Paar 4; n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=14	n=177
$\leq 0,33$	n=3	n=17

4.6.3 Übereinstimmung VES Sorafenib *in ovo* mit TA-VES HepG2

Die VES Sorafenib *in ovo* (s. 4.6.2) wurden mit den TA-VES HepG2 verglichen. Die Anzahl der jeweiligen Gensequenzen der einzelnen Tumoren bzw. Tumorpaaare im Fall von Sorafenib ist zur besseren Übersicht in Tab. 4.37 aufgelistet.

Tab. 4.37 Anzahl der Gensequenzen in TA-VES HepG2 und VES Sorafenib *in ovo*.

	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
TA-VES HepG2	3613	1544	6208	4226
VES Sorafenib	174	12	528	135

179 Gensequenzen sind synergistisch um Faktor 2 nach oben reguliert, 45 um Faktor 3. 17 Gensequenzen sind synergistisch um Faktor 2, keine um Faktor 3 nach unten reguliert. 33 Gensequenzen sind antagonistisch um Faktor 2 in den TA-VES HepG2 nach oben und in VES Sorafenib nach unten reguliert, eine Gensequenz um Faktor 3. Es sind 45 Gensequenzen antagonistisch um Faktor 2 in TA-VES HepG2 nach unten und in VES Sorafenib nach oben reguliert, 6 um Faktor 3. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.38 zusammengefasst.

Tab. 4.38 Übereinstimmende Gensequenzen aus TA-VES HepG2 und VES Sorafenib *in ovo*; n: Anzahl der Gensequenzen.

a) Veränderungen um Faktor 2

	VES HepG2 $\geq 2,00$	VES HepG2 $\leq 0,50$
VES Sorafenib $\geq 2,00$	n=179	n=45
VES Sorafenib $\leq 0,50$	n=33	n=17

b) Veränderungen um Faktor 3

	VES HepG2 $\geq 3,00$	VES HepG2 $\leq 0,33$
VES Sorafenib $\geq 3,00$	n=45	n=6
VES Sorafenib $\leq 0,33$	n=1	0

In Tab. 4.39 sind die Namen der Gensequenzen, die um das 3fache verändert sind, angegeben.

Tab. 4.39 Übereinstimmende Gensequenzen mit 3facher Veränderung.

VES Sorafenib $\leq 0,33$ TA-VES HepG2 $\geq 3,00$ antagonistisch n=1	SCN2B				
VES Sorafenib $\geq 3,00$ TA-VES HepG2 $\leq 0,33$ antagonistisch n=6	C6 CYP19A1 GCK GSTA5	MYBPC1 SLC4A1			
VES Sorafenib $\geq 3,00$ TA-VES HepG2 $\geq 3,00$ synergistisch n=45	ADARB2 AVPR1B BCL11B C18orf34 C4orf6 C9orf44 CACNA1C CCRL2 CFC1	CYP11A1 DPF3 EPST1 FAT2 FOLR2 FOXR1 GRIK3 HBA2 HBA2	HBA2 HBQ1 HIVEP3 HSPA6 IL10 ISL1 JAZF1 KHDRBS2 KIRREL	LPXN MAGEC1 MGAM MPL NAPRT1 OPCML OR4C46 PBX1 PDZRN4	PFKFB3 PLVAP SLC22A11 SLC43A3 SPACA5 SYCN TDRD10 THEG TTC9B

4.6.4 Vergleich VES Rückführung mit VES Sorafenib *in ovo*

Die Genexpression der Rückführung wurde mit der Genexpression der mit Sorafenib behandelten Tumoren verglichen (s. Tab. 4.40). 29 Gensequenzen sind synergistisch um Faktor 2, 15 Gensequenzen um Faktor 3 nach oben reguliert. Es gibt keine Gensequenzen, die synergistisch nach unten reguliert sind. Eine Gensequenz war um Faktor 2 in VES Sorafenib nach unten und in den VES Rückführung nach oben reguliert, keine Gensequenz um Faktor 3. 4 Gensequenzen waren um Faktor 2 in den VES Rückführung nach unten und in VES Sorafenib nach oben reguliert, eine Gensequenz um Faktor 3.

Tab. 4.40 Übereinstimmende Gensequenzen aus VES Rückführung und VES Sorafenib *in ovo*; n: Anzahl der Gensequenzen.

	VES Rückführung $\geq 2,00$	VES Rückführung $\leq 0,50$
VES Sorafenib $\geq 2,00$	n=29	n=4
VES Sorafenib $\leq 0,50$	n=1	n=0

	VES Rückführung $\geq 3,00$	VES Rückführung $\leq 0,33$
VES Sorafenib $\geq 3,00$	n=15	n=1
VES Sorafenib $\leq 0,33$	n=0	n=0

Tab. 4.41 Übereinstimmende Gensequenzen mit Veränderung um Faktor 3.

VES Sorafenib $\geq 3,00$ VES Rückführung $\leq 0,33$ antagonistisch n=1	CYP19A1				
VES Sorafenib $\geq 3,00$ VES Rückführung $\geq 3,00$ synergistisch n=15	AKNA ANKRD62 C22orf33 CACNA1C	CASR DPF3 EFCAB9 FILIP1L	KIRREL LOC100130954 PLCB4 SCARNA4	SPACA5 TMEM71 UMODL1	

4.6.5 Vergleich VES Sorafenib *in ovo* mit A3T

Die Gensequenzen, die in allen drei Tumorarten (A3T) um Faktor 2 gemeinsam herauf- oder herunterreguliert waren, wurden mit den Veränderungen, die Sorafenib bei HepG2-Tumorzellknoten hervorrief, verglichen.

Tab. 4.42 Übereinstimmende Gensequenzen von A3T und VES Sorafenib *in ovo*, Veränderungen um Faktor 2; n: Anzahl der Gensequenzen; [n]: Anzahl der Gensequenzen, die *in vitro* unter Sorafenib in die gleiche Richtung reguliert sind wie bei Sorafenib *in ovo*.

	A3T $\geq 2,00$	A3T $\leq 0,50$
VES Sorafenib $\geq 2,00$	n=15 [0]	n=2 [1]
VES Sorafenib $\leq 0,50$	n=2 [1]	n=0

Durch die Behandlung von HepG2-Zellen mit anschließendem Microarray war es möglich, auch diejenigen Veränderungen auf die Genexpressionsmuster zu erfassen, die Sorafenib bei einschichtigen HepG2-Zellrasen hervorrief. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass nicht alle der Veränderungen, die Sorafenib in den Tumorknoten hervorrief, im Vorfeld durch *in vitro*-Versuche hätten erkannt werden können. Es war nur eine Gensequenz, die in A3T herunter- und unter Sorafenibbehandlung heraufreguliert war, *in vitro* unter Sorafenibbehandlung ebenfalls heraufreguliert.

Tab. 4.43 Übereinstimmende Gensequenzen mit Veränderungen um Faktor 2 (* *in vitro* in die gleiche Richtung reguliert; + *in vitro* gegenläufig reguliert).

VES Sorafenib $\leq 0,50$ VES A3T $\geq 2,00$ antagonistisch n=2	FRMD4A HLA-DPB2
VES Sorafenib $\geq 2,00$ VES A3T $\leq 0,50$ antagonistisch n=2	CYP1A1 ⁺ GSTA2 [*]

VES Sorafenib $\geq 2,00$	EPSTI1	HBA2	KIFC2	THEG
VES A3T $\geq 2,00$	FGD2	HBQ1	MGAM	TRPV5
synergistisch	FOXR1	ITGB1BP3	NPHS2	ZNF467
n=15	GRIK3	JAZF1	PELI2	

4.7 Behandlung der HepG2-Zellen *in vitro* mit Sorafenib

4.7.1 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Sorafenib *in vitro*

Das Genexpressionsmuster von mit Sorafenib behandelten HepG2-Zellen wurde jeweils mit dem Genexpressionsmuster von mit DMSO behandelten HepG2-Zellen verglichen. Insgesamt wurden auf diese Weise vier Paare betrachtet. In Tab. 4.44 ist die jeweilige Anzahl der Gensequenzen, die in mit Sorafenib behandelten HepG2-Zellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten HepG2-Zellen hoch- bzw. herunterreguliert sind, für jedes Paar aufgelistet. Außerdem wurde für jede Gensequenz ein medianer Wert aus allen 4 Ratios gebildet. Der Median gibt die Tendenz „hochreguliert“ bzw. „herunterreguliert“ für die entsprechende Gensequenz an.

Tab. 4.44 Anzahl VES Sorafenib HepG2 *in vitro*.

HepG2/Sorafenib	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
Paar 1	321	326	1138	1173
Paar 2	353	247	1238	1075
Paar 3	347	342	1230	1163
Paar 4	279	265	1057	1032
nach Median	216	200	809	737

Zudem wurde die Übereinstimmung der VES in den vier Paaren untereinander betrachtet (s. Tab. 4.45). Im 3fach hochregulierten Bereich liegt die Wiederfindungsrate zwischen 45 und 59 %, im 3fach herunterregulierten Bereich zwischen 50 und 65 %.

Tab. 4.45 Übereinstimmung der Paare VES Sorafenib HepG2 *in vitro* untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl Gensequenzen					Wiederfindungsrate [%]				
Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		143	170	157	1		45	53	56
2	123		158	156	2	50		46	56
3	182	136		164	3	56	55		59
4	151	126	173		4	57	51	65	
Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					Sorafenib Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Paar 1 gegen Paar 3; n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=4	n=170
$\leq 0,33$	n=4	n=182

4.7.2 Vergleich VES Sorafenib *in ovo* mit VES Sorafenib *in vitro*

Nicht alle Genexpressionsveränderungen, die bei HepG2-Tumorzellknoten *in ovo* nach der Sorafenibbehandlung aufgetreten sind, traten auch in HepG2-Zellen *in vitro* auf (s. Tab. 4.46). Beispielsweise waren nur 69 der Gensequenzen sowohl *in ovo* als auch *in vitro* um mindestens Faktor 2 nach oben und 15 Gensequenzen um mindestens Faktor 2 nach unten reguliert. Entgegengesetzt reguliert waren 29 bzw. 8 Gensequenzen.

Tab. 4.46 Übereinstimmende Gensequenzen VES HepG2+Sorafenib in ovo mit VES HepG2+Sorafenib in vitro.

a) Veränderungen um Faktor 2

	HepG2 <i>in vitro</i> + Sorafenib ≥ 2,00 n=809	HepG2 <i>in vitro</i> + Sorafenib ≤ 0,50 n=737	HepG2 <i>in vitro</i> + Sorafenib 0,67-1,5 n=25087
HepG2-Tumorzellknoten + Sorafenib ≥ 2,00 n=528	n=69	n=29	n=406
HepG2-Tumorzellknoten + Sorafenib ≤ 0,50 n=135	n=8	n=15	n=114

b) Veränderungen um Faktor 3

	HepG2 <i>in vitro</i> + Sorafenib ≥ 3,00 n=216	HepG2 <i>in vitro</i> + Sorafenib ≤ 0,33 n=200	HepG2 <i>in vitro</i> + Sorafenib 0,67-1,5 n=25087
HepG2-Tumorzellknoten + Sorafenib ≥ 3,00 n=174	n=20	n=3	n= 132
HepG2-Tumorzellknoten + Sorafenib ≤ 0,33 n=12	n=1	n=0	n=10

Tab. 4.47 Übereinstimmende Gensequenzen mit Veränderungen um Faktor 3.

VES Sora-Tu ≤ 0,33 VES Sora-HepG2 in vitro ≥ 3,00 antagonistisch n=1	SCN2B
VES Sora-Tu ≥ 3,00 VES Sora-HepG2 ≤ 0,33 antagonistisch n=3	FILIP1L MAML3 SPRY4

VES Sora-Tu $\geq 3,00$	ADARB2	EPB41L1	ISL1	NAPRT1	RBFOX1
VES Sora-HepG2 0,67 – 1,50	AKNA	EPSTI1	JAZF1	NLGN1	SIRPB1
antagonistisch	ANKRD5 6	F2RL2	KHDRBS2	NLRP4	SLA2
n=132	ANKRD6 2	FAM101A	KIAA1239	NPY2R	SLC10A7
	AQP4	FAM155A	KIRREL	OPCML	SLC22A11
	ARHGA P40	FAM159A	KREMEN1	OPRL1	SLC43A3
	ATG9B	FANK1	KRTAP10-9	OR4C46	SLC4A1
	AVPR1B	FAT2	LOC100128881	OR6Q1	SPACA5
	BCL11B BEND2	FCRL6 FLJ36644	LOC100129111 LOC100130920	OR7A17 OSBPL6	SPRY4 SULT1C3
	BMP3 BMP7 C14orf23 C17orf77	FLJ41941 FOLR2 FOXR1 GAS1	LOC100132396 LOC100133145 LOC100287326 LOC283693	OTOG P2RX7 PBX1 PCLO	SUN5 SYCN SYT14 TDRD10
	C18orf34 C20orf12 3	GCK GLI2	LOC400682 LOC440896	PDZRN4 PIRT	THEG TIGIT
	C4orf6	GOT1L1	LOC644554	PKD1L3	TMEM233
	C6orf170	GPAT2	LOC646034	PKP1	TMEM71
	C8orf73 C8orf84	GRIK3 HBA2	LPXN MAGEC1	PLCB4 PLVAP	TSIX TSPYL5
	CACNA1 C	HBA2	MAML3	PRAMEF12	ULBP1
	CADM2	HBA2	MEGF11	PRDM5	UMODL1
	CCRL2 CFC1 CSTL1 CXCR7 DPF3	HIVEP3 HOXD11 HSPA6 HTRA4 IL10	MGAM MPL MS4A2 MT1IP MYBPC1	PROM2 PROM2 PRPF40B PRSS48 PRY2	USP30 ZFP92
VES Sora-Tu $\leq 3,00$	AHNAK2	LRRC16A	TTBK1		
VES Sora-HepG2 0,67 – 1,50	CPA1	SCN2B	ZNF214		
antagonistisch	GSC	SLC16A2			
n=10	H1FOO	SNORD15A			
VES Sora-Tu $\geq 3,00$	AKAP14	C6	EFCAB9	LOC100130954	SPACA5
VES Sora-HepG2 $\geq 3,00$	AKNA	CACNA1C	FILIP1L	OSBPL6	TDRD10
synergistisch	ANKRD6 2	CASR	GSTA5	PLCB4	TMEM71
n=20	C22orf33	DPF3	KIRREL	SCARNA4	UMODL1

4.8 Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin

4.8.1 Tumorwachstum unter Cisplatin

Behandlungseffekte von Cisplatin auf die Tumorzellknoten waren auf Grund der kurzen Behandlungsdauer weder makroskopisch noch histologisch erkennbar.

4.8.2 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Cisplatin *in ovo*

Das Genexpressionsmuster eines mit Cisplatin behandelten A2780- Tumorzellknotens wurde jeweils mit dem eines NaCl-Kontrolltumorzellknotens verglichen. Insgesamt wurden auf diese Weise vier Tumorpaaire betrachtet. In unten angeführter Tabelle (Tab. 4.48) ist die jeweilige Anzahl der Gensequenzen, die hoch- bzw. herunterreguliert sind, für jedes Tumorpaaire aufgelistet. Außerdem wurde für jede Gensequenz ein medianer Wert aus vier Ratios gebildet.

Tab. 4.48 Anzahl VES Cisplatin *in ovo*.

A2780/Cisplatin	≥ 3,00	≤ 0,33	≥ 2,00	≤ 0,50
Paar 1	1293	1477	3668	3469
Paar 2	1152	586	2626	1937
Paar 3	790	355	1807	1372
Paar 4	1511	1337	3307	3262
nach Median	668	112	1611	620

Auch hier wurde die Übereinstimmung der VES in den vier Tumorpaairen untereinander betrachtet (s. Tab. 4.49). Im 3fach hochregulierten Bereich liegt die Wiederfindungsrate zwischen 20 und 70 %, im 3fach herunterregulierten Bereich zwischen 12 und 35 %.

Tab. 4.49 Übereinstimmung der Paare VES Cisplatin *in ovo* untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl Gensequenzen					Wiederfindungsrate [%]				
Cisplatin Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					Cisplatin Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		249	221	256	1		22	28	20
2	69		521	664	2	12		66	58
3	115	55		551	3	32	15		70
4	178	206	105		4	13	35	30	
Cisplatin Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					Cisplatin Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Paar 1 gegen Paar 3; n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=36	n=221
$\leq 0,33$	n=18	n=115

4.8.3 Vergleich VES Cisplatin *in ovo* mit TA-VES A2780

Die VES der A2780-Tumorzellknoten nach Cisplatinbehandlung wurden mit den TA-VES A2780 verglichen. Die Anzahl der jeweiligen Gensequenzen der einzelnen Tumoren bzw. Tumorpaaire im Fall von Cisplatin ist zur besseren Übersicht in Tab. 4.50 aufgelistet.

Tab. 4.50 Anzahl der Gensequenzen in TA-VES A2780 und VES Cisplatin *in ovo*.

	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
TA-VES A2780	1555	933	3362	2640
VES Cisplatin	668	112	1611	620

134 Gensequenzen sind synergistisch um Faktor 2 nach oben reguliert, 26 um den Faktor 3. 44 Gensequenzen sind synergistisch um Faktor 2, 4 um Faktor 3 nach unten reguliert. 71 Gensequenzen sind antagonistisch um Faktor 2 in TA-VES A2780 nach

oben und in VES Cisplatin nach unten reguliert, 6 um Faktor 3. Es sind 248 Gensequenzen antagonistisch um Faktor 2 in TA-VES A2780 nach unten und in VES Cisplatin nach oben reguliert, 52 um Faktor 3. Die Ergebnisse sind in Tab. Tab. 4.51 zusammengefasst.

Tab. 4.51 Übereinstimmende Gensequenzen aus TA-VES A2780 mit VES Cisplatin in ovo.

a) Veränderungen um Faktor 2

	A2780 ≥ 2,00	A2780 ≤ 0,50
Cisplatin ≥ 2,00	n=134	n=248
Cisplatin ≤ 0,50	n=71	n=44

b) Veränderungen um Faktor 3

	A2780 ≥ 3,00	A2780 ≤ 0,33
Cisplatin ≥ 3,00	n=26	n=52
Cisplatin ≤ 0,33	n=6	n=4

In Tab. 4.52 sind die Namen der Gensequenzen, die um Faktor 3 verändert sind, angegeben.

Tab. 4.52 Übereinstimmende Gensequenzen mit Veränderungen um Faktor 3.

VES Cispt ≤ 0,33	CYP7B1	OR8H1			
TA-VES A2780 ≥ 3,00	KCNMA1	RORA			
antagonistisch	KLHL14				
n=6	MAFB				
VES Cispt ≥ 3,00	ADORA2A	EPAS1	IL1R2	PMAIP1	TRIM55
TA-VES A2780 ≤ 0,33	AHSG	FAM84B	IL21R	PRSS23	TRIM55
antagonistisch	CAV2	FOSB	IL22RA1	PTGIR	TRPM6
n=52	CCRL2	FZD6	KITLG	PVRL4	TSGA10
	CD33	GNG11	LAMP3	QPCT	UNC45B
	CPA1	GPR56	LGALS8	RNF43	XG
	CSTA	GPR84	MAEL	SAA4	XG
	CTGF	HS1BP3	PCSK9	SERPINA3	ZFP42
	CYR61	HSF2BP	PGC	SYNE1	
	DIRAS3	HUS1B	PLCB4	TFPI2	
	EDN2	IGF2	PLXDC1	TNFSF9	

VES Cispt $\leq 0,33$	CNTNAP2				
TA-VES A2780 $\leq 0,33$	COLEC12				
synergistisch	LOC283454				
n=4	PLA2G3				
VES Cispt $\geq 3,00$	ANK1	CCL2	FGD4	MAFB	UBD
TA-VES A2780 $\geq 3,00$	ANK1	CRH	GPR172B	MUC6	WDFY4
synergistisch	ANKRD37	CRISPLD2	HLA-DOA	MYBPC2	
n=26	BIRC3	CYP2F1	IGF2	PRODH	
	C9orf47	DPF3	LTB	RGMA	
	C9orf47	EPAS1	LY6D	TDRD10	

4.8.4 Vergleich VES Cisplatin *in ovo* mit A3T

Die Gensequenzen, die in allen drei Tumorarten (A3T) um Faktor 2 gemeinsam herauf- oder herunterreguliert waren, wurden mit den Veränderungen, die Cisplatin bei A2780-Tumoren hervorrief, verglichen.

Tab. 4.53 Übereinstimmende Gensequenzen von A3T mit VES Cisplatin *in ovo*; Veränderungen um Faktor 2; [n]: Anzahl der Gensequenzen, die *in vitro* unter Cisplatin in die gleiche Richtung reguliert sind wie bei Cisplatin *in ovo*.

	A3T $\geq 2,00$	A3T $\leq 0,50$
VES Cisplatin $\geq 2,00$	n=27 [8]	n=11 [4]
VES Cisplatin $\leq 0,50$	n=18 [2]	n=3 [0]

Durch die Behandlung von A2780-Zellen und anschließenden Microarray war es möglich, auch diejenigen Veränderungen auf die Genexpressionsmuster zu erfassen, die Cisplatin bei einschichtigen A2780-Zellrasen hervorrief. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass nicht alle der Veränderungen, die Cisplatin in den Tumorknoten hervorrief, im Vorfeld durch *in vitro*-Versuche hätten erkannt werden können. Es waren zum Beispiel 8 von 27 Gensequenzen, die sowohl in A3T als auch unter Cisplatinbehandlung heraufreguliert war, *in vitro* unter Cisplatinbehandlung ebenfalls heraufreguliert (s.Tab. 4.53). Die Namen der entsprechenden Gensequenzen sind im Folgenden angegeben (s. Tab. 4.54).

Tab. 4.54 Übereinstimmende Gensequenzen mit Veränderungen um Faktor 2 (* *in vitro* in die gleiche Richtung reguliert; + *in vitro* gegenläufig reguliert).

VES Cisplatin $\leq 0,50$	ABI3	DKFZp547G183	GLRA1	LOC151878
VES A3T $\geq 2,00$	BASP1	DLX3	HIST1H3B*	LOC158863
antagonistisch	BGN*	EXOC3L2	HLA-DPB2	MAFB ⁺
n= 18	CCNB2	FBXL7	KRT14	
	CTNND2	GJA9	KRT75	
VES Cisplatin $\geq 2,00$	APOB48R	EPN3*	HUS1B	
VES A3T $\leq 0,50$	BMP8A	FOS	P2RY6	
antagonistisch	CNNM2	FOSB	PCSK9*	
n=11	DAO*	GATS*		
VES Cisplatin $\leq 0,50$	HIST1H4G			
VES A3T $\leq 0,50$	SLC2A4			
synergistisch	USP2			
n=3				
VES Cisplatin $\geq 2,00$	AHSA2	EPB41L4B	MAFB*	MT2A
VES A3T $\geq 2,00$	ANKK1	FLJ42393	MAMDC4	NLRP1
synergistisch	ANKRD37	GADD45B	MIA	PDE4C*
n=27	BIRC3	HLA-DOA*	MT1B	RGMA*
	C1orf162	IGF2*	MT1E	SLC2A5*
	CYP2F1*	LG14	MT1H	TRIOBP
	DNAJA4	LY6D*	MT1L	

4.9 Behandlung der A2780-Zellen *in vitro* mit Cisplatin

4.9.1 Verändert exprimierte Sequenzen (VES) Cisplatin *in vitro*

Das Genexpressionsmuster von mit Cisplatin behandelten A2780-Zellen wurde jeweils mit demjenigen von mit NaCl inkubierten A2780-Zellen verglichen. Insgesamt wurden auf diese Weise vier Probenpaare (unterschiedliche Zeitpunkte) betrachtet. In Tab. 4.48 ist die jeweilige Anzahl der Gensequenzen, die hoch- bzw. herunterreguliert sind, für jedes Probenpaar aufgelistet. Außerdem wurde für jede Gensequenz ein medianer Wert aus vier Ratios gebildet.

Tab. 4.55 Anzahl VES Cisplatin *in vitro*.

A2780/Cisplatin	$\geq 3,00$	$\leq 0,33$	$\geq 2,00$	$\leq 0,50$
Paar 1	457	244	1343	987
Paar 2	488	198	1244	992
Paar 3	506	196	1302	998
Paar 4	394	125	1107	721
nach Median	341	31	813	304

Anschließend wurde die Übereinstimmung der VES in den vier Paaren untereinander betrachtet. Im 3fach hochregulierten Bereich liegt die Wiederfindungsrate zwischen 49 und 69 %, im 3fach herunterregulierten Bereich zwischen 13 und 22 %.

Tab. 4.56 Übereinstimmung der Paare VES Cisplatin *in vitro* untereinander und Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung; linke Spalte: Anzahl VES; rechte Spalte Wiederfindungsrate [%].

Anzahl Gensequenzen					Wiederfindungsrate [%]				
Cisplatin <i>in vitro</i> Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)					Cisplatin <i>in vitro</i> Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\geq 3,00$)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1		248	236	195	1		54	52	49
2	41		339	219	2	21		69	56
3	37	37		224	3	19	19		57
4	27	26	16		4	22	21	13	
Cisplatin <i>in vitro</i> Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)					Cisplatin <i>in vitro</i> Übereinstimmung Paar 1 bis 4 ($\leq 0,33$)				

Vergleich mit erwarteter zufälliger Übereinstimmung am Beispiel Paar 1 gegen Paar 3; n: Anzahl der Gensequenzen.

Ratio	Erwartete zufällige Übereinstimmung	Tatsächliche Übereinstimmung
$\geq 3,00$	n=8	n=236
$\leq 0,33$	n=2	n=37

4.9.2 Vergleich VES Cisplatin *in ovo* mit VES Cisplatin *in vitro*

Die Genexpressionsveränderungen, die durch Cisplatin in A2780-Tumorzellknoten *in ovo* hervorgerufen wurden, traten zu einem großen Teil nicht in A2780-Zellen *in vitro* auf (s. Tab. 4.57). Es waren zum Beispiel nur 291 der Gensequenzen sowohl *in ovo* als auch *in vitro* um mindestens Faktor 2 nach oben und 58 der Gensequenzen um mindestens Faktor 2 nach unten reguliert. Entgegengesetzt reguliert waren 7 beziehungsweise 82 Gensequenzen.

Tab. 4.57 Übereinstimmende Gensequenzen VES Cisplatin *in ovo* mit VES Cisplatin *in vitro*.

a) Veränderungen um Faktor 2

	A2780 <i>in vitro</i> + Cisplatin ≥ 2,00 n=813	A2780 <i>in vitro</i> + Cisplatin ≤ 0,50 n=304	A2780 <i>in vitro</i> + Cisplatin 0,67-1,5 n=26493
A2780 <i>in ovo</i> + Cisplatin ≥ 2,00 n=1611	n=291	n=82	n=834
A2780 <i>in ovo</i> + Cisplatin ≤ 0,50 n=620	n=7	n=58	n=486

b) Veränderungen um Faktor 3

	A2780 <i>in vitro</i> + Cisplatin ≥ 3,00 n=341	A2780 <i>in vitro</i> + Cisplatin ≤ 0,33 n=31	A2780 <i>in vitro</i> + Cisplatin 0,67-1,5 n=26493
A2780 <i>in ovo</i> + Cisplatin ≥ 3,00 n=668	n=256	n=6	n=270 von 668
A2780 <i>in ovo</i> + Cisplatin ≤ 0,33 n=112	n=2	n=1	n=77 von 112

Tab. 4.58 Übereinstimmende Gensequenzen mit Veränderungen um Faktor 3.

VES Cisplatin <i>in ovo</i> ≤ 0,33 VES Cisplatin <i>in vitro</i> ≥ 3,00 antagonistisch n=2	CACNA1C CACNA1C				
VES Cisplatin <i>in ovo</i> ≥ 3,00 VES Cisplatin <i>in vitro</i> ≤ 0,33 antagonistisch n=6	GNAZ SLC23A3	KIAA1751	KSR2	LOC339524	PFN1P2
VES Cisplatin <i>in ovo</i> ≤ 0,33 VES Cispt-A2780 ≤ 0,33 synergistisch n=1	ACTL8				
VES Cisplatin <i>in ovo</i> ≥ 3,00 VES Cisplatin <i>in vitro</i> ≥ 3,00 synergistisch n=256	Namen s. Tab. 8.4 im Anhang				

4.10 Platingehalt im Lebergewebe

Durch die Messung von Platin im Lebergewebe mittels der flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie konnte gezeigt werden, dass das Zielorgan erreicht wurde. Die auf den Platingehalt untersuchten Lebern entstammten Embryonen, auf deren CAM an d20 je 1 mg Cisplatin oder an d23 je 1 bzw. 2 mg Cisplatin appliziert worden war. Lebern unbehandelter Embryonen dienten als Kontrolle. In Lebern aus Kontrolleiern konnte kein Platin nachgewiesen werden. Bei Applikation von 1 mg Cisplatin pro Ei an d20 konnten 2,60 mg Platin pro Liter in der Leber nachgewiesen werden. Bei 1 mg Cisplatin pro Ei an d23 waren es durchschnittlich ebenfalls 2,60 mg Platin pro Liter Lebergewebe. Wurden 2 mg Cisplatin an d23 appliziert, konnten im Mittel 2,83 mg Platin pro Liter Lebergewebe nachgewiesen werden. Bei Applikation von 2 mg/mL Cisplatin war die Überlebensrate der Putenembryonen geringer als bei Applikation von 1 mg/mL. Weder der Zeitpunkt der Applikation noch die verabreichte Cisplatinosis hatten einen Einfluss auf die Platinkonzentration im Lebergewebe. Die in der Leber nachgewiesenen Platinmengen unterschieden sich nicht (s. Tab. 4.59).

Tab. 4.59 Platingehalt in Lebern der Putenembryonen nach Applikation von Cisplatin oder NaCl-Lösung an d20 oder d23. d: Versuchstag; n: Anzahl der Lebern; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Dosis Cisplatin/Ei [mg]	Tag der Applikation	n	Platin- konzentration [mg/L]		Platin im Lebergewebe [µg/g]		Cisplatin im Lebergewebe [µg/g]	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
0 (NaCl)		4	0	0	0	0	0	0
1	d20	1	2,60	0	13,02	0	20,02	0
1	d23	6	2,60	0,25	12,99	1,23	19,98	1,90
2	d23	3	2,83	0,90	14,16	4,50	21,77	6,92

5. Diskussion

5.1 Eignung des Modells

Verschiedene Gründe sprachen dafür, für die durchgeführten Arbeiten Puteneier und nicht Hühnereier zu verwenden. Zum einen war die längere Entwicklungszeit des Putenembryos von Vorteil. Das Putenküken schlüpft an Tag 28 der Bebrütung. Um einen genügend großen Abstand zu diesem Zeitpunkt zu gewinnen, wurden die Versuche am 24. Tag der Bebrütung beendet. Das Hühnerküken schlüpft an Tag 21 der Bebrütung, der Versuch müsste an Tag 18 beendet werden. Somit konnten die Tumorzellknoten durch die Verwendung von Puteneiern drei Tage länger wachsen. Zum anderen sollte die Parallelität zu weiteren Experimenten, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, gewährleistet werden. In diesen Experimenten ging es darum, chemisch induzierte Neoplasien zu untersuchen, was unter den gewählten Bedingungen nur in Putenembryonen möglich ist. Auf diese Weise konnten die Experimente mit Transplantationstumoren parallel zu den Experimenten mit chemisch induzierten Neoplasien durchgeführt werden. Das Modell der Chorion-Allantois-Membran von befruchteten Puteneiern erwies sich daher als geeignet, die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit zu beantworten.

5.1.1 Erzeugung der Tumorzellknoten

Verschiedene humane Tumorzelllinien führten nach Aufbringen auf die Chorion-Allantois-Membran (CAM) von befruchteten Puteneiern zuverlässig zur Bildung von Tumorzellknoten. Die Tumorzellknoten wiesen innerhalb einer Zelllinie deutliche Ähnlichkeit sowohl im makroskopischen als auch im histologischen Bild auf. Alle Tumorzellknoten wuchsen unter der CAM, auf der Seite des Embryos. Dies stimmte mit in der Literatur beschriebenen früheren Beobachtungen überein [40]. Im Rahmen der histologischen Auswertung der Tumorzellknotengewebeschnitte bietet das CAM-Modell unter anderem einen Vorteil gegenüber dem Nacktmausmodell hinsichtlich der klaren Unterscheidung zwischen Tumorzellen und Wirtsgewebe bzw. Wirtszellen, die zur Strukturbildung des Knotens beitragen. Durch immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen humanes Zytokeratin 8 konnte im Rahmen des Projektes für HepG2- und für HCT-8-Zellen gezeigt werden, dass dieser Antikörper nur das aus den humanen Tumorzelllinien entstandene Tumorgewebe anfärbt, nicht aber vom Putenembryo stammende Gewebeanteile. Somit konnte bewiesen werden, dass die entstandenen Tumorzellknoten tatsächlich von den humanen Tumorzelllinien abstammen und nicht auf einer Gewebereaktion der aviären CAM auf den Inokulationsreiz durch das Aufbringen der Zellen beruhen. In der Literatur ließ sich für

A2780 kein Hinweis darauf finden, dass diese Zellen Zytokeratin 8 exprimieren. In Übereinstimmung mit diesem Befund ließen sich auch die erhaltenen A2780-Tumorzellknoten nicht mit dem Antikörper gegen Zytokeratin 8 anfärben. Außerdem wurde durch die immunhistochemische Färbung in HepG2-Tumorzellknoten deutlich, dass die vorhandenen Blutgefäße aviären Ursprungs waren. In Experimenten anderer Arbeitsgruppen wurde ebenfalls festgestellt, dass Tumorzellinokula und Tumorexografts durch einwachsende CAM-Gefäße versorgt wurden [12]. Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass Tumorzellknoten, die von derselben Zelllinie abstammen, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch betrachtet eine starke Ähnlichkeit untereinander aufweisen. Tumorzellknoten, die von verschiedenen Zelllinien abstammen, unterscheiden sich im makroskopischen Erscheinungsbild und in der Histologie.

5.1.2 Bestimmung der Genexpressionsmuster

Das Expressionsmuster der Tumorzellen, die als einschichtiger Zellrasen in der Zellkulturschale kultiviert worden waren, und das Expressionsmuster der Tumorzellknoten, die aus Tumorzellen auf der CAM in voneinander unabhängigen Versuchen erzeugt worden waren, wurden mittels Microarray miteinander verglichen. Genetisches Material des aviären Empfängers verfälschte im gewählten Microarray das Versuchsergebnis nicht, da eine Kreuzhybridisierung unter den vorliegenden Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte. Um die Suche nicht zu früh zu stark einzugrenzen, wurden zunächst die veränderten Gensequenzen und nicht die Gene ermittelt. Aus dieser Suche ging eine Vielzahl verschiedener Gensequenzen hervor, die in den jeweiligen Zelllinien im Tumorzellknoten gegenüber dem einschichtigen Zellrasen verändert war (TA-VES, s. 3.8.5). 290 dieser Gensequenzen waren gemeinsam in allen drei Zelllinien um mindestens Faktor 3 hochreguliert. Nach einer biostatistischen Auswertung, durch die veränderte Gene ermittelt wurden, zeigte sich, dass 14 der Gene signifikant in allen drei Tumorzelllinien beim Übergang zum Wachstum als Tumorzellknoten in die gleiche Richtung verändert waren. Dazu zählten verschiedene Metallothioneine und Hämoglobin alpha 2. Interessant erscheinende Gene wurden mittels PCR untersucht und die Ergebnisse der Microarrays konnten größtenteils bestätigt werden.

5.1.3 Dosisfindung von Sorafenib und Cisplatin

5.1.3.1 Dosisfindung von Sorafenib

Um eine geeignete Dosierung für Sorafenib zu ermitteln, wurde die beim Menschen klinisch verwendete Dosis als Ausgangspunkt gewählt. Diese wurde an das Eigewicht adaptiert. In verschiedenen Dosisfindungsstudien wurden Dosierungen verwendet, die in der Nähe der adaptierten Dosis lagen. Dosierungen unter 1,1 mg/Ei wurden von den Putenembryonen gut vertragen, Dosierungen über 2,2 mg waren letal. Der Bereich dazwischen zeigte eine klare Dosisabhängigkeit. Jedoch zeigte sich die Verlagerung der CAM als weitere Einflussgröße auf die Überlebensrate. Im Fall einer CAM-Verlagerung war bereits eine Dosis von 1 mg/Ei letal. Die wenigen Tumoren, die entstanden, waren außerdem zu klein, um eine ausreichende Menge an RNA gewinnen zu können. Somit wurde die Dosis erneut angepasst und auf 0,5 mg Sorafenib pro Ei reduziert. Bei dieser Dosierung zeigten sich zwar noch Auswirkungen auf das Überleben, jedoch konnte eine ausreichende Anzahl an Tumorzellknoten in einer Größe generiert werden, die es erlaubte, RNA für nachfolgende Microarrays zu gewinnen.

5.1.3.2 Dosisfindung von Cisplatin

Die Dosierung von Cisplatin erfolgt in der klinischen Praxis gemäß der Körperoberfläche. Um eine Orientierung für die Dosisfindung in Putenembryonen abzuleiten wurde aus der Dosis pro Körperoberfläche die Dosis pro Kilogramm Körpergewicht bestimmt. Diese wurde unter der Annahme des Eigewichts von 95 g auf das Versuchsmodell übertragen. Die Applikation von Cisplatin erfolgt im Falle von humanen Patienten via intravenöser Infusion in die Blutbahn [20]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Applikation von Cisplatin in die Peritonealhöhle. Die intraperitoneale Applikation verspricht höhere lokale Konzentrationen an Cisplatin ohne einen gleichzeitigen proportionalen Anstieg der systemischen Toxizität [41, 42]. Bei einer Monotherapie mit Cisplatin und intraperitonealer Applikation wird häufig eine Dosierung von 100 mg/m² verwendet. Die Exposition der Peritonealhöhle mit Cisplatin ist um das 10- bis 20fache höher als bei intravenöser Applikation [43, 44]. Um ähnliche Bedingungen zu simulieren, wurde die Cisplatinlösung im Fall der Putenembryonen über die CAM appliziert. Cisplatin lag auf der CAM in NaCl-Lösung (0,9 %) ungeladen vor. Es zeigte sich eine klare Dosisabhängigkeit im überprüften Bereich von 2,0 mg/Ei bis 0,066 mg/Ei, in dem die Überlebensraten von 0 % auf 85 % anstiegen. Für die weiteren Versuche wurden eine Dosis von 1 mg/Ei und eine Inkubationsdauer von 24 h gewählt.

Cisplatin gelangte nach Applikation auf die freigelegte CAM in den Putenembryo und dessen Stoffwechsel. Um den Nachweis der systemischen Exposition zu erbringen, wurde der Platingehalt in der Leber bestimmt. 24 h nach Applikation von Cisplatin auf die CAM wurde der Versuch beendet und die Leber entnommen. Mittels flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie konnte Platin in der Leber nachgewiesen werden. Es wurde eine Konzentration von ca. 2,8 mg Cisplatin pro Liter Lebergewebe bestimmt. Da Platin in der Leber der Embryonen nachgewiesen werden konnte, gelangte es folglich ebenfalls über das Gefäßnetzwerk des Embryos bis in die Tumorzellknoten. In diesen zeigten sich zudem Veränderungen des Genexpressionsmusters. Die nachgewiesenen Cisplatinkonzentrationen in der Leber waren vergleichbar mit den humanen und den in Ratten und Nacktmäusen nachgewiesenen Konzentrationen [45–47]. Cisplatin zeigte eine klare Dosisabhängigkeit auf das Überleben der Embryonen. Es konnten adäquate Dosierungen für weitere Versuche ermittelt werden. Auf Grund der dosisabhängigen Toxizität und der Platinmessung in der embryonalen Leber kann davon ausgegangen werden, dass Cisplatin über die CAM aufgenommen und systemisch verfügbar wird.

5.2 Vergleiche der Genexpressionsmuster in A3T

Das Genexpressionsmuster in den Tumorzellknoten unterschied sich deutlich von dem der als Zellrasen kultivierten Zellen. Die interindividuellen Variabilitäten zwischen den Tumorknoten aus Zellen derselben Linie waren gering. Im Vergleich mit der Genexpression im Zellrasen zeigten aus derselben Zelllinie gewachsene, individuelle Tumorzellknoten jeweils nahezu identische Expressionsmusteränderungen (vgl. Abb. 4.9). Die zentrale Fragestellung war, ob Gemeinsamkeiten in der Veränderung der Genexpressionsmuster zwischen verschiedenen Tumorzelllinien existieren und ob bestimmte Expressionsveränderungen für das knotige Wachstum der Tumorzellen kennzeichnend sind, unabhängig von der jeweils verwendeten Zelllinie. Diese Veränderungen wurden für die verschiedenen Tumorzelllinien ermittelt. Diese gemeinsamen Veränderungen in **allen 3** untersuchten **Tumorzelllinien** werden im Folgenden als **A3T** bezeichnet (s. 3.8.5). Bei der Bestimmung der Schnittmengen der zahlreichen **verändert exprimierten Sequenzen (VES)** aus allen drei Tumorzelllinien zeigte sich, dass gemeinsame Veränderungen aufgetreten waren. Die Zahl der in allen drei untersuchten Zelllinien in den Knoten im Vergleich zum Zellrasen gleichermaßen herauf- bzw. herunterregulierten Sequenzen übersteigt um ein Vielfaches, was als zufällige Übereinstimmung zu erwarten gewesen wäre. Dies zeigt, dass mit dem Übergang vom Zellrasen zum Knoten regelhaft in verschiedenen Tumorzelllinien dieselben Veränderungen auftreten. Diese sind möglicherweise von grundlegender

Bedeutung für das Verständnis des Wachstums von Krebszellen als Tumorknoten. Wenn den A3T mechanistische Bedeutung für das knotige Wachstum zukommt, sind zwei Möglichkeiten zu unterscheiden. Einerseits könnten die A3T Ursache des knotigen Wachstums sein. Andererseits könnten die A3T eine Folge des knotigen Wachstums sein, d.h. dieses tumortypische Verhalten auslösen oder steuern. Wenn die Veränderung rein adaptiv ist, wird sie das Tumorstadium zwar nicht auslösen, kann jedoch trotzdem für das Bestehen des Tumors von essenzieller Bedeutung sein. Der Knoten kann nur dann existieren, wenn die adaptiven Mechanismen funktionieren. In beiden Fällen können die A3T therapeutisch als Zielstrukturen von Interesse sein. Dementsprechend könnte der nächste Schritt sein, zu untersuchen, welche Folge die Antagonisierung dieser Expressionsveränderungen für das Wachstum der Tumorzellknoten hat.

Zur weiteren Bestätigung der mittels Microarray ermittelten Veränderungen wurde eine Auswahl von Genen mittels PCR untersucht. Durch die PCR wurde die Überexpression zweier Metallothioneine (MTE1, MT2A) in allen drei Zelllinien bestätigt. Dies galt ebenso für Hämoglobin alpha 1 (HBA1) bzw. 2 und Hämoglobin E1 (HBE1). Es wurde ein Vergleich mit allen durchgeführten Versuchsergebnissen gezogen, um zu ermitteln, welche anderen Einflussgrößen neben dem knotigen Wachstum die Expression dieser Sequenzen beeinflussen (s. Tab. 5.1).

Tab. 5.1 Übersicht über mittels PCR bestätigte A3T sowie die Genexpressionsveränderungen in weiterführenden Versuchen; ↑: mindestens zweifach hochreguliert; ↓: mindestens zweifach herunterreguliert; /: keine Veränderung.

Name	Veränderung in A3T	Hypoxie	Sorafenib	Cisplatin	Rückführung	Funktion
COL7A1	↑	↑	/	/	↑	Homo sapiens collagen, type VII, alpha 1
MT1E	↑	↑	/	↑	/	Homo sapiens metallothionein 1E
MT2A	↑	↑	/	↑	/	Homo sapiens metallothionein 2A
HBA1/HBA2	↑	↑	↑	/	/	Homo sapiens hemoglobin, alpha 1
HBE1	↑	↑	/	/	↓	Homo sapiens hemoglobin, epsilon 1
MAFB	↑	↑	/	1↑ 1↓*	/	Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
ETS1	↑	/	/	/	/	Homo sapiens v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
TSPAN10	↑	/	/	/	/	Homo sapiens tetraspanin 10
PIGL	↓	/	/	/	/	Homo sapiens phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L

*Eine Gensequenz hoch- und eine Gensequenz herunterreguliert

Die Metallothioneine MT1E und MT2A waren in allen drei Tumorzelllinien beim Übergang zum knotigen Wachstum erhöht. Beide waren ebenfalls sowohl unter Hypoxie als auch nach Cisplatinbehandlung erhöht. Die Expressionsveränderungen verschiedener Metallothionine in Tumoren wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (s. 5.2.3). COL7A1, welches für Kollagen Typ VII kodiert, ist sowohl unter Hypoxie als auch nach der Rückführung der als Tumor gewachsenen Zellen zurück in die Zellkultur überexprimiert. Untersuchungen zeigten, dass COL7A1 im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Vergleich zu normalem Gewebe überexprimiert ist. Die Expression korrelierte dabei sowohl mit der Tiefe der Tumordinvasion ins Gewebe als auch der Invasion in das lymphatische System. Die 5-Jahres-Überlebensrate in Patienten mit einer niedrigen Expression an COL7A1 war besser im Vergleich zu Patienten mit einer höheren Expression [48]. HBA1/A2 sowie HBE1 sind unter Hypoxie hochreguliert, HBA1/A2 zusätzlich noch unter der Behandlung mit Sorafenib. HBE1 ist nach der Rückführung in die Zellkultur im Vergleich zu den ursprünglich *in vitro* kultivierten HepG2-Zellen herunterreguliert. In

Untersuchungen von Proben des Brustdrüsengewebes von Hunden konnte gezeigt werden, dass Hämoglobin auch dort exprimiert wird. Im Vergleich zur Expression in normalem Brustdrüsengewebe des Hundes war Hämoglobin bei Proben von malignen Tumoren des Brustdrüsengewebes herunterreguliert [49]. In humanem Mammakarzinom konnte hingegen im Vergleich zum normalen Gewebe eine deutliche Überexprimierung von Hämoglobin gezeigt werden. Dies könnte unter anderem zur Sauerstoffversorgung von Tumoren beitragen [50]. MAFB ist unter Hypoxie hochreguliert, nach Cisplatinbehandlung war eine Sequenz hoch- und eine herunterreguliert (s. Tab. 5.1).

Im Fall von ETS1, TSPAN10 sowie PIGL zeigte sich lediglich die Veränderung in die gleiche Richtung in allen drei Zelllinien. Genexpressionsveränderungen in den anderen durchgeführten Versuchen wurden nicht gefunden. TSPAN10 gehört zur Familie der Tetraspanine, von denen insgesamt 33 verschiedene bekannt sind. Dabei handelt es sich um transmembrane Adhäsionsmoleküle, die mit Bestandteilen sowohl von Membranen als auch des Zytoplasmas, wie Integrinen, Claudin-1 und EGFR, interagieren. Tetraspanine sind in verschiedenen Krebsarten dereguliert. Sie steuern Angiogenese, Invasion und Metastasierung, und fördern oder inhibieren die Tumorprogression je nach Tumor und beteiligtem Tetraspanin. Sie werden als Zielstruktur für zielgerichtete Krebstherapien in Betracht gezogen. Es zeigte sich, dass TSPAN10 in Metastasen des Leiomyosarkoms überexprimiert war [51]. ETS1 gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren (*E26 transformation-specific*) [52]. Alle Ets-Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA Sequenzen, welche in die Kontrolle der zellulären Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Hämatopoese, Apoptose, Metastasierung, Gewebeumgestaltung und Angiogenese involviert sind. Zusätzlich zu ihrer Bedeutung in der normalen zellulären Kontrolle werden die Produkte der ETS-Transkriptionsfaktoren mit einigen Erkrankungen wie verschiedenen Leukämien und soliden Tumoren in Verbindung gebracht [53]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Ets1 in Brustkrebs überexprimiert ist [54] und mit einer schlechteren Prognose korreliert [52]. Hohe Spiegel an Ets1 in Lungen- und Plattenepithelkarzinomen werden mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen in Verbindung gebracht. Ebenso scheint Ets1 ein stärkeres invasives Verhalten zu begünstigen. ETS1 wird bereits als mögliche Zielstruktur untersucht [55].

Die weiteren Versuche wie die Behandlung mit Cisplatin und Sorafenib, Hypoxie- und Rückführungsversuche wurden deshalb durchgeführt, weil Veränderungen zwischen den Genexpressionsmustern in Tumorzellknoten *in vitro* und *in ovo* ermittelt werden konnten. Um die mit dem knotigen Wachstum assoziierten Expressionsmusteränderungen besser einschätzen zu können, wurde untersucht, ob diese auch unter anderen Versuchsbedingungen auftreten. Eine plausible Hypothese war, dass viele oder alle der A3T- Expressionsveränderungen eine Folge der im Tumorknoten stärkeren Hypoxie sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden durch Hypoxie bedingte Expressionsveränderungen in Zellrasen mit den in Tumorknoten beobachteten Expressionsveränderungen (A3T) verglichen. Zur klinischen Behandlung von Leberzellkrebs wird Sorafenib verwendet. Zur Behandlung von Ovarialkarzinomen wird unter anderem Cisplatin, sowohl intravenös als auch als intraperitoneal, verwendet. Es wurde untersucht, inwieweit die als A3T identifizierten Gene auch durch die Exposition gegen Sorafenib bzw. Cisplatin in ihrer Expression verändert werden. Zusätzlich wurde untersucht, welche der Veränderungen lediglich während des knotigen Wachstums auftreten und welche der Veränderungen erhalten bleiben, wenn die Zellen aus den Tumorzellknoten wieder als einschichtiger Zellrasen kultiviert werden.

5.2.1 A3T und Hypoxie

Die Sauerstoffversorgung in Tumoren ist sehr heterogen, der Begriff „Hypoxie“ bezeichnet eine Sauerstoffunterversorgung. Um die Bedeutung des Expressionsmusterwandels im Zuge des Übergangs zum knotigen Tumorstadium auf der CAM besser zu verstehen, wurde untersucht, ob dieser Wandel lediglich mit einer Reaktion auf erhöhten Stress im Rahmen des knotigen Wachstums im Gegensatz zum Wachstum als einschichtiger Zellrasen zusammenhängt. Eine verminderte Sauerstoffversorgung ist in Tumoren oder - abhängig von der Ausbildung von Blutgefäßen - in Teilen der Tumoren ein häufiges Phänomen. Dies kann unter anderem einen wesentlichen Einfluss auf die Resistenzentwicklung sowohl gegenüber Strahlen- als auch gegenüber Chemotherapie haben [56]. Um zu prüfen, inwieweit die mögliche Hypoxie in den Tumorknoten auf der CAM ursächlich für die beobachteten Expressionsveränderungen sein könnte, wurden die als einschichtiger Zellrasen wachsenden HepG2-Zellen unter hypoxischen (5 und 1 % O₂) und normoxischen (20 % O₂) Bedingungen kultiviert. Diese Versuche wurden sowohl mit HepG2-Zellen, die aus dem BfArM stammten, als auch mit HepG2-Zellen der Universitäts-Frauenklinik Würzburg durchgeführt, um einen laborübergreifenden Vergleich zu haben. Anschließend wurde die Genexpression der Zellen mittels Microarray bestimmt. Die Expression einer Vielzahl von Sequenzen war unter Hypoxie verändert. Unter 1 % O₂

waren 1866 Gensequenzen mindestens um Faktor 2 nach oben und 2013 Gensequenzen mindestens um Faktor 2 nach unten reguliert. Unter 5 % O₂ waren 459 Gensequenzen mindestens um Faktor 2 nach oben und 163 Gensequenzen mindestens um Faktor 2 nach unten reguliert. Die Gensequenzen, die unter Hypoxie um den Faktor 2 hochreguliert waren, wurden mit der Schnittmenge der Gensequenzen, die in A2780-, HCT-8- und HepG2-Zellen beim Übergang zum Wachstum als Tumorzellknoten mindestens um den Faktor 3 hochreguliert waren (n=290), verglichen. Es stellte sich heraus, dass nur eine der Gensequenzen in allen vier Hypoxie-Settings und 12 Gensequenzen in drei Hypoxie-Settings hochreguliert waren (vgl. 4.3.4). Folglich ist davon auszugehen, dass die Überexpression der Gensequenzen, die in allen drei Tumorzelllinien beim Übergang zum Tumor aufgetreten ist, nicht im Wesentlichen auf einen Hypoxieeffekt zurückzuführen ist.

5.2.2 A3T und Sorafenib

Nach Abgleich der Veränderungen in mit Sorafenib behandelten HepG2-Tumorzellknoten mit den A3T zeigten sich einige Gemeinsamkeiten. Sowohl unter Sorafenibbehandlung als auch beim Übergang zum knotigen Wachstum waren 15 Gensequenzen hochreguliert. Dabei könnte es sich um einen indirekten Effekt handeln. Die Zellen haben im Tumorzellknoten keine optimalen Bedingungen bezüglich der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wie im Zellrasen. Unter Sorafenibbehandlung werden die im Knoten vorliegenden Bedingungen weiter verschlechtert, da die Gefäßversorgung durch Sorafenib beeinträchtigt wird. Unter diesen 15 sowohl unter Sorafenibbehandlung von HepG2-Tumorzellknoten als auch bei allen drei Zelllinien beim Übergang zum knotigen Wachstum hochregulierten Gensequenzen befanden sich unter anderem Gensequenzen von HBA2 und HBQ1. Sowohl herunterreguliert unter Sorafenibbehandlung als auch beim Übergang zum knotigen Wachstum war hingegen keine einzige Gensequenz. Antagonistisch reguliert waren jeweils zwei Gensequenzen. Diese sind von besonderem Interesse, da sie als Zielstrukturen für die Therapie von Bedeutung sein könnten. Dabei handelte es sich unter anderem um CYP1A (Cytochrom P450 1A) und GSTA2 (Glutathion-S-Transferase A2). CYP1A1 und GSTA2 codieren Enzyme, die in typische Funktionen des Fremdstoffmetabolismus der Leber involviert sind [57]. Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sorafenib werden rasch durch solche Enzyme, vor allem von Cytochrom P-450 Isoenzymen, in inaktive Verbindungen umgewandelt. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass unter anderem CYP1A1 Sorafenib in der Tumorzelle degradiert und dessen Wirkung auf diese Weise begrenzt [58]. CYP1A1 und GSTA2 waren beim Übergang zum knotigen Wachstum in

allen drei Tumorzelllinien herunterreguliert und in HepG2-Tumorzellknoten durch die Behandlung mit Sorafenib heraufreguliert. Aus der veränderten Expression lässt sich schließen, dass die Funktionen des Fremdstoffmetabolismus im Zellrasen noch vorhanden sind, im Knoten jedoch abgeschwächt sind. Für die erfolgreiche Behandlung der Tumorzellknoten mit Sorafenib sind durch die geringe Expression von CYP1A1 und GSTA2 zunächst gute Voraussetzungen geschaffen. Durch die Behandlung mit Sorafenib steigt die Expression wieder. Möglicherweise wird entweder eine Entdifferenzierung wieder aufgehoben oder es könnte sich um eine Enzyminduktion handeln. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass es möglicherweise zu einer Art Selbstbegrenzung der Sorafenibwirkung kommt. Im Gegensatz zu CYP1A1 und GSTA2 handelt es sich bei FRMD4A um eine antagonistisch regulierte Gensequenz. Dies bedeutet, dass FRMD4A beim Übergang zum knotigen Wachstum heraufreguliert und unter Sorafenibbehandlung herunterreguliert war. FRMD4A ist ein epithelialer Stammzellmarker, der mit der Orientierung der Zellen (Polarität) zusammenhängt [59, 60]. Da die dreidimensionalen Tumorzellknoten eine klar erkennbare und charakteristische histologische Struktur aufweisen, ist eine stärkere Rolle von FRMD4A beim knotigen Wachstum im Vergleich zum Wachstum als Zellrasen plausibel. Zudem wird FRMD4A im Zusammenhang mit dem Hippo-Signalweg genannt, welcher in die Kontrolle der Organgröße durch die Regulierung von Zellproliferation und Apoptose involviert ist [61]. FRMD4A ist unter anderem in Zellen des Plattenepithelkarzinoms hochreguliert. Die Überexpression fördert das Wachstum des Tumors und wird mit Metastasierung und einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund ist FRMD4A bereits als Zielstruktur für Antikörper im Gespräch [60]. Die verstärkte Expression von FRMD4A beim Übergang zum knotigen Wachstum und deren Abschwächung, wenn das Wachstum der Tumorzellen im Knoten durch die Behandlung mit Sorafenib beeinträchtigt werden, weist auf eine mögliche Rolle von FRMD4A für die therapeutische Wirkung von Sorafenib hin. Interessanterweise zeigt sich bei der Untersuchung von *In-vitro*-Kulturen der Tumorzellen kein Effekt von Sorafenib auf FRMD4A. Dies ergibt Sinn, da der Polarität der Zellen *in vitro* keine solch bedeutende Rolle zukommt wie beim Wachstum im Tumorzellknoten. Auch andere, durch Sorafenib induzierte Expressionsveränderungen waren nur im Knoten und nicht im Zellrasen nachweisbar. Nur jeweils eine der beiden Gensequenzen, die jeweils antagonistisch reguliert waren, zeigte sich auch *in vitro* durch Sorafenib in die gleiche Richtung reguliert. Die 15 Gensequenzen, die sowohl unter Sorafenibbehandlung der HepG2-Tumorzellknoten *in ovo* als auch in A3T heraufreguliert waren, waren durch Sorafenib *in vitro* nicht heraufreguliert.

Unter Einwirkung von Sorafenib treten in HepG2-Tumorzellknoten vermehrt nekrotische Bereiche auf. Mit diesem Behandlungseffekt assoziiert finden sich verschiedene Expressionsveränderungen. Diese könnten mechanistisch mit der therapeutischen antineoplastischen Wirkung von Sorafenib verknüpft sein. Da Sorafenib eine beträchtliche Zahl unterschiedlicher Tyrosinkinase hemmt, könnte dies auch Hinweise auf neue, bisher noch nicht erkannte Wirkungsweisen liefern. Diese Veränderungen können jedoch auch nur Folgen des durch Sorafenib induzierten Zelluntergangs sein, d.h. kennzeichnend für Nekrosen und weniger für die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren bzw. Sorafenib. Die überwiegende Anzahl an Veränderungen in den Tumorzellknoten konnte nicht durch die *In-vitro*-Behandlung vorhergesagt werden. Dies konnte durch den Vergleich der Veränderungen in mit Sorafenib behandelten HepG2-Zellen *in vitro* mit den Veränderungen, die durch die Behandlung der HepG2-Tumorzellknoten *in ovo* hervorgerufen wurden, gezeigt werden. Es sind sowohl antagonistische als auch synergistische Veränderungen unter Sorafenib von therapeutischem Interesse. Falls die entsprechenden Veränderungen das Tumorwachstum fördern, wäre eine antagonistische Wirkung des antineoplastischen Arzneistoffes vorteilhaft. So könnten Proliferation, Vaskularisierung und Zellüberleben verhindert werden. Andererseits könnten in den A3T bereits Veränderungen enthalten sein, die für ein Absterben des Tumorknotens sorgen. Beispielsweise weisen HepG2-Tumorzellknoten auch ohne die Einwirkung von Sorafenib nekrotische Bereiche auf. Eine damit assoziierte synergistische Veränderung unter Sorafenib könnte somit die Zellnekrose weiter fördern. In diesem Fall würde auch ein synergistischer Effekt von Sorafenib zum gewünschten Ergebnis, dem Absterben des Tumorzellknotens, führen.

5.2.3 A3T und Cisplatin

Die Veränderungen in mit Cisplatin behandelten A2780-Tumorzellknoten wurden mit den A3T verglichen. Sowohl unter Cisplatinbehandlung als auch beim Übergang zum Tumorzellknoten in allen drei Tumorzelllinien waren 27 Gensequenzen um mindestens Faktor 2 nach oben reguliert, von denen einige im Folgenden näher betrachtet werden.

- Dabei handelte es sich unter anderem um verschiedene Metallothioneine (MT1B, MT1E, MT1H, MT1L, MT2A). Metallothioneine sind in verschiedene Prozesse wie beispielsweise Angiogenese, Progression des Zellzyklus und Zelldifferenzierung involviert und sind in verschiedenen humanen Krebsarten, unter anderem bei Ovarialkarzinom, überexprimiert. Eine erhöhte Expression korreliert in manchen Krebsarten (Ovarialkarzinom) mit einem schlechteren Gesamtüberleben und mit Resistenzentwicklung gegenüber antineoplastischen Arzneistoffen. Im Gegensatz

dazu scheinen Metallothioneine in manchen Krebsarten, wie z.B. dem Kolonkarzinom, keinen Einfluss auf das Überleben zu haben und in anderen Krebsarten, wie dem hepatozellulären Karzinom, sogar mit einem verbesserten Gesamtüberleben zu korrelieren [62]. Metallothioneine weisen antioxidative und zytoprotektive und damit antiapoptotische Eigenschaften auf. Durch Cisplatin wird die Expression der Metallothioneine in Tumorzellen hochreguliert. Die Metallothioneine der Klassen I und II interagieren mit Cisplatin *in vivo* und *in vitro* und können bis zu 10 mol Platin pro mol Metallothionein binden und somit inaktivieren. Diese Eigenschaft kommt unter anderem im Falle der Behandlung des Ovarialkarzinoms mit Cisplatin zum Tragen. Patientinnen, die bereits vor Beginn der Chemotherapie erhöhte Metallothioneinspiegel aufweisen, zeigen ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie sowie höhere Sterblichkeitsraten [62]. Von Metallothioneinen wird unter anderem berichtet, dass sie im Falle von Hypoxie hochreguliert sind [63]. Unsere Untersuchungen stimmen mit der Literatur überein, in der ebenfalls von Überexpression von Metallothioneinen im Ovarialkarzinom, unter hypoxischen Bedingungen sowie unter Chemotherapie berichtet wurde.

- CYP2F1 war sowohl in A3T als auch unter Behandlung mit Cisplatin hochreguliert. Der Behandlungseffekt war ebenso *in vitro* zu sehen. CYP2F1 ist bereits dafür bekannt, dass es in Ovarialtumoren im Vergleich zu normalem Ovarialgewebe häufig hochreguliert ist [64].
- Für Ovarialkarzinome wurde eine erhöhte Expression von IGF-2 beschrieben [65]. Eine erhöhte IGF-2 Expression wird mit einer erworbenen Cisplatinresistenz in Zelllinien des humanen Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und des Halses in Verbindung gebracht [66]. Hohe Expressionsspiegel an IGF2 im Gewebe wurden mit einem verkürzten Intervall bis zur Progression bzw. bis zum Wiederauftreten (progressionsfreies Überleben) in Zusammenhang gebracht. Auf eine Taxolbehandlung reagieren Zellen des Ovarialkarzinoms mit einer Hochregulierung des IGF2. Eine Verminderung der IGF2-Spiegel könnte eine effektive Strategie sein, um eine Resistenz gegenüber Taxol zu beseitigen. Untersuchungen wurden *in vitro* mit mehreren Zelllinien des Ovarialkarzinoms sowie im Xenograft-Modell durchgeführt [67]. Im hepatozellulären Karzinom sind die IGF2-Spiegel im Gewebe häufig erhöht und die Serum-IGF2-Spiegel korrelieren mit dem Vorhandensein extrahepatischer Metastasen. Ein Knockdown von IGF2 sowie eine Blockade mit anti-IGF2-Antikörpern störten die Fähigkeit der HCC Zellen zur Migration und Invasion in „Transwell Assays“. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass IGF2 wichtig für Migration und Invasion ist [68]. Im Kolonkarzinom ist die Expression von IGF2 ebenfalls häufig erhöht [69].

- LY6D (lymphocyte antigen 6 complex, locus D), auch bekannt als E48, kodiert für ein kleines Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Protein der Zelloberfläche. Das Protein wird auf der Oberfläche von Plattenepithelien exprimiert und ist in die Zell-Zell-Adhäsion involviert [70]. Es ist sowohl als therapeutische Zielstruktur als auch als diagnostischer Marker für Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (Head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) verwendet werden [71, 72]. Nach Behandlung von Induktionstumoren aus humanen Kolorektalkrebszellen (Colo205) in Nacktmäusen mit Irinotecan kam es zuverlässig zu einer Überexpression von LY6D. Dieser Effekt ließ sich ebenso *in vitro* nachweisen. Aus diesem Grund wird seitens der Autoren eine Antikörpertherapie in Kombination mit einer Irinotecanbehandlung vorgeschlagen, die sich in den durchgeführten Versuchen als erfolgreich erwies [72]. Ergebnisse aus Transfektionsversuchen zeigten, dass LY6D die Expression von Genen reguliert, die an der Interaktion von HNSCC-Zellen mit Endothelzellen beteiligt sind. Auf diese Weise könnten sie einen Einfluss auf Extravasation und Progression dieser Tumoren ausüben. Die Autoren schlagen LY6D als Zielstruktur für die Therapie des HNSCC vor [73]. In unseren Versuchen war LY6D sowohl beim Übergang zum knotigen Wachstum in allen drei Tumorzelllinien als auch unter Cisplatinbehandlung der A2780-Tumorzellknoten überexprimiert. Somit zeigen auch unsere Versuche, dass LY6D eine geeignete Zielstruktur für eine Therapie darstellen könnte.
- MafB gehört zur MAF-Familie der Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren [74] und ist auch unter dem Namen „*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*“ bekannt. Das Protein wird durch das Gen MAFB kodiert. MAFB ist im Multiplen Myelom häufig überexprimiert. Überexpression von MAFB induziert die Proliferation und verhindert die Apoptose von Zellen des Multiplen Myeloms [74].
- Es existieren Hinweise darauf, dass NLRP1 (auch bekannt als NALP1) ein Mediator für den Toxin-induzierten Zelltod ist [75]. NLRP1 wird hauptsächlich in T-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten exprimiert. Es wurde berichtet, dass die Expression von NLRP1 in Knochenmarksproben einiger Patienten mit akuter Leukämie stark erhöht war, in soliden Tumoren jedoch nicht [76]. Im Gegensatz dazu war die Expression von NLRP1 in Tumorzellknoten aller drei untersuchten Tumorzelllinien erhöht.
- Gene der Familie GADD45 werden mit Stresssignalweiterleitung in Verbindung gebracht, aus welcher entweder ein Arrest des Zellzyklus, DNA Reparatur und Zellüberleben oder Apoptose resultiert [77]. Protein- und mRNA-Spiegel von GADD45B waren in Kolonkarzinomgewebe im Vergleich zu angrenzendem gesundem Gewebe signifikant erhöht. Die Hochregulierung von GADD45B stand

ebenso in direktem Zusammenhang mit einem Wiederauftreten der Krankheit und dem Tod von Patienten mit Kolonkarzinom [78].

- BIRC3 ist ein Mitglied der IAP-Familie (IAP-inhibitors of apoptosis), die hauptsächlich den extrinsischen Apoptosesignalweg blockiert. BIRC3 (baculoviral IAP repeat containing 3) ist in TSCCs (Plattenepithelkarzinomen des Thymus - *thymic squamous cell carcinomas*) überexprimiert. Die BIRC3-positive TSCC-Zelllinie 1889c zeigte nach BIRC3-Knockdown spontane Apoptose [79]. Auch in Tumoren, die mit dem Lynch-Syndrom im Zusammenhang stehen, ist BIRC3 überexprimiert. Es wird berichtet, dass BIRC3 einen negativen regulatorischen Effekt (negative regulatory effect) auf den NF κ B-Signalweg hat, mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose assoziiert wird und ebenfalls mit Resistenzen gegenüber antineoplastischen Arzneistoffen in Verbindung gebracht wird [80]. Eine Cisplatinbehandlung von Ovarialkarzinomzellen hatte einen signifikanten Anstieg der mRNA- und Proteinspiegel von BIRC3 zur Folge. Zytotoxizitätsassays zeigten eine Sensitivierung der Ovarialkarzinomzellen gegenüber Cisplatin nach Zugabe eines BIRC3-Inhibitors. Aus diesem Grund schlagen die Autoren eine Kombination aus Cisplatin und unter anderem der Inhibierung von BIRC3 zur erfolgreichen Therapie des Ovarialkarzinoms vor [81].
- Die Expression von EPB41L4B, auch bekannt als EHM2 (erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B), ist in Prostatakarzinomzellen und Prostatakarzinomgeweben hochreguliert. Eine erhöhte Expression von EHM2 führt zu einer verminderten Adhäsion an Kollagen IV. Dies wird mit der Metastasierung von Krebs in Verbindung gebracht. Die Untersuchung von Gewebe zeigte, dass eine erhöhte Expression von EHM2 mit dem biochemischen Wiederauftreten nach der vollständigen Prostataentfernung assoziiert ist. Dies weist auf eine aggressive Form der Erkrankung hin [82]. Auch im Fall von Brustkrebs konnte eine erhöhte Expression von EHM2 mit einer schlechten Prognose und Metastasierung in Zusammenhang gebracht werden [83].

Synergistisch um mindestens Faktor 2 herunterreguliert in mit Cisplatin behandelten A2780-Tumorzellknoten und in A3T waren drei Gensequenzen. Eine davon ist USP2. USP2 war sowohl beim Übergang zum knotigen Wachstum als auch unter Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin um mehr als Faktor 2 herunterreguliert. USP2 kodiert für die Ubiquitin-spezifische Protease 2. Die Isoform, USP2a, ist in ca. 40 % der Prostataadenokarzinome überexprimiert. Ihr onkogenes Verhalten wird ihrer Interaktion mit und ihrer Prävention der proteosomalen Degradierung spezifischer Proteinzielstrukturen, die in verschiedene zellulären Signalwegen involviert sind,

zugeschrieben. Außerdem wird berichtet, dass die Protease zur Resistenzentwicklung gegenüber oxidativen Agentien wie zum Beispiel Cisplatin beiträgt, indem sie die Synthese von Glutathion stimuliert [84]. Eine Behandlung von NTERA-2-Zellen mit Cisplatin hatte eine Senkung der mRNA- und Proteinspiegel von USP2a zur Folge. Bei NTERA-2 handelt es sich um eine pluripotente humane embryonale Karzinomzelllinie. Es konnte gezeigt werden, dass in Folge des Knockdowns von USP2a NTERA-2-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin zeigten. Auf Grund dieser Beobachtungen wird von Allende-Vega et al. vorgeschlagen, für eine Krebstherapie die Suppression von USP2a mit einer Cisplatinbehandlung zu kombinieren [85]. In Versuchen mit Blasenkarzinomzellen in vitro konnte gezeigt werden, dass eine gestörte Expression von USP2a zu erhöhter Proliferation und Migrationsfähigkeit der Karzinomzellen führte [86].

Gene, die beim Übergang vom Wachstum als Zellrasen zum Wachstum als Tumorzellknoten hochreguliert sind, könnten mögliche Zielstrukturen für antineoplastische Arzneistoffe darstellen. Werden diese Gene gleichzeitig durch die Behandlung mit Cisplatin wieder herunterreguliert, könnte dies ein weiterer Anhaltspunkt für eine erfolgversprechende Therapie mit Zytostatika sein. Im Folgenden werden einige Gene, auf die diese Beobachtung zutrifft, näher im Kontext aktueller Literatur betrachtet. Die folgenden Gene sind in A3T beim Übergang zum knotigen Wachstum um mehr als Faktor 2 überexprimiert und nach Cisplatinbehandlung von A2780-Tumorzellknoten um mehr als Faktor 2 herunterreguliert.

- Keratin 14 (KRT14) wird regulär in der Basalschicht von mehrschichtigen Epithelien exprimiert. Die Expression sinkt, während die Zellen differenzieren und ihr Proliferationspotential verlieren. Im Fall eines Knockdowns von KRT14 kommt es zu einer verminderten Zellproliferationsrate. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von KRT14 zu einer geringeren Tumorigenität in Nacktmäusen führt. Alam et al. konnten zeigen, dass KRT14 als Modulator der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung in mehrschichtigen Epithelien fungiert [87].
- Cyclin B2 (CCNB2) ist in A3T beim Übergang zum knotigen Wachstum um mehr als Faktor 2 überexprimiert und nach Cisplatinbehandlung von A2780-Tumorzellknoten um mehr als Faktor 2 herunterreguliert. CCNB2 kodiert für Cyclin B2, dessen Überexprimierung in einer Vielzahl von Krebsarten mit der Tumoraggressivität und einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht wird. Das Protein wird in vielen Zelllinien, Geweben und Organen mit einem hohen mitotischen Index exprimiert [88]. Cyclin B2 ist dabei in der Region des Golgiapparates lokalisiert. Der Proteinspiegel an Cyclin B2 findet seinen Peak während der Mitose [89]. Cyclin B2

begünstigt die Tumorentwicklung in Mäusen, wenn das entsprechende Gen überexprimiert ist. Untersuchungen zeigten, dass Cyclin B2 die Chromosomentrennung während der Mitose stört und somit zur Krebsentstehung beiträgt [88].

- Biglycan (BGN) ist in A3T beim Übergang zum knotigen Wachstum überexprimiert und wird durch Cisplatinbehandlung herunterreguliert. Biglycan wurde in A2780-Zellen *in vitro* durch Cisplatin ebenfalls herunterreguliert. Biglycan wird an der Zelloberfläche und in manchen Zelllinien in der extrazellulären Matrix exprimiert [90]. In Tumorendothelzellen wurde eine über 100fach höhere Expression von Biglycan im Vergleich zu normalen Epithelzellen gefunden [91]. Beispiele für Krebsarten, in denen eine erhöhte Expression von Biglycan gefunden wurde, sind das Endometriumkarzinom, Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom und das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre. Eine erhöhte Expression von Biglycan in Tumorgewebe lässt darauf schließen, dass es eine Rolle in der Pathogenese und Progression von Krebs spielt. Eine erhöhte Expression an Biglycan korreliert mit einer schlechteren Prognose. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass BGN die Migration und Invasion von Magenkarzinomzellen *in vitro* und in Transplantationsmodellen begünstigt [90]. Ein Knockdown von Biglycan inhibierte die Migration von Tumorepithelzellen [91]. Durch die signifikant höhere Expression von Biglycan in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe könnte Biglycan eine geeignete Zielstruktur für die zielgerichtete Krebstherapie darstellen. In unseren Versuchen war Biglycan in allen drei Tumorzelllinien beim Übergang zum knotigen Wachstum um mehr als Faktor 2 hochreguliert. Nach Cisplatinbehandlung war Biglycan in A2780-Tumorzellknoten um mehr als Faktor 2 herunterreguliert.

Von den 27 Gensequenzen, die unter sowohl unter Cisplatinbehandlung als auch beim Übergang zum knotigen Wachstum hochreguliert waren, waren acht Gensequenzen ebenfalls bei der Behandlung von A2780-Zellen mit Cisplatin *in vitro* hochreguliert. Keine der drei Gensequenzen, die sowohl in A3T als auch in mit Cisplatin behandelten A2780-Tumorzellknoten herunterreguliert waren, war ebenfalls in den *in vitro* behandelten A2780-Zellen herunterreguliert.

Eventuelle Behandlungseffekte der 24stündigen Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin waren weder makroskopisch noch histologisch erkennbar. Im Genexpressionsmuster zeigten sich jedoch einige Veränderungen. Im Gegensatz zur Sorafenibbehandlung traten hier deutlich mehr Veränderungen auf. Wahrscheinlich spiegelt dies die typische zytotoxische Wirkungsweise von Cisplatin auf die DNA und andere Makromoleküle im Vergleich zu den zielgerichteten Therapien

(Inhibition von Proteinkinasen) wieder. Genexpressionsveränderungen in den A2780-Tumorzellknoten *in ovo* konnten teilweise durch die Behandlung der A2780-Zellen *in vitro* vorhergesagt werden.

5.2.4 A3T und Rückführung

Zum weitergehenden Verständnis des Expressionsmusterwandels wurden die als Tumorknoten gewachsenen Zellen nach Entfernen des Tumorknotens von der CAM vereinzelt und erneut in die *In-vitro*-Zellkultur, in der sie als einschichtiger Zellrasen wuchsen, überführt. Sollte sich das Expressionsmuster nicht von dem der Tumorknoten unterscheiden, wäre davon auszugehen, dass es sich um permanente Expressionsmusteränderungen handelt (z.B. Mutationen). Die Rückführung von Tumorzelllinien vom Tumorknoten in die *In-vitro*-Zellkultur ist mit HepG2- und A2780-Zellen gelungen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den rückgeführten Zellen tatsächlich um die humanen Tumorzelllinien und nicht um Putenzellen handelte, wurden auf Objektträgern kultivierte Zellen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Zytokeratin 8 gefärbt. Hier konnte gezeigt werden, dass es sich bei den rückgeführten HepG2-Zellen tatsächlich um die humanen Zellen handelt. Sehr vereinzelt, und mit weiterer Passagierung deutlich abnehmend, waren nicht angefärbte Putenzellen vorhanden. Für A2780 konnte dieser Beweis nicht erbracht werden, da in A2780-Zellen kein Zytokeratin 8 nachgewiesen werden konnte (s. oben). Da sich die Abreicherung der Wirtszellen in A2780-Zellkulturen nicht darstellen ließ, wurden weitere Rückführungsversuche nur mit HepG2-Zellen durchgeführt.

In HepG2-Zellen sind beim Übergang zum Knoten 3289 Sequenzen 3fach im Vergleich zum Zellrasen hochreguliert. Bei der Rückführung ist die Mehrzahl dieser Veränderungen in den Ursprungszustand zurückversetzt worden. Diese Veränderungen scheinen reversibel und damit adaptiver Natur zu sein. Allerdings bleiben einige der Veränderungen erhalten. Die entsprechenden 42 Sequenzen sind im Vergleich zum Zellrasen weiterhin 3fach hochreguliert. Diese Veränderungen scheinen irreversibel zu sein. Diese Beobachtungen sind nicht zufällig. Die Ergebnisse konnten in zwei Microarrays mit voneinander unabhängigen Rückführungen jeweils vier verschiedener Tumorknoten reproduziert werden. Als rein statistischer Zufallsbefund wären für eine derartige Übereinstimmung nur 0,5 VES statt der gefundenen 42 VES zu erwarten. Es waren drei Gensequenzen vorhanden, die sowohl in A3T als auch nach der Rückführung noch 2fach hochreguliert waren (C1QTNF1, COL7A1, GOLGA8A). Eine Gensequenz war in A3T 2fach heraufreguliert und nach der Rückführung 2fach herunterreguliert (HBE1). Offensichtlich erwerben die HepG2-Zellen während des knotigen Wachstums auf der CAM Veränderungen, von denen

einige auch dann erhalten bleiben, wenn die Zellen wieder als Zellrasen kultiviert werden. Ob diese Veränderungen im Expressionsmuster zellbiologisch relevant sind, ist unbekannt. Es zeigt jedoch, dass auch vermeintlich sehr stabile Tumorzelllinien wie HepG2 im Laufe der Kultivierung und Passagierung zusätzliche Veränderungen erwerben (s. auch 4.3.3).

5.3 Genexpressionsmusteränderungen innerhalb der einzelnen Zelllinien

Bisher wurden Expressionsveränderungen diskutiert, die in allen drei untersuchten Tumorzelllinien mit dem Übergang zum knotigen Wachstum assoziiert sind und denen daher möglicherweise eine grundlegende Bedeutung bei der Pathogenese solider Tumoren bzw. Karzinome zukommt. Daneben werden jedoch auch Tumortyp- oder Zelllinien-spezifische Veränderungen auftreten.

5.3.1 HepG2

5.3.1.1 Veränderungen beim Übergang zum Tumor

Beim Übergang vom Wachstum als einschichtiger Zellrasen zum Wachstum als Tumorzellknoten waren im Median ca. 3300 Gensequenzen um das 3fache herauf- und ca. 1400 Gensequenzen um das 3fache herunterreguliert. Nach dem Vergleich der aufgetretenen Genexpressionsveränderungen in den vier einzeln untersuchten HepG2-Tumorzellknoten zeigte sich, dass diese im 3fach hochregulierten Bereich zu 75-84 % übereinstimmen. Im 3fach herunterregulierten Bereich stimmen die Veränderungen zu 66-73 % überein. Die zufällige statistische Übereinstimmung liegt weit darunter.

5.3.1.2 HepG2 und Sorafenib

Die Überlebensraten der Embryonen vom Tag der Sorafenibinjektion bis zum Tag der CAM-Freilegung lagen nach Sorafenibbehandlung mit einer Dosis von 0,5 mg je Ei bei 63-69 % in der Behandlungsgruppe und bei 67-71 % in der Kontrollgruppe. Es konnte eine ausreichende Anzahl an Tumorzellknoten erzeugt werden. Die behandelten Tumorzellknoten unterschieden sich von den Kontrolltumoren sowohl im makroskopischen als auch im histologischen Bild. Die mit Sorafenib behandelten Tumorzellknoten wiesen im Vergleich mit Kontrolltumoren größere nekrotische Bereiche auf. Dennoch ist es erfolgreich gelungen, aus den vitalen Bereichen der Tumoren ausreichend RNA für die Untersuchung der Genexpressionsmuster mittels Microarray zu gewinnen. Mit einer Sorafenibdosis von 0,5 mg/Ei zeigten sich Veränderungen in den Genexpressionsmustern der Tumoren. Es waren unter Behandlung im Vergleich zur Kontrolle mehr Gensequenzen herauf- als

herunterreguliert. Die Übereinstimmung der Veränderungen in den einzelnen mit Sorafenib behandelten Tumoren im Vergleich zum jeweiligen Kontrolltumor reichte von 15-57 % im 3fach hochregulierten Bereich und von 4-13 % im 3fach herunterregulierten Bereich. Die erwartete zufällige Übereinstimmung für den 3fach hochregulierten Bereich zwischen Tumorpaar 2 und Tumorpaar 4 wären 14 Gensequenzen, tatsächlich stimmten jedoch 177 Gensequenzen überein. Es handelt sich bei den 177 Gensequenzen folglich nicht um eine rein zufällige Übereinstimmung.

Ebenso wurde die Übereinstimmung der Veränderungen unter Sorafenibbehandlung auf die Tumorzellknoten mit den Veränderungen unter Sorafenibbehandlung auf HepG2-Zellen *in vitro* betrachtet. Es zeigte sich, dass die Veränderungen, die in Tumorzellknoten *in ovo* auftraten, nicht alle auch *in vitro* zu sehen waren und umgekehrt. Beispielsweise waren bei der Behandlung von HepG2-Tumorzellknoten mit Sorafenib 135 Gensequenzen um den Faktor 2 nach unten reguliert, bei der Behandlung der HepG2-Zellen *in vitro* 737 Gensequenzen. Die Schnittmenge der Veränderungen waren lediglich 15 Gensequenzen. Diese 15 Gensequenzen hätten durch vorherige *in vitro*-Versuche ermittelt werden können, die restlichen 120 Gensequenzen nicht.

5.3.1.3 Veränderungen in HepG2-Zellen unter Hypoxie

Wie bereits unter 5.2.1 beschrieben, bezeichnet der Begriff „Hypoxie“ eine verminderte Sauerstoffversorgung. In Tumoren tritt diese besonders häufig auf Grund mangelnder Vaskularisierung auf. HepG2-Zellen *in vitro* wurden sowohl unter hypoxischen (5 % und 1 % O₂) als auch normoxischen (20 % O₂) Bedingungen kultiviert. Insgesamt waren unter 1 % O₂ deutlich mehr Gensequenzen als unter 5 % O₂ herunterreguliert. Der Vergleich von Genexpressionsveränderungen unter Hypoxie mit Veränderungen beim Übergang zum knotigen Wachstum zeigte, dass die Mehrheit der aufgetretenen Veränderungen nicht unter dem Einfluss eines Mangels an Sauerstoff aufgetreten ist. Beim Vergleich zwischen HepG2-Zelllinien, die in verschiedenen Arbeitsgruppen kultiviert werden, zeigten sich teilweise übereinstimmende, aber auch unterschiedliche Veränderungen in den Genexpressionsmustern als Reaktion auf Hypoxie. Dies ist in Übereinstimmung zu den Beobachtungen bei der Rückführung der als Tumorzellknoten gewachsenen Tumorzellen, die anschließend wieder *in vitro* kultiviert wurden und zeigt, dass vermeintlich stabile Tumorzelllinien wie HepG2 im Laufe der Kultivierung und Passagierung zusätzliche Veränderungen erwerben (vgl. 5.2.1).

5.3.1.4 Genes of interest

In der Zelllinie HepG2 waren unter anderem folgende Cluster an Gensequenzen beim Übergang zum knotigen Wachstum hochreguliert: Mucine, Cadherine und Matrixmetallopeptidasen.

- Mehrere Mucine waren in HepG2-Tumorzellknoten im Vergleich zu einschichtigen HepG2-Zellrasen deutlich überexprimiert. Mit Hilfe des Microarrays konnte nachgewiesen werden, dass 19 Gensequenzen hochreguliert und nur eine Gensequenz herunterreguliert war. Mucine sind stark glycosylierte Glycoproteine mit einem hohen Molekulargewicht. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt, in membrangebundene und sezernierte Mucine. Die sezernierten Mucine besitzen keine transmembrane Domäne und werden direkt in extrazelluläre Räume sezerniert. Bei den membrangebundenen Mucinen handelt es sich um Typ I Membranproteine mit einzelnen Transmembrandomänen und unterschiedlich langem zytoplasmatischem Schwanz am C-Terminus. Membrangebundene Mucine können von Zellen durch proteolytische Spaltung freigesetzt werden. Es existiert die Hypothese, dass der zytoplasmatische Schwanz der membrangebundenen Mucine unter bestimmten Bedingungen am Signalgeschehen, das zur Progression von Krebs beiträgt, beteiligt ist. Mucine sind normalerweise auf der apikalen Seite der Zelloberfläche von Epithelien lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren der Wachstumsfaktoren auf der basalen und lateralen Oberfläche polarer Epithelien zu finden. Ein Verlust der Polarität ermöglicht die Verbindung von Mucinen, Rezeptortyrosinkinasen und anderer Signalmoleküle. In Folge dessen wird ein Signal über den Verlust der Polarität und anderer morphogenetischer Verhältnisse an den Nukleus weitergeleitet. Diese Signale sollen Veränderungen in der Gentranskription auslösen, die die Restrukturierung der beschädigten Epithelien erleichtern und das Zellüberleben unter anstrengenden Bedingungen sicherstellen. Für Tumorzellen wird diskutiert, dass deren gestörte Polarität über diesen Mechanismus vorteilhaft ist, um Tumorzellinvasion, Metastasierung, Überleben und Proliferation zu fördern [92]. Die Steigerung der Expression der Mucine in den Tumorknoten in unserem experimentellen Modell scheint deren funktionelle Bedeutung zu unterstreichen. Klinische Daten dazu sind jedoch spärlich und uneinheitlich. In unseren Versuchen war Mucin 15 in HepG2-Tumorzellknoten *in ovo* im Vergleich zu HepG2-Zellen *in vitro* überexprimiert. Eine niedrige Expression an Mucin 15 im hepatozellulären Karzinom wurde mit verkürzten Überlebenszeiten der Patienten und einer verkürzten Zeit bis zum Wiederauftreten der Erkrankung in Verbindung gebracht [93]. Tumoren, die eine erhöhte Expression an Mucin 1 zeigten, wurden mit einer erhöhten Metastasierungsrate drei Jahre nach Resektion

im Vergleich zu Tumoren mit einer schwachen bzw. nicht vorhandenen Expression an Mucin 1 in Verbindung gebracht [94]. In unseren Versuchen war Mucin 1 in HepG2-Tumorzellknoten im Vergleich zu HepG2-Zellen *in vitro* unverändert.

- Cadherine sind Transmembranproteine, die die Gewebemorphogenese durch Kontrolle der Zell-Zell-Adhäsion sowie der Signalweiterleitung bewirken [95]. Je nach Krebsart nehmen Cadherine widersprüchliche Rollen ein. Cadherin 1 (CDH1) oder auch E-Cadherin fungiert beispielsweise als Suppressor von Wachstum und Invasion in zahlreichen Arten von Karzinomen. In normalem Gewebe wird Cadherin 1 hauptsächlich von Epithelien exprimiert, welche die Vorläufer von Karzinomen sind. Tumorfördernde Eigenschaften werden CDH1 im Fall von entzündlichem Brustkrebs, Ovarial- und Plattenepithelkarzinomen zugeschrieben. Auch die anderen Cadherine weisen je nach Tumorart verschiedene entweder supprimierende oder fördernde Eigenschaften auf [96]. In unseren Versuchen waren die Cadherine in HepG2 Zellen beim Übergang zum knotigen Wachstum überwiegend hochreguliert, lediglich CDH1 und CDH16 waren herunterreguliert. Es ist bisher keine Tumorart bekannt, in der CDH16 tumorfördernde Eigenschaften aufweist [96].
- Matrixmetallopeptidasen (MMPs) sind in die Homöostase der extrazellulären Umgebung involviert. Sie werden mit vielen Krebsarten in Verbindung gebracht und es wird angenommen, dass sie von grundlegender Bedeutung für die Überwindung der Basalmembran sind. Dabei stehen Überexpression von Matrixmetallopeptidasen und Progression des Tumors in Zusammenhang, wie durch entsprechende Mausmodelle gezeigt werden konnte. MMPs sind von Bedeutung im metastasierten Stadium, vor allem bei hoch aggressiven Tumoren im Endstadium mit einer schlechten klinischen Prognose. Matrixmetalloproteinasen fördern die Tumorprogression sowohl durch Degradierung der extrazellulären Matrix als auch durch Signalfunktionen. Aus diesen Gründen werden sie bereits seit längerer Zeit als mögliche Zielstrukturen für Krebstherapien erforscht und werden als *targets* diskutiert. Ein *target* ist definiert als ein Molekül, das eindeutig zum Entstehen oder Voranschreiten einer Erkrankung beiträgt. Wenn seine Aktivität durch ein Pharmakon herunterreguliert wird, wird der Normalzustand der Zelle und des Gewebes wiederhergestellt. Im Fall von Krebs könnte ein solches Pharmakon spezifisch eine pathologisch veränderte Zelle abtöten oder den Erkrankungsverlauf verlangsamen. MMP1, MMP2 und MMP7 werden auf Grund oben genannter Definition als *targets* eingestuft [97]. In unseren Versuchen waren MMP1, MMP2 und MMP7 in HepG2-Zellen beim Übergang zum knotigen Wachstum um mehr als Faktor 2 heraufreguliert.

5.3.2 A2780

5.3.2.1 Veränderungen beim Übergang zum Tumor

Im Fall von A2780-Zellen waren beim Wachstum als Tumorzellknoten nach dem Median 1409 Gensequenzen um mindestens Faktor 3 hochreguliert im Vergleich zum Wachstum als einschichtiger Zellrasen. 781 Gensequenzen waren um mindestens um Faktor 3 herunterreguliert. Nach dem Vergleich der Tumorzellknoten untereinander zeigten sich im Hinblick auf die veränderten Gensequenzen Übereinstimmungen zwischen 42 und 73 % im dreifach hochregulierten Bereich und Übereinstimmungen zwischen 54 und 66 % im dreifach herunterregulierten Bereich. Wie im Fall von HepG2 liegt die zufällig zu erwartende Übereinstimmung weit darunter.

5.3.2.2 A2780 und Cisplatin

Nach einer Behandlungszeit von 24 h mit Cisplatin lag die Überlebensrate der Putenembryonen bei 100 %. Sowohl makroskopisch als auch histologisch zeigten sich über die kurze Behandlungsdauer keine Unterschiede zwischen mit Cisplatin behandelten und unbehandelten A2780-Tumorzellknoten. Nach Applikation einer Cisplatin-Dosis von 1 mg Cisplatin pro Ei für 24 h waren in mit Cisplatin behandelten A2780-Tumorzellknoten im Vergleich zu den Kontrollen mehr Gensequenzen herauf- als herunterreguliert. Die Übereinstimmung der Veränderungen in den Einzeltumoren im Vergleich zum jeweiligen Kontrolltumor reichte von 12 bis 15 % im dreifach hochregulierten Bereich und von 20 bis 70 % im dreifach herunterregulierten Bereich. Die erwartete zufällige Übereinstimmung für den dreifach hochregulierten Bereich zwischen Tumorpaar 1 und Tumorpaar 3 wären 36 Gensequenzen gewesen, tatsächlich verändert waren jedoch 221 Gensequenzen. Dies zeigt, dass die überwiegende Mehrzahl der in den Tumoren beobachteten Genexpressionsveränderungen nicht als rein zufällige Übereinstimmung betrachtet werden kann.

Durch die Behandlung von A2780-Zellen mit Cisplatin *in vitro* war es möglich, die unter Behandlung aufgetretenen Veränderungen mit denen der Behandlung der A2780-Tumorzellknoten zu vergleichen. Es zeigte sich, dass nicht alle der Veränderungen, die bei der Behandlung der Tumorzellknoten aufgetreten sind, auch *in vitro* vorhanden waren. Beispielsweise wurden durch die Behandlung von A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin 1611 Gensequenzen um den Faktor 2 nach oben reguliert. Bei der Behandlung von A2780-Zellen *in vitro* mit Cisplatin wurden 813 Gensequenzen um den Faktor 2 nach oben reguliert. In beiden Versuchsansätzen ergab sich daraus eine Schnittmenge von 291 Gensequenzen, die sowohl bei der Behandlung der

Tumorzellknoten als auch bei der Behandlung der Zellen *in vitro* um den Faktor 2 nach oben reguliert wurden. Dies zeigt, dass sich die Veränderungen auf die Tumorzellknoten *in ovo* wesentlich komplexer darstellen als diejenigen auf Tumorzellen *in vitro*. Folglich existieren Effekte, die in Tumorzellknoten, nicht jedoch in Tumorzellen *in vitro* erkannt werden können.

5.3.2.3 Genes of interest

In A2780-Tumorzellknoten war eine Vielzahl von Gensequenzen im Vergleich zu A2780-Zellen *in vitro* verändert exprimiert. Im Folgenden wird eine kleine Auswahl dieser Gensequenzen näher betrachtet. Sowohl die Gensequenzen für ENO1 als auch für ENO2 um mehr als Faktor 2 erhöht. Diese Gensequenzen kodieren für die Isoenzyme Enolase 1, auch als alpha-Enolase bezeichnet, und Enolase 2, auch gamma-Enolase oder neuronenspezifische Enolase genannt. Bei den Enolasen handelt es sich um glykolytische Enzyme, die während der Glykolyse die Reaktion von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat katalysieren [98]. Beide Isoformen konnten mit verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. In Untersuchungen zum nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde gezeigt, dass Enolase 1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird [99], wo sie als Plasminogenrezeptor fungiert [100] und in die Degradierung der extrazellulären Matrix involviert ist. In Folge dessen waren Zellinvasion und Metastasierung erleichtert. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Enolase 1 konnten diese Vorgänge verhindert werden. Aus diesen Gründen wird Enolase 1 als potentielle Zielstruktur für eine Therapie vorgeschlagen [99]. Zudem steht eine erhöhte Expression an ENO1 mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben sowie einem kürzeren Gesamtüberleben bei diesen Patienten in Verbindung [101]. Enolase 1 könnte zudem als potentieller Biomarker zur Erkennung von Lungenkrebs dienen, da unter anderem erhöhte Konzentrationen von Enolase 1 im Sputum von Patienten mit Lungenkrebs im Frühstadium ermittelt werden konnten [102]. In zwei Zelllinien des Kolorektalkarzinoms wurden erhöhte Spiegel an Enolase 1 gefunden und wird außerdem auch in diesem Fall mit Metastasierung in Verbindung gebracht [103]. Bei Enolase 2 handelt es sich um die neuronale Isoform des glykolytischen Enzyms Enolase. Sie wird hauptsächlich in Neuronen und in neuroendokrinen Zellen exprimiert [104]. Von Enolase 2 wird berichtet, dass ihre Spiegel in verschiedenen Neoplasien erhöht waren, darunter im Kolonkarzinom, Brustkrebs und der T-Zell-Leukämie [104–106]. Außerdem konnte an einer Kolorektalkarzinomzelllinie gezeigt werden, dass sie mit einer Resistenz gegenüber Methotrexat im Zusammenhang steht [107].

5.3.3 HCT-8

5.3.3.1 Veränderungen beim Übergang zum Tumor

Beim Übergang zum knotigen Wachstum waren nach dem Median ca. 1600 Gensequenzen mindestens 3fach hochreguliert und ca. 400 Gensequenzen mindestens 3fach herunterreguliert. Die Tumorzellknoten stimmten im 3fach hochregulierten Bereich zu 65-75 % überein, im 3fach herunterregulierten Bereich zu 30-41 %.

5.3.3.2 Genes of interest

In HCT-8-Tumorzellknoten waren viele Gensequenzen im Vergleich zu HCT-8-Zellen aus Zellkultur verändert. Eine kleine Auswahl wird im Folgenden näher dargestellt. ANTXR2 ist in HCT-8 Zellen beim Übergang zum knotigen Wachstum um mehr als Faktor 2 hochreguliert. Anthrax Toxin Rezeptor 2 (ANTXR2), auch bekannt als *capillary morphogenesis gene 2* bzw. *tumor endothelial marker 8 (TEM8)*, ist während der kapillaren Morphogenese hochreguliert. Er ist an Zelladhäsion und -beweglichkeit beteiligt. Diese Faktoren sind wichtig für die Streuung von Krebszellen. Eine verminderte Expression von ANTXR2 konnte mit einer Krankheitsprogression und einer schlechten Prognose bei Brustkrebs in Verbindung gebracht werden. Nach Untersuchung von Gewebeproben aus primärem humanem Mammakarzinom wird berichtet, dass ANTXR2 einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Brustkrebszellen zeigt [108].

Auch die Expression von EphA2 ist in HCT-8-Zellen beim Übergang zum knotigen Wachstum um Faktor 2 erhöht. EphA2 gehört zur Familie der Eph-Rezeptor-Tyrosinkinasen und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung, der Neovaskularisierung und der Metastasierung bei einer großen Anzahl von epithelialen und mesenchymalen Krebsarten [109]. Bisher war die Rolle von EphA2 beim Wiederauftreten und der Progression des Kolorektalkarzinoms unklar. Dunne et al. konnten zeigen, dass sowohl in verschiedenen invasiven Kolonkarzinommodellen *in vitro* als auch in klinischen Tumorproben EphA2 verstärkt exprimiert wurde. Außerdem wurde eine erhöhte Expression von EphA2 mit einem schlechten Gesamtüberleben bei Patienten mit Kolorektalkarzinom der Stufe II/III in Verbindung gebracht. Dies wird auf die Fähigkeit der Rezeptor-Tyrosinkinase, Zellmigration und Zellinvasion zu fördern, zurückgeführt. Bei einer Herunterregulierung von EphA2 wurden sowohl Migration als auch Invasion einer invasiven Kolorektalkarzinomzelllinie unterdrückt [109]. Die erhöhte Expression von EphA2 in knotig wachsenden HCT-8-Zellen könnte darauf hindeuten, dass sich im Vergleich zu *in vitro* wachsenden Zellen sowohl das

Migrations- als auch das Invasionspotential erhöht haben. Diese Eigenschaften wären beim Wachstum als Tumorknoten im Gewebe nützlich.

5.4 Einordnung des Modells „CAM“ in den Gesamtkontext

Für die tumorbiologische Forschung sind präklinische Modelle wünschenswert, die die tumorbiologischen Verhältnisse im Patienten abbilden. Je nach Untersuchungsziel können verschiedene Modelle herangezogen werden. Diese reichen von der zweidimensionalen Zellkultur *in vitro* über die dreidimensionalen Sphäroide *in vitro* bis hin zu verschiedenen Tiermodellen *in vivo*. Alle Modelle dienen unter anderem dem Zweck, die Tumorbiologie besser zu verstehen und wirksame antineoplastische Arzneistoffe zu entwickeln. Dabei ist es von Vorteil, der klinischen Realität, dem Tumor im humanen Patienten, möglichst nahe zu kommen. Für verschiedene Untersuchungen sind unter anderem die Interaktion der Krebszellen mit ihrer Mikroumgebung und die Reaktionen innerhalb eines Tumorknotens von Bedeutung. Einen Überblick über die hier diskutierten Modelle mit einigen für die Untersuchung wichtigen Parametern bietet Tab. 5.2. Da das Immunsystem zum Zeitpunkt der Versuche noch nicht beziehungsweise nur rudimentär ausgebildet ist, ist das CAM-Modell für Fragestellungen in dieser Hinsicht nicht geeignet.

Tab. 5.2 Vergleich verschiedener Modelle im Hinblick auf verschiedene Untersuchungsparameter untereinander und Vergleich mit der klinischen Realität, dem humanen Patienten. Im Fall der Sphäroide sind auch Co-Kulturen möglich, hier wird jedoch der Schwerpunkt auf die reinen Tumorzellsphäroide gelegt.

	Zellkultur	Sphäroide	Tier (transplant.)	Tier (induz.)	CAM- Tumor	humaner Patient
humane Zellen	+	+	+	-	+	+
3D-Struktur	-	+	+	+	+	+
Gefäßversorgung	-	-	+	+	+	+
Tumorzellen per se untersuchen	+	+	-	-	+	-

Das von uns verwendete Modell der Generierung von Tumorzellknoten auf der CAM kann unter anderem dem Ziel der Medikamententestung dienen. Im Kontext anderer Modelle weist es diesen gegenüber sowohl Vor- als auch Nachteile auf. Unserem Modell am ähnlichsten ist das der Sphäroide aus Zellkultur, auch multizelluläre Tumorsphäroide genannt (MCTS, vom engl. *multicellular tumour spheroids*). Im Nachfolgenden soll darum ein kurzer Überblick über gängige Modelle gegeben und dabei etwas detaillierter auf das Modell der multizellulären Tumorsphäroide eingegangen werden. Ein weit verbreitetes Modell zur Medikamententestung ist das der Zellkultur *in vitro*. In Zellkulturmedium isoliert wachsende Tumorzellen etablierter Tumorzelllinien sind hervorragend standardisiert, aber artifiziell. Die Kulturbedingungen

spiegeln die Realität eines Tumorknotens im Hinblick auf Mikroumgebung, Versorgung und Wachstum nur äußerst begrenzt wieder. Für bestimmte Zwecke ist dieses Modell im Hinblick auf geringe Kosten und kurze Versuchsdauer sowie quantifizierbare Ergebnisse geeignet. Ein sehr verbreitetes *In-vivo*-Modell ist das Mausmodell. Dabei können Tumoren sowohl transplantiert als auch induziert werden (vgl. 1.2). Von Vorteil ist, dass die Tumorbiologie in einem lebenden Organismus erforscht werden kann. Die Nachverfolgbarkeit der einzelnen Schritte der Tumorentstehung sowie einzelner Ereignisse anderer Prozesse ist anspruchsvoll. Auch die quantitative Auswertung mechanistischer Daten ist sehr schwierig [110]. Ein weiteres *In-vitro*-Modell ist das der multizellulären Tumorsphäroide, im Folgenden kurz als „Sphäroide“ bezeichnet. Sphäroide sind Zellaggregate, die als Suspension in Medium oder eingebettet in eine 3D-Matrix vorliegen. Es ist unter anderem möglich, Sphäroide aus Zellen aus Zellkultur oder direkt aus humanem Tumorgewebe zu generieren [111]. Sphäroide können mittels verschiedener Techniken generiert werden. Einige davon führen zu Sphäroiden uniformer Größe, aus anderen resultieren Sphäroide mit Größenunterschieden. Allen gemein ist, dass das weitere Wachstum durch die fehlende Angiogenese und die daraus resultierende mangelnde Versorgung der Zellen beschränkt ist. Die Genexpressions- und Proteinexpressionsprofile von Tumorzellen in Sphäroiden ähneln klinischen und *In-vivo*-Genexpressionsprofilen stärker als Genexpressionsprofile aus konventioneller Zellkultur. Dies resultiert unter anderem daraus, dass Sphäroide Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zwischen Tumorzellen und Mikroumgebung sowie Transporteigenschaften zeigen. Zudem unterliegen größere Sphäroide einem Sauerstoff- und Nährstoffgradienten. Daraus resultiert die Entstehung eines nekrotischen Kerns ähnlich dem gefäßarmer Tumoren. Ebenso existieren Proliferationsgradienten in Sphäroiden, die denen in Tumoren ähnlich sind [110]. Tumorsphäroide werden in verschiedenen Bereichen der tumorbiologischen Forschung verwendet. Beispiele sind die Untersuchung der Zellfunktion (z.B. Zellproliferation, Migration und Invasion) in einer Tumormikroumgebung ohne Gefäße, die Entwicklung neuer Therapien und Kandidatenprüfungen für neue Wirkstoffe, die Untersuchung der Tumorangiogenese und die Untersuchung von Interaktionen zwischen Tumor und Immunzellen [110]. Tumorsphäroide werden im Bereich der Wirkstoffprüfung eingesetzt, um unter anderem das Ansprechen und die Sensitivität des Tumors auf beziehungsweise gegenüber antineoplastischen Arzneistoffen, Kombinationstherapien und zielgerichteter Therapien zu bewerten. Dabei werden sie im Allgemeinen als Instrument des Hochdurchsatzscreenings für die Identifikation unbrauchbarer Wirkstoffe genutzt, um Tierversuche zu reduzieren, und für die Identifikation vielversprechender neuer Wirkstoffe in der Wirkstoffentwicklung verwendet.

Tumorsphäroide sind einer Behandlung gegenüber resistenter als Zellen in Zellkultur und spiegeln darum die Wirkstoffresistenz in humanen soliden Tumoren eher wieder [110]. Auch Ko-Kulturen sind möglich, beispielsweise mit Fibroblasten. Diese dienen dem Zweck, den Einfluss des Stromas auf die Tumorzellen zu untersuchen [111]. Neben der Generierung von Sphäroiden aus Zellen aus etablierten Zelllinien ist es möglich, Sphäroide direkt aus humanen Tumorproben zu gewinnen. Hoffmann et al. sind der Meinung, dass das Modell der Tumorsphäroide aus humanem Krebsgewebe dem Goldstandard in der onkologischen Wirkstofftestung, dem subkutanen Xenograft-Mausmodell, im Hinblick auf Interspeziesdifferenzen, Tumorerogenität (welche im Mausmodell verloren geht) und Proliferationsaktivität (welche im Mausmodell unnatürlich hoch ist) überlegen sei. Allerdings ist auch hier das fehlende Gefäßsystem von Nachteil. Zusätzlich verhindern die Heterogenität der Arzneimittelwirksamkeit zwischen verschiedenen Patienten sowie Schwierigkeiten bei der Gewinnung der Tumorproben eine weit verbreitete praktische Anwendung des Modells [111]. Tumorzellknoten auf der CAM wachsen ähnlich den Sphäroiden dreidimensional und sind damit der klinischen Realität näher als Zellen in konventioneller Zellkultur. Außerdem werden Tumorknoten im humanen Patienten durch ein Gefäßsystem mit den notwendigen Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Gefäßversorgung ist in unserem Modell durch die CAM gegeben. Wie mittels Immunhistochemie gezeigt werden konnte, scheint sich der Tumorzellknoten Gefäße aus der CAM zu rekrutieren und diese für die eigene Versorgung zu nutzen. In der Konsequenz werden die Tumorzellknoten besser mit Nährstoffen und Sauerstoff und Sauerstoff versorgt und so kommt es teilweise zu Tumorzellknoten von beachtlicher Größe. Im Sphäroidmodell fehlt die Gefäßversorgung. Infolgedessen ist das Sphäroidwachstum begrenzt. Neben makroskopischer und histologischer Ähnlichkeit ist die Übereinstimmung der Genexpressionsmuster zwischen den verschiedenen Tumorzellknoten ebenfalls sehr hoch. Die Ergebnisse konnten in verschiedenen Versuchen reproduziert werden. Die Varianz der Genexpressionsmuster innerhalb der verschiedenen Zelllinien war gering. Die Zielpopulation eines eventuell vorhandenen pharmakologischen Effekts ist klar erkennbar. Die Genexpression kann für die eigentlichen Tumorzellen, das heißt die transplantierten Zellen, bestimmt werden, da keine Kreuzhybridisierung stattfindet und keine Verfälschung durch andere humane Zellen stattfindet. Die Kulturbedingungen sind näher an der klinischen Realität als diejenigen von Zellen aus Zellrasen, da andere Faktoren von Bedeutung sind. Zellen in Tumorzellknoten wachsen im Zellverband und interagieren mit umliegendem Wirtsgewebe. Die Gewinnung der Tumorzellknoten ist simpel, da sie nicht im Wirtsorganismus wachsen und trotzdem den Vorteil haben, über dessen Gefäßnetz angeschlossen zu sein und darüber mit

Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden. Die Dosis des zu untersuchenden Therapeutikums ist neben der Empfindlichkeit der Tumorzellen ebenso abhängig vom Putenembryo. Falls dieser abstirbt, ist auch der Tumorzellknoten nicht weiter verwendbar. So kann das Experiment gleichzeitig für eine erste grobe Einschätzung der Toxikologie dienen, bevor im Tiermodell getestet wird.

6. Zusammenfassung

Während der Arzneimittelentwicklung scheitern viele *in vitro* vielversprechend scheinende Wirkstoffe während der klinischen Prüfung am humanen Patienten. Für onkologische Wirkstoffe ist die Ausfallquote besonders hoch. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von präklinischen Modellen, die der klinischen Situation im Patienten möglichst nah kommen, besonders wichtig. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Modell der humanen Tumorzellknoten auf der Chorion-Allantois-Membran (CAM) von befruchteten Puteneiern. Die humanen Karzinomzelllinien HepG2, A2780 und HCT-8 führten nach Applikation auf die CAM von befruchteten Puteneiern zuverlässig zur Bildung von Tumorzellknoten. Die Ergebnisse waren reproduzierbar. Innerhalb einer Zelllinie waren sich die Tumorzellknoten sowohl makroskopisch als auch histologisch sehr ähnlich.

Die Hypothese, die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellt wurde, konnte bestätigt werden. Es wurden zahlreiche Genexpressionsveränderungen in verschiedenen etablierten Tumorzelllinien beim Übergang zum pathologischen Wachstum als Tumorzellknoten dargestellt. Diese Veränderungen zeigten eine geringe Varianz. Auch zelllinienübergreifend konnten für die drei Karzinomzelllinien Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Genexpressionsmusteränderungen beobachtet werden. Deren Anzahl überstieg um ein Vielfaches, was als zufällige Übereinstimmung zu erwarten gewesen wäre. Folglich treten mit dem Übergang vom Wachstum der Zellen als Zellrasen zum Wachstum als Knoten regelhaft in verschiedenen Tumorzelllinien dieselben Veränderungen auf. Die in Tumorknoten häufig auftretende Hypoxie war nicht ursächlich für die beobachteten Expressionsveränderungen in Tumorzellknoten auf der CAM. Diese Veränderungen der Genexpression könnten einerseits Ursache für das knotige Wachstum beziehungsweise die Ausbildung der dreidimensionalen Knotenstruktur sein. Andererseits könnte es sich um einen Ausdruck notwendiger Anpassungsreaktionen der Tumorzellen an die im Knoten veränderten Wachstumsbedingungen handeln. In beiden Fällen könnten sie für das Bestehen des Tumorzellknotens von essenzieller Bedeutung sein. Dies bedeutet, dass der Tumorzellknoten nur dann existieren kann, wenn die adaptiven Mechanismen funktionieren. Aus diesem Grund könnten die Gensequenzen, die in allen drei Tumorzelllinien gleichsinnig verändert sind, therapeutisch als Zielstruktur von Interesse sein.

Durch die Behandlung der A2780-Tumorzellknoten mit Cisplatin traten deutlich mehr Veränderungen auf als durch die Behandlung der HepG2-Tumorzellknoten mit Sorafenib. Vermutlich ist dies auf die typische zytotoxische Wirkungsweise des Cisplatin auf DNA und andere Makromoleküle zurückzuführen. Im Gegensatz dazu

sind zielgerichtete Therapien, zum Beispiel durch Inhibition von Proteinkinasen, spezifischer und rufen vermutlich weniger Veränderungen hervor. Dabei ist bemerkenswert, dass eine Anzahl von behandlungsinduzierten Expressionsmusteränderungen zwar in den Tumorzellknoten, nicht jedoch bei Behandlung der Tumorzellen *in vitro* gefunden wurde. Dies legt nahe, dass manche Effekte antineoplastischer Arzneistoffe nur bei der Behandlung der Tumorzellen in Tumorzellknoten, nicht jedoch bei der Behandlung der Tumorzellen *in vitro* gesehen werden können.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*, 2010; 203–214.
- [2] Kola I, Landis J. Opinion: Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3: 711–716.
- [3] Chabner BA, Roberts TG. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005; 5: 65–72.
- [4] Stratmann AT, Dandekar G, Nietzer SL. Three-dimensional in vitro Tumor Models as an Alternative for Animal Models in Preclinical Studies. *pharmind*, 2013; 75: 485–489.
- [5] Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, 2015; 17: 1–15.
- [6] Kunz-Schughart LA. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *J Biomol Screen*, 2004; 9: 273–285.
- [7] Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol*, 2005; 204: 522–531.
- [8] Olive KP, Tuveson DA. The Use of Targeted Mouse Models for Preclinical Testing of Novel Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 5277–5287.
- [9] Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2008; 30: 183–196.
- [10] Hanahan D, Wagner EF, Palmiter RD. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes Dev*, 2007; 21: 2258–2270.
- [11] Donehower LA. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin Cancer Biol*, 1996; 7: 269–278.
- [12] Ribatti D. *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis*. Springer, Dordrecht, 2010.
- [13] Murphy JB, Rous P. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *J Exp Med*, 1912; 15: 119–132.
- [14] Hagedorn M, Wilting J. *Methods in Endothelial Cell Biology*. In: Springer Lab Manuals. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004.
- [15] Hillier LW, Miller W, Birney E, et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 2004; 432: 695–716.
- [16] Fachinformation. Fachinformation Nexavar®, Stand der Information 11-2014. <http://www.fachinfo.de>. Zuletzt geprüft im Juni 2016.

- [17] European Medicines Agency. EPAR: ANNEX I: summary of product characteristics Nexavar, 01-2015. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000690/WC500027704.pdf. Zuletzt geprüft im Juni 2016.
- [18] Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*, 2008; 7: 3129–3140.
- [19] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 835–844.
- [20] Fachinformation. Fachinformation Cisplatin Teva®, Stand der Information 03-2015. <http://www.fachinfo.de>. Zuletzt geprüft im Juni 2016.
- [21] Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*, 2003; 103: 645–662.
- [22] Ott I, Gust R. Medizinische Chemie der Platinkomplexe. *Pharmuz*, 2006; 35: 124–133.
- [23] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003; 22: 7265–7279.
- [24] Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol*, 2007; 73: 298–307.
- [25] Jongh FE de, van Veen RN, Veltman SJ, et al. Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer*, 2003; 88: 1199–1206.
- [26] von Schlippe M, Fowler CJ, Harland SJ. Cisplatin neurotoxicity in the treatment of metastatic germ cell tumour: time course and prognosis. *Br J Cancer*, 2001; 85: 823–826.
- [27] McKeage MJ. Clinical toxicology of platinum based cancer chemotherapeutic agents. In: *Platinum based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa (N.J.), 2000.
- [28] Lindl T, Gstraunthaler G. Subkultivierung von Monolayerkulturen. Spektrum Akademischer Verlag, Wiesbaden, 2008.
- [29] Liu L, Cao Y, Chen C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11851–11858.
- [30] Ou DL SYYSa. Induction of DNA damage-inducible gene GADD45beta contributes to sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 2010; 2010: 9309–9318.

-
- [31] Gao Y LHXLea. Bufalin enhances the anti-proliferative effect of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cells through downregulation of ERK. *Mol Biol Rep*, 2012; 2012: 1683–1689.
- [32] Mohn C. Relevance of glutathione and MRP-mediated efflux for platinum resistance. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2013.
- [33] Weykam S. Differentielle Genexpression in Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialkarzinom-Zelllinien und Untersuchung der Funktion von EMP1. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- [34] Parker RJ, Eastman A, Bostick-Bruton F, et al. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *J Clin Invest*, 1991; 87: 772–777.
- [35] Lorkowski S, Lorkowski G, Cullen P. Biochips - Das Labor in der Streichholzsachtel. *ChiuZ*, 2000; 34: 356–372.
- [36] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*, 2002; 32 Suppl: 496–501.
- [37] Kloft C, Appelius H, Siegert W, et al. Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless atomic absorption spectrometry assay. *Ther Drug Monit*, 1999; 21: 631–637.
- [38] Pieck AC. Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2004.
- [39] Stimpfl M, Schmid BC, Schiebel I, et al. Expression of mucins and cytokeratins in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett*, 1999; 145: 133–141.
- [40] Karnofsky DA, Ridgway LP, Patterson PA. Tumor transplantation to the chick embryo. *Ann NY Acad Sci*, 1952; 55: 313–329.
- [41] Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV, et al. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Engl J Med*, 1996; 335: 1950–1955.
- [42] Zeimet AG, Reimer D, Radl AC, et al. Pros and cons of intraperitoneal chemotherapy in the treatment of epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*, 2009; 29: 2803–2808.
- [43] Zivanovic O, Abramian A, Kullmann M, et al. HIPEC ROC I: a phase I study of cisplatin administered as hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemoperfusion followed by postoperative intravenous platinum-based chemotherapy in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 2015; 136: 699–708.
- [44] Markman M, Hakes T, Reichman B, et al. Intraperitoneal therapy in the management of ovarian carcinoma. *Yale J Biol Med*, 1989; 62: 393–403.

- [45] Stewart DJ, Mikhael NZ, Nanji AA, et al. Renal and hepatic concentrations of platinum: relationship to cisplatin time, dose, and nephrotoxicity. *J Clin Oncol*, 1985; 3: 1251–1256.
- [46] Fichtinger-Schepman AM, Vendrik CP, van Dijk-Knijnenburg WC, et al. Platinum concentrations and DNA adduct levels in tumors and organs of cisplatin-treated LOU/M rats inoculated with cisplatin-sensitive or -resistant immunoglobulin M immunocytoma. *Cancer Res*, 1989; 49: 2862–2867.
- [47] Johnsson A, Olsson C, Nygren O, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995; 37: 23–31.
- [48] Kita Y, Mimori K, Tanaka F, et al. Clinical significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 2009; 35: 52–58.
- [49] Chang SC, Chen HF, Chou MH, et al. Haemoglobin in normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Comp Oncol*, 2010; 8: 302–309.
- [50] Gorr TA, Wichmann D, Pilarsky C, et al. Old proteins - new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011; 202: 563–581.
- [51] Davidson B, Abeler VM, Forsund M, et al. Gene expression signatures of primary and metastatic uterine leiomyosarcoma. *Hum pathol*, 2014; 45: 691–700.
- [52] Span PN, Manders P, Heuvel JJ, et al. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene*, 2002; 21: 8506–8509.
- [53] Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*, 2000; 19: 6533–6548.
- [54] Buggy Y, Maguire TM, McGreal G, et al. Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer*, 2004; 91: 1308–1315.
- [55] Kaur J, Tikoo K. Ets1 identified as a novel molecular target of RNA aptamer selected against metastatic cells for targeted delivery of nano-formulation. *Oncogene*, 2015: 5216–5228.
- [56] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 2004; 4: 437–447.
- [57] Murray GI, Paterson PJ, Weaver RJ, et al. The expression of cytochrome P-450, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1993; 71: 36–43.
- [58] Narjoz C, Favre A, McMullen J, et al. Important role of CYP2J2 in protein kinase inhibitor degradation: a possible role in intratumor drug disposition and resistance. *PLoS ONE*, 2014; 9: e95532.

-
- [59] Ikenouchi J, Umeda M. FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 748–753.
- [60] Goldie SJ, Mulder KW, Tan DW-M, et al. FRMD4A upregulation in human squamous cell carcinoma promotes tumor growth and metastasis and is associated with poor prognosis. *Cancer Res*, 2012; 72: 3424–3436.
- [61] Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell*, 2010; 19: 491–505.
- [62] Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, et al. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem*, 2009; 44: 29–64.
- [63] Yamasaki M, Nomura T, Sato F, et al. Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells. *Oncol Rep*, 2007; 18: 1145–1153.
- [64] Downie D, McFadyen MCE, Rooney PH, et al. Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 7369–7375.
- [65] Sawiris GP, Sherman-Baust CA, Becker KG, et al. Development of a highly specialized cDNA array for the study and diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 2002; 62: 2923–2928.
- [66] Ogawa T, Ogawa K, Shiga K, et al. Upregulation of IGF2 is associated with an acquired resistance for cis-diamminedichloroplatinum in human head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010; 267: 1599–1606.
- [67] Brouwer-Visser J, Lee J, McCullagh K, et al. Insulin-like growth factor 2 silencing restores taxol sensitivity in drug resistant ovarian cancer. *PLoS ONE*, 2014; 9: e100165.
- [68] Chen YW, Boyartchuk V, Lewis BC. Differential roles of insulin-like growth factor receptor- and insulin receptor-mediated signaling in the phenotypes of hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia*, 2009; 11: 835–845.
- [69] The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 2012; 487: 330–337.
- [70] Brakenhoff RH, Gerretsen M, Knippels EM, et al. The human E48 antigen, highly homologous to the murine Ly-6 antigen ThB, is a GPI-anchored molecule apparently involved in keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 1995; 129: 1677–1689.
- [71] Nieuwenhuis EJC, Leemans CR, Kummer JA, et al. Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab Invest*, 2003; 83: 1233–1240.

- [72] Rubinfeld B, Upadhyay A, Clark SL, et al. Identification and immunotherapeutic targeting of antigens induced by chemotherapy. *Nat Biotechnol*, 2006; 24: 205–209.
- [73] Eshel R, Zanin A, Kapon D, et al. Human Ly-6 antigen E48 (Ly-6D) regulates important interaction parameters between endothelial cells and head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*, 2002; 98: 803–810.
- [74] van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, et al. Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Exp Hematol*, 2009; 37: 78–86.
- [75] Ting JPY, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8: 372–379.
- [76] Sanz C, Calasanz M, Andreu EJ, et al. NALP1 is a transcriptional target for cAMP-response-element-binding protein (CREB) in myeloid leukaemia cells. *Biochem J*, 2004; 384: 281.
- [77] Liebermann DA, Hoffman B. Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal*, 2014; 3: 15.
- [78] Wang L, Xiao X, Li D, et al. Abnormal expression of GADD45B in human colorectal carcinoma. *J Transl Med*, 2012; 10: 215.
- [79] Huang B, Belharazem D, Li L, et al. Anti-Apoptotic Signature in Thymic Squamous Cell Carcinomas – Functional Relevance of Anti-Apoptotic BIRC3 Expression in the Thymic Carcinoma Cell Line 1889c. *Front Oncol*, 2013; 3: 1–9.
- [80] Jönsson JM, Bartuma K, Dominguez-Valentin M, et al. Distinct gene expression profiles in ovarian cancer linked to Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 2014; 13: 537–545.
- [81] Cohen S, Bruchim I, Graiver D, et al. Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2. *J Mol Med*, 2013; 91: 357–368.
- [82] Wang J, Cai Y, Penland R, et al. Increased expression of the metastasis-associated gene Ehm2 in prostate cancer. *Prostate*, 2006; 66: 1641–1652.
- [83] Yu H, Ye L, Mansel RE, et al. Clinical Implications of the Influence of Ehm2 on the Aggressiveness of Breast Cancer Cells through Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 Expression. *Mol Cancer Res*, 2010; 8: 1501–1512.
- [84] Benassi B, Marani M, Loda M, et al. USP2a alters chemotherapeutic response by modulating redox. *Cell Death Dis*, 2013; 4: e812.
- [85] Allende-Vega N, Sparks A, Lane DP, et al. MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a. *Oncogene*, 2009; 29: 432–441.
- [86] Kim J, Kim WJ, Liu Z, et al. The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer. *Cell Cycle*, 2014; 11: 1123–1130.
- [87] Alam H, Sehgal L, Kundu ST, et al. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2011; 22: 4068–4078.

-
- [88] Nam HJ, van Deursen JM. Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nat Cell Biol*, 2014; 16: 538–549.
- [89] Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J*, 1995; 14: 1646–1654.
- [90] Hu L, Duan YT, Li J-F, et al. Biglycan enhances gastric cancer invasion by activating FAK signaling pathway. *Oncotarget*, 2014; 5: 1885–1896.
- [91] Yamamoto K, Ohga N, Hida Y, et al. Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. *Br J Cancer*, 2012; 106: 1214–1223.
- [92] Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol*, 2006; 16: 467–476.
- [93] Wang RY, Chen L, Chen HY, et al. MUC15 Inhibits Dimerization of EGFR and PI3K–AKT Signaling and Is Associated With Aggressive Hepatocellular Carcinomas in Patients. *Gastroenterology*, 2013; 145: 1436-1448.e12.
- [94] Yuan SF, Li KZ, Wang L, et al. Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol*, 2005; 11: 4661–4666.
- [95] Maître JL, Heisenberg CP. Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion. *Curr Biol*, 2013; 23: R626-R633.
- [96] van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2014; 14: 121–134.
- [97] Overall CM, Kleifeld O. Tumour microenvironment — Opinion: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6: 227–239.
- [98] Subramanian A. Structural Analysis of alpha -Enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem*, 2000; 275: 5958–5965.
- [99] Hsiao KC, Shih NY, Fang HL, et al. Surface α -Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE*, 2013; 8: 1–15.
- [100] Díaz-Ramos À, Roig-Borrellas A, García-Melero A, et al. α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *J Biomed Biotechnol*, 2012; 2012: 1–12.
- [101] Liu KJ, Shih NY. The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *J Canc Mol*, 2007; 3: 45–48.

- [102] Yu L, Shen J, Mannoor K, et al. Identification of ENO1 As a Potential Sputum Biomarker for Early-Stage Lung Cancer by Shotgun Proteomics. *Clin Lung Cancer*, 2014; 15: 372.
- [103] Katayama M, Nakano H, Ishiuchi A, et al. Protein Pattern Difference in the Colon Cancer Cell Lines Examined by Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Surg Today*, 2006; 36: 1085–1093.
- [104] Dowling P, Hughes DJ, Larkin AM, et al. Elevated levels of 14-3-3 proteins, serotonin, gamma enolase and pyruvate kinase identified in clinical samples from patients diagnosed with colorectal cancer. *Clin Chim Acta*, 2015; 441: 133–141.
- [105] Kitakata H, Yasumoto K, Sudo Y, et al. A case of primary small cell carcinoma of the breast. *Breast Cancer*, 2007; 14: 414–419.
- [106] Fujiwara H, Arima N, Ohtsubo H, et al. Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell leukemia. *Am J Hematol*, 2002; 71: 80–84.
- [107] Selga E, Morales C, Noé V, et al. Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells. *BMC Med Genomics*, 2008; 1: 1–35.
- [108] Ye L, Sun PH, Malik MFA, et al. Capillary morphogenesis gene 2 inhibits growth of breast cancer cells and is inversely correlated with the disease progression and prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014; 140: 957–967.
- [109] Dunne PD, Dasgupta S, Blayney JK, et al. EphA2 Expression Is a Key Driver of Migration and Invasion and a Poor Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*, 2016; 22: 230–242.
- [110] Katt ME, Placone AL, Wong AD, et al. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol*, 2016; 4: 1–14.
- [111] Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, et al. Impact of the spheroid model complexity on drug response. *J Biotechnol*, 2015; 205: 14–23.

8. Anhang

8.1 Primer für die RT-PCR

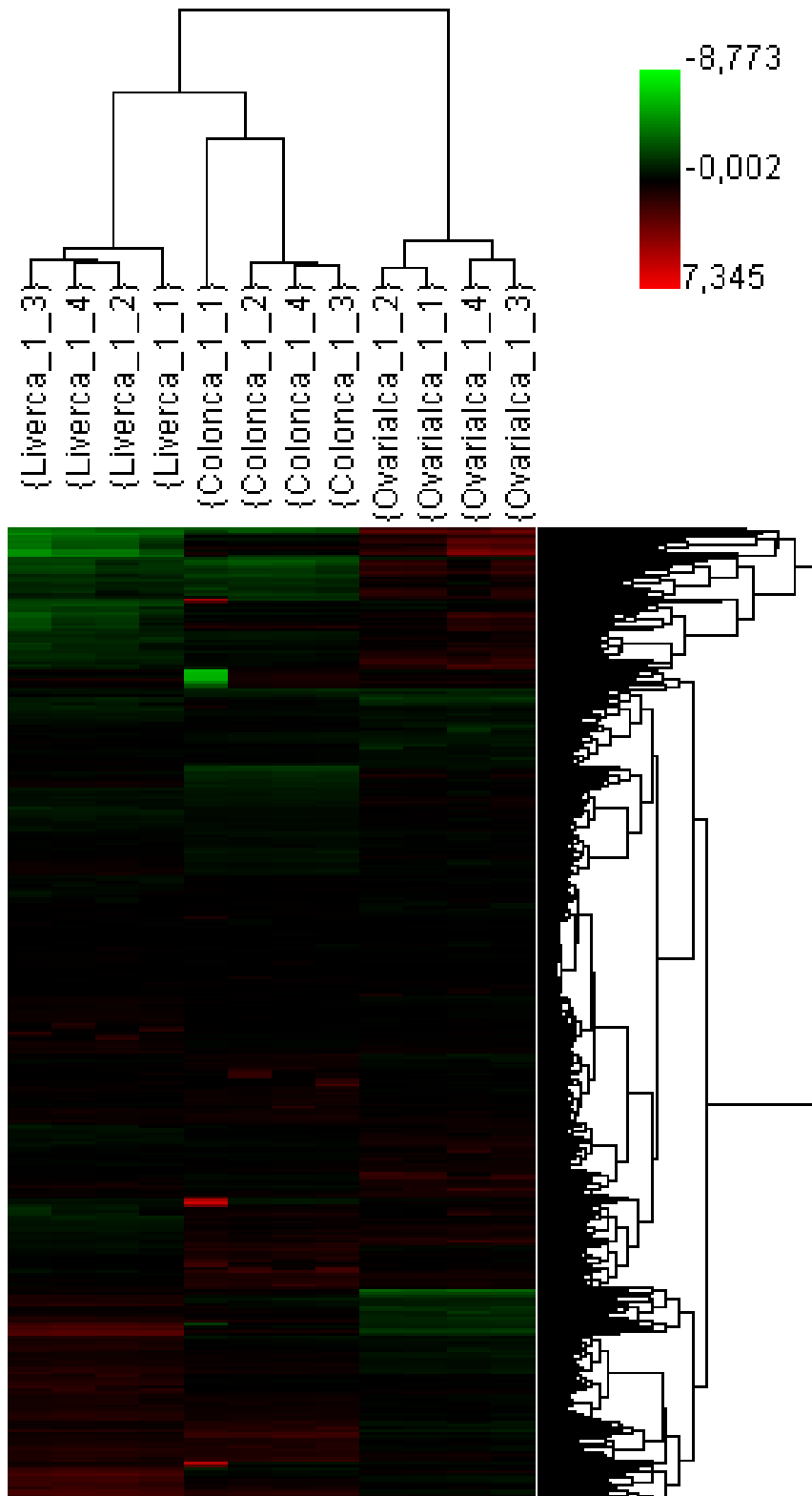
Tab. 8.1: Primer für die RT-PCR : Name und Funktion der untersuchten Gene

Primary Sequence Name	Beschreibung
COL7A1	Homo sapiens collagen, type VII, alpha 1
DLX3	Homo sapiens distal-less homeobox 3
ETS1	Homo sapiens v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
GOLGA8A	Homo sapiens golgin A8 family, member A
HBA1	Homo sapiens hemoglobin, alpha 1
HBE1	Homo sapiens hemoglobin, epsilon 1
HBQ1	Homo sapiens hemoglobin, theta 1
HMOX 1	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1
IGF1	Homo sapiens insulin-like growth factor 1
IGF2	Homo sapiens insulin-like growth factor 2
KLF12	Homo sapiens Kruppel-like factor 12
KRT7	Homo sapiens keratin 7
KRT75	Homo sapiens keratin 75
LCK	Homo sapiens lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MAFB	Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
P4HA2	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II
PARD3B	Homo sapiens par-3 partitioning defective 3 homolog B (C. elegans)
PHKG1	Homo sapiens phosphorylase kinase, gamma 1 (muscle)
PIGL	Homo sapiens phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L
TRPM3	Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3
TSPAN 10	Homo sapiens tetraspanin 10
TSPAN32	Homo sapiens tetraspanin 32
VEGFC	Homo sapiens vascular endothelial growth factor C
WISP1	Homo sapiens WNT1 inducible signaling pathway protein 1

8.2 Heatmap HepG2, A2780 und HCT-8

Abb. 8.1 Heatmap mit allen Tumorzellknoten inklusive des herausstechenden HCT-8 Tumorzellknotens (Colonca_1_1) (vgl. 4.2.4.1)

Ward's (Minimum variance) + (Nonnormalized data)



8.3 Ergänzungen: Primary Sequence Names

Tab. 8.2 Primary Sequence Names der Gensequenzen, die in den Tumorzellknoten aller drei Tumorzelllinien im Vergleich zur Zellkultur in vitro mindestens um den Faktor 3 in ihrer Expression erhöht waren.

A_23_P46070	AK023121	BM680083	EPHA4
A_24_P120381	AK023412	BQ548663	ETS1
A_24_P174353	AK023542	BQ719988	FGD2
A_24_P477516	AK023660	BQ778202	FLJ10232
A_24_P477610	AK023774	BU561469	FLJ11783
A_24_P524519	AK024147	BX095252	FLJ21408
A_24_P543460	AK026418	BX099367	FLJ38576
A_24_P698698	AK026418	BX100717	GFRA1
A_24_P940079	AK057196	BX111257	GJA9
A_32_P105940	AK074635	BX641014	GJB4
A_32_P121483	AK090477	BX647987	GLRA1
A_32_P130217	AK092715	C21orf66	GOLGA
A_32_P142664	AK092791	C8orf59	GOLGA8A
A_32_P160670	AK093006	CA433167	GPR32
A_32_P18300	AK094156	CB984746	HBA2
A_32_P185718	AK094334	CDH11	HBE1
A_32_P212958	AK094659	CDH4	HIST1H3B
A_32_P222060	AK096487	CHRM5	HLA-DOA
A_32_P222106	AK096778	CIRBP	HOP
A_32_P71016	AK098478	COL12A1	IGF2
A_32_P71212	AK123757	COL5A1	IL2RG
A_32_P90615	AK124352	COL7A1	ITGB1BP3
AB011119	AK127494	COQ9	JAZF1
ABI3	AK127572	CR597597	KCNMB2
ABLIM2	AK129547	CTNND2	KCNV2
ACRBP	AL036373	CUGBP2	KDR
AEBP1	AL049390	CUGBP2	KIAA0485
AF075112	AL080232	CV573177	KIAA1641
AF085962	AL390143	DDX17	KIFC2
AF086011	AL512741	DKFZP434P211	KRT14
AF116619	AL833696	DKFZp547G183	KRT7
AF131782	ATRX	DNAJA4	KRT75
AF143879	AY358211	DQ786230	LOC147650
AF193050	BACH2	DQ786299	LOC150759
AF258585	BASP1	DRD5	LOC284454
AI382322	BC028243	EBF1	LOC285986
AI911989	BC030757	ENST00000266661	LOC401317
AK000420	BC030992	ENST00000273641	LOC650517
AK001118	BC043527	ENST00000311208	LOC728047
AK022044	BC053353	ENST00000331575	LOC728411
AK022044	BC127739	ENST00000331594	LY6D
AK022086	BGN	ENST00000343519	MAFB
AK022268	BIRC3	ENST00000380231	MBTD1
MGC102966	THC2503819	THC2701372	MT1E
MGC102966	THC2519126	THC2708710	MT1G
MIA	THC2532455	THC2712687	MT1H

MIRH1	THC2533385	THC2722939	MT1H
MIRH1	THC2539273	THC2736955	MT1L
MT1B	THC2543854	THC2739159	MT1X
MT1X	SLC2A3	THC2646402	THC2740317
MT2A	SLC30A4	THC2647658	THC2744561
MT2A	SMARCA2	THC2648967	THC2745859
MT2A	SNAI2	THC2651036	THC2749235
MYCN	SPATA5L1	THC2655810	THC2753968
NGLY1	STAT5A	THC2655811	THC2755661
NLRP1	SYT11	THC2656699	THC2760643
NPHS2	TAS2R10	THC2657163	THC2766102
NPR1	TAT	THC2660562	THC2773362
ODF4	THC2553512	THC2662514	THEG
OXTR	THC2564393	THC2663783	TIE1
P4HA3	THC2569379	THC2664215	TRIM62
PHKG1	THC2575933	THC2665334	TSHZ3
PLCL1	THC2585656	THC2666687	TSPAN10
PPFIA4	THC2610890	THC2667616	TSPAN32
PPP2R2C	THC2611661	THC2669975	WDR21C
PRMT8	THC2616009	THC2671036	WISP1
PTPN5	THC2628739	THC2672701	WNT7A
PTPRG	THC2633747	THC2674306	XDH
RASL12	THC2636529	THC2676548	ZEB2
RBM24	THC2639487	THC2679528	ZNF238
RP5-964H19.3	THC2640472	THC2683295	ZNF467
RUNX1T1	THC2641453	THC2690780	
SH2D1B	THC2642550	THC2694186	

Tab. 8.3 Primary Sequence Names der Gensequenzen, die in den Tumorzellknoten aller drei Tumorzelllinien im Vergleich zur Zellkultur in vitro mindestens um den Faktor 3 in ihrer Expression verringert waren.

A_24_P106166	AW589254	OSTbeta	RPGRIP1
ABCD3	GATS	PCSK9	THC2713242
AF116616	HMGCS1	PIGL	
AF320072	MVK	RBM3	

Tab. 8.4 Primary Sequence Names der Gensequenzen, die sowohl in mit Cisplatin behandelten A2780-Tumorzellknoten als auch in mit Cisplatin behandelten A2780-Zellen in vitro mindestens um den Faktor 3 in ihrer Expression erhöht waren (vgl. 4.9.2).

ABCG4	DAO	KCNS2	RIPK4
ABTB2	DCLK1	KIAA1462	RPL23AP7
AHNAK2	DDB2	KIAA1462	RRAD
AHNAK2	DNAJB5	KLHL30	RRM2B
ALDH1A3	DPF3	KLRC1	S1PR3
ALOX5	DQX1	KLRG2	SCN3B
ANK1	DRAM1	LAMP3	SCN4B
ANK1	E2F7	LAPTM5	SECTM1
ANKRA2	EBI3	LCE1B	SERPINB5

ANKRD20A8P	EDN2	LCE1C	SESN1
ANXA4	EFCAB9	LDLRAD1	SFN
APOBEC3H	EFNB1	LDLRAD1	SHROOM2
AQP3	ENHO	LFNG	SIGLEC14
AQP3	EPAS1	LINGO1	SLC2A5
ARC	EPN3	LOC389332	SLC30A1
AREG	EPPK1	LOC727916	SLC38A8
AREG	EPS8L2	LOC730227	SLCO2B1
ASTN2	F11R	LRRC38	SMAD3
BBC3	F11R	LSP1	SNAI3
BIK	FAM101A	LY6D	SORBS1
BTG2	FAM105A	LY6K	SORCS2
C11orf96	FAM150A	LYZL4	SOX7
C1orf172	FAM196A	MAEL	SPANXA1
C1orf183	FAM84B	MDM2	SPANXB2
C1orf187	FAM92B	MEGF6	SPANXB2
C20orf108	FAS	MGC20647	SRGAP3
C21orf71	FAS	MLPH	SRPX
C2CD4B	FAS	MUC6	SULF2
C2orf62	FDXR	MYBPHL	SUSD2
C4B	FEZ1	MYO6	SYTL1
C9orf169	FILIP1L	NINJ1	TLR2
C9orf169	FLJ16779	NLRP13	TMEM146
C9orf47	FLJ41484	NODAL	TMEM92
CABYR	FLYWCH1	NOTCH1	TNFAIP8
CABYR	FOSL1	NPNT	TNFSF9
CACNA1C	FOXJ1	NTN1	TNNC2
CACNG1	FOXS1	OTP	TNNT3
CASP10	FRG2C	PADI6	TP53I11
CAV2	FRG2C	PARD6G	TP53I3
CCDC13	GABRD	PCSK9	TP53I3
CCDC3	GDF15	PDE2A	TP53INP1
CCL3	GJB5	PDE6C	TP53INP1
CCNK	GLS2	PGC	TRIAP1
CCR7	GPR172B	PHYHIP	TRIM22
CD79B	GPR56	PLA2G4D	TRPM6
CDH3	GRHL3	PLAC2	TSGA10
CDKN1A	GRIN2C	PLCD1	TSGA10
CEACAM1	HERC5	PLCL2	UBASH3B
CEACAM1	HES2	PLK2	UMODL1
CEACAM3	HHATL	PLK3	UNC45B
CEACAM3	HS3ST6	PLXDC1	WDR63
CEBPE	HTRA4	PLXNB3	WDR66
CHRFAM7A	ICAM4	PODXL	WNT4
CHST2	ICOSLG	POLH	XG
CNTN2	IGDCC4	PPP1R14C	XG
CRIP2	IL22RA1	PRAMEF8	ZNF469
CRISPLD2	INPP1	PRDM1	ZNF540
CSGALNACT1	INPP5D	PROCR	ZNF702P
CSTA	IP6K3	PRODH	ZNF750
CXCR2	ITGA3	PSTPIP2	ZSCAN4
CYFIP2	ITGB2	PTPRU	
CYP2S1	ITLN2	PVRL4	

CYP4F2
CYP4F3
D4S234E

JPH4
KANK3
KCNN4

RGAG1
RGMA
RINL